

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	本池 総太
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Conditions Facilitate Bone Regeneration via Direct and Indirect Osteogenesis. (ゼノフリー条件下に作製した間葉系幹細胞集塊 Clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes は自身の骨分化とホスト細胞の骨形成誘導を介して骨組織再生を促進する)			
論文審査担当者			
主査	教授	河口 浩之	印
審査委員	教授	加藤 功一	
審査委員	教授	宿南 知佐	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周炎は、歯周病原細菌感染と宿主の免疫応答の結果生じる炎症性組織破壊疾患である。現在、小規模な歯周組織破壊に対して、GTR法やbFGFの投与といった組織に内在する細胞を利用した歯周組織再生療法が臨床の場において行われている。しかし一方で、重度歯周炎などの大規模に破壊された組織の再生は、残存する生体内の細胞の機能をコントロールするだけでは困難と考えられている。そのため、重篤な組織破壊を示す組織の再生には、生体外から十分な量の機能的な細胞を供給する細胞移植療法が適していると考えられ、種々の開発が進められている。その中でも特に、歯周組織を構成する複数の組織に分化可能である間葉系幹細胞（MSCs）を利用した研究が注目を集めている。</p> <p>申請者が所属する研究室ではMSCsと細胞自身が産生するI型コラーゲンを主とした細胞外基質（ECM）を利用して、直径約1mmの三次元的人工細胞集塊 Clumps of MSC/ECM complexes (C-MSCs) を考案した。C-MSCsは自己産生したI型コラーゲンが足場として機能するため組織欠損部に直接移植できる。さらに重要なことに、1つのC-MSCsを移植最小unitとして捉え、それを複数個組み合わせることで、いかなる形態や大きさの欠損組織に対しても正確な細胞移植が可能になると期待される。実際、ラット頭蓋冠骨欠損モデルやビーグル犬根分岐部産Ⅲ級欠損モデルにおいて欠損形態に適合させたC-MSCsの移植が組織再生を効果的に誘導することを報告してきた。</p> <p>しかし、C-MSCsによる骨組織再生機序については未だ十分に解明されておらず、臨床応用を目指す上で移植先でのC-MSCsの動態を理解することが必要である。一般的に、細胞移植療法の組織再生機序の解析には、高い再現性が要求されるため、ロット間の組成差によって移植体の均一性、再現性を損なわせる可能性のある血清の使用は好ましくない。さらに臨床応用を考えると、未知の感染源を伝播させる可能性のある異種動物由来成分を用いずに移植体を作製できることが重要である。本研究では、C-MSCsをXeno-free/Serum-free条件下に作製し、移植後の骨再生過程におけるC-MSCs構成細胞とECMの組織内分布を評価し骨組織再生機序の解析を行うことを目的とした。</p> <p>Xeno-free/Serum-free条件下にC-MSCsを作製するため、ヒト骨髄由来MSCsを48-well plateに1.0×10^5 cells/wellで播種し、Xeno-free増殖培地で4日間培養し十分なECMを産生させた。さらに、得られた細胞シートを鈍的に剥離し浮遊させ、Xeno-free骨分化誘導培地で3日間培養することで細胞集塊C-MSCsを得た。C-MSCsの骨再生効果を評価するため、SCIDマウス頭蓋冠の直径1.6mm欠損に移植し、1週、2週、4週、8週間後にmicroCT撮影と組織学的解析を行った。さらに、骨形成過程におけるドナー細胞の分布をヒトVimentin、ドナー由来骨基質蛋白の発現をヒトCollagen I（ヒトCOL I）、ヒトOsteopontin（ヒトOPN）、ヒトOsteocalcin（ヒトOCN）に対する特異的抗体を用いた免疫組織染色によって経時的に観察した。また、機能的な骨組織が形成されているか確認する</p>			

ため、新生骨内の骨細胞ネットワーク形成の有無を、F-actin の免疫組織染色によって評価した。最後に、脱細胞処理を行った C-MSCs (Decell-C-MSCs) を同様に SCID マウス頭蓋冠骨欠損に移植し、骨再生効果を評価した。

C-MSCs の移植 2 週間後には欠損辺縁から軽微な骨形成を認め、移植 4 週間後には欠損中央部に C-MSCs 由来と思われる骨組織形成と骨断端部と連続する周囲からの骨形成が確認された。さらに移植 8 週間後には、より成熟した骨組織を認めるようになり、骨髄様構造も観察された。骨欠損中央部に形成された骨様組織にはヒト COL I /ヒト OPN/ヒト OCN の沈着が認められ、その内部には骨細胞様の形態を示すヒト Vimentin 陽性細胞が多数観察された。一方、骨断端部から添加される新生骨内には、ヒト細胞及びヒト細胞由来骨基質蛋白は認められず、骨細胞様の形態を示す宿主のマウス細胞によって構成されていた。また、Decell-C-MSCs は移植後に経時的に代謝され、骨再生を誘導しなかったことから、C-MSCs 内の細胞からのパラクライン因子が骨組織再生に重要な役割を担っていることが示唆された。

以上の結果から、本論文は Xeno-free/Serum-free 条件下に作製した C-MSCs が十分な骨再生能を有していることを明らかにした。さらに、C-MSCs 移植による骨組織再生機序は、ドナー細胞自身の骨分化と宿主細胞の骨形成能促進によるものであることを明らかにした。

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