

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	平木 智香
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Influence of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) conditioned media on bone regeneration (ヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞の培養上清が骨再生に及ぼす影響)			
論文審査担当者			
主査	教授 加藤 功一	印	
審査委員	教授 栗原 英見		
審査委員	教授 太田 耕司		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>口唇口蓋裂（CLP）は、一般的な先天性口腔顔面異常である。CLPの顎裂部に対して、腸骨を用いた骨移植術が行われている。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は、長期入院の必要性、腸骨採取後の疼痛および歩行障害など様々な患者の負担を伴う。近年、間葉系幹細胞が分泌するサイトカインのパラクライン作用が注目され、幹細胞培養上清を用いた組織再生が報告されている。しかしながら、骨再生に対するヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞（SHED）の培養上清（SHED-CM）の影響について、詳細な検討を行った報告は見られない。そこで、本研究は、SHED-CMの各種培養細胞への影響とマウス頭頂骨の骨再生について検証することとした。</p> <p>矯正歯科治療の必要性から抜去された乳歯の歯髓より、SHEDを単離・培養し、70～80%コンフルエント到達後、FBS濃度0%の培地に交換し48時間後にSHED-CMを回収した。</p> <p><i>In vivo</i>実験では、SHED-CMの生体内における骨再生能を評価するため、6週齢免疫不全マウス（BALB/c-nu）の頭頂骨に直径5.0 mmの欠損を作製し、SHEDまたはSHED-CMを含有させたアテロコラーゲンを移植した（N=6）。一方、α-MEMを含有させたアテロコラーゲンを移植したマウスを対照群とした。その後、マイクロCTを用いて骨再生の三次元的な解析を行った。また、組織学的検討として、HE染色およびMasson's trichrome（MT）染色を行った。さらに、免疫組織化学染色によりVEGFおよびCD31の発現を検討するとともに、血管新生を評価した。</p> <p><i>In vitro</i>実験では、Magnetic Luminex Assay Human Premixed Multi-Analyte Kitを用いて、SHED-CM、hBMSCs-CMに含まれるタンパク質の定量解析を行った。また、SHED-CMに含まれるVEGFがHuman Umbilical Vein Endothelial Cells（HUVEC）の管腔様構造形成に及ぼす影響を検討するとともに、細胞増殖能をBrdU assay、血管形成をTube forming assayにより評価した。さらに、SHED-CMが、human bone marrow mesenchymal stem cells（hBMSCs）とmouse calvarial osteoblastic cells（MC3T3E1）に及ぼす影響について検討した。細胞増殖能をBrdU assay、ALP、OCN、Runx2、VEGF、Ang1、Ang2、HGFの遺伝子発現をreal-time PCRを用いて検討した。</p> <p><i>In vivo</i>実験における、マイクロCT解析の結果より、SHED-CM含有アテロコラーゲン移植群およびSHED含有アテロコラーゲン移植群では、対照群と比較して、有意に高い再生骨量が認められた。また、SHED-CM群では、SHED群および対照群と比較して、MT染色において成熟骨形成の促進が認められ、VEGFとCD31の高発現と血管新生の亢進が認められた。以上の結果より、SHED-CMの生体への移植により血管新生、および骨再生が促進されることが明らかとなった。SHED-CM、hBMSCs-CMに含まれるタンパク</p>			

質の定量解析の結果より、血管新生に影響を与える M-CSF、MCP-1、ANG、bFGF、VEGF-C、および VEGF-A、骨代謝関連マーカーである OPG、OPN、BMP-2、および BMP-4 が両培養上清中に多く含まれていた。一方、IGF-BP3 は SHED-CM では検出されず、hBMSCs-CM において多量に検出された。また、BDNF、β-NGF、GDNF、NT-3 などの神経栄養因子が hBMSCs-CM と比較して、SHED-CM に多く含まれることが確認された。さらに、SHED-CM 中の VEGF のブロッキングにより、HUVEC の細胞増殖能および血管形成が抑制されたことから、SHED-CM 中の VEGF が血管新生に関与していることが明らかとなった。hBMSCs、MC3T3-E1 を SHED-CM で培養することにより、細胞増殖が促進し、血管新生マーカー、骨分化マーカーの遺伝子発現が亢進することが明らかとなった。

以上の結果から、骨再生治療における SHED-CM の有効性が示唆された。

よって審査委員会委員全員は、本論文が平木 智香に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。