

# 論文内容要旨

間葉系幹細胞集塊 Clumps of Mesenchymal stem  
cell/extracellular matrix (C-MSC) を用いた  
新規歯周組織再生療法の開発

主指導教員：栗原 英見 教授

(応用生命科学部門 歯周病態学)

副指導教員：内田 隆 教授

(基礎生命科学部門 口腔細胞生物学)

副指導教員：吉子 裕二 教授

(基礎生命科学部門 硬組織代謝生物学)

竹脇 学

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 目的

歯周組織はセメント質、歯周靭帯、歯槽骨といった軟組織及び硬組織で構成されている。骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs)は多分化能を有することから、多様な組織で構成される歯周組織の再生治療への応用が期待されている。現在の細胞移植治療では、細胞移植に様々な人工足場材料が利用されているが、材料の生体適合性、適正な移植細胞数、および細胞機能発現の制約といった問題点がある。これらの問題点を解決するために、私どもが製法を確立した間葉系幹細胞集塊 **Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSC)**は、MSCs と MSCs が産生した **extracellular matrix (ECM)**のみで構成されており、人工材料を用いることなく効果的な骨組織再生能を示す。(Cytotherapy、2015)。本研究では、ビーグル犬を用いて実験的歯周炎を惹起させた根分岐部 3 級歯周組織欠損モデルにおける C-MSC の歯周組織再生能を評価した。

## 材料と方法

イヌ骨髄間葉系幹細胞(dMSC)は、移植予定のイヌの腸骨骨髄液の接着培養によって分離した。dMSC を 24well プレートに  $7 \times 10^4$ /well にて播種し、50 $\mu$ g/ml のアスコルビン酸含有の増殖培地 (DMEM+10% FBS)にて 4 日間培養し、十分な ECM を産生させた。これを鈍的に剥離し、細胞シートの状態で浮遊させ、さらに増殖培地にて 5 日間培養することによって、細胞集塊 C-MSC を得た。または、この C-MSC 作成過程を骨分化誘導培地(50 $\mu$ g/ml アスコルビン酸、0.1 $\mu$ M デキサメタゾン、10mM $\beta$ -グリセロフォスフェイト、DMEM+10%FBS)にて行うことで、石灰化誘導を施された C-MSC(OIM-C-MSC)を作成した。ビーグル犬下顎小臼歯に実験的歯周炎根分岐部 III 級欠損を作製し、根面のルートプレーニングを行った一週間後に、C-MSCs もしくは OIM-C-MSCs を移植した。欠損部になにも移植しないものを対照群として用いた。移植後 8、12 週目にマイクロ CT 撮影を行い、骨再生量を評価した。また、HE 染色によって組織学的解析を行い、歯周組織再生効果とその過程を観察した。

## 結果および考察

移植 8 週間後、非移植群では欠損底部からの骨の再生をわずかに認めたのみで、根分岐部直下には上皮の侵入が見られた。一方、C-MSC、OIM-C-MSC 移植群では、歯周靭帯、セメント質の再生のみならず、歯根面に沿って輪郭を形成するような歯槽骨の再生を認めたが、OIM-C-MSC 移植群により多くの骨再生を認めた。また、欠損中央部では炎症細胞浸潤と幼若な骨様組織が観察された。HE 染色を用いた形態学的計測では非移植群と C-MSC 移植群では有意な差はなかった。しかし CT を用いて骨の石灰化部分のみを定量したところ、C-MSC 移植群においても非移植群より多くの石灰化物が形成されていることが示された。このことから、CT による解析は HE 染色では評価が困難な石灰化度の違いによる骨量の計測に有用であると示唆された。移植 12 週間後、非移植群では組織の再生はわずかしら観察されなかった。一方、C-MSC、OIM-C-MSC 移植群では、歯根面付近のみならず欠損中央部においても骨の再生が観察され、欠損全体において十分な歯周組織再生を認めた。移植 8 週間後では OIM-C-MSC 移植群で有意に多かった再生骨量も、移植 12 週間後では差は見られなかった。上皮が侵入した部分において

セメント質の再生が見られなかったことから、歯周靭帯の埋入したセメント質再生は上皮の侵入防止に重要であると示唆された。また、上皮の侵入が見られなかった C-**MSC**、OIM-C-**MSC** 移植群では経時的に骨の再生を認めたことから、セメント質及び歯周靭帯の再生は上皮の侵入を防ぐのみならず、骨の再生にも重要であることが示唆された。C-**MSC** 移植では、**MSC** とアテロコラーゲン移植での再生過程とは異なり、移植 8 週間後で歯根面付近から骨の再生が観察された。これは、機械的刺激が **MSC** の骨分化を促進するとの報告があることや、歯周靭帯に豊富に存在する血管からの栄養供給等により、欠損中央部より早期に骨を形成した為だと考えられる。C-**MSC** を利用した細胞移植療法は、人工足場材料を使用せずに歯周組織再生を達成できることから、感染のリスクや宿主の好ましくない炎症応答や代謝反応の生じない確実な歯周組織再生療法であると考えられる。また、OIM-C-**MSC** は C-**MSC** 移植と比較して効率的に骨再生を誘導していたことから、一壁性の骨欠損などのより広範囲の欠損に適応できる可能性が高い。

## 結論

幹細胞集塊 C-**MSC** 移植は安全かつ効果的な新規歯周組織再生療法となる可能性が示唆された。