

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	堀越 励
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 MSCs/ECM complexes generated with chondro-induction medium induces bone regeneration (軟骨誘導を施した間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSC/ECM complexes は骨再生を促進する)			
論文審査担当者			
主査	教授	加藤 功一	印
審査委員	教授	谷本 幸太郎	
審査委員	講師	武田 克浩	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周炎は、歯周病原細菌の感染と宿主の免疫応答の結果生じる、組織破壊を伴う炎症性疾患である。歯周炎による歯槽骨の吸収は歯牙喪失の最も大きな要因となるため、破壊された骨を回復させることが歯周病治療における課題であると考えられる。現在 GTR やリグロスといった歯周組織再生療法が行われているが、Ⅲ級根分岐部病変や水平性骨欠損のような大規模骨欠損に対する効果的な治療法は確立されていない。重篤な骨欠損の再生には、患部に不足している機能的な細胞を、外部から補充する細胞治療法の開発が必要である。</p> <p>申請者が所属する研究室では、自己複製能を有し、歯周組織構成細胞に分化可能な間葉系幹細胞(MSCs)に着目して研究を行ってきた。その結果、MSCs と自身が産生する細胞外基質(ECM)によって構成される細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes(C-MSCs)を樹立した。C-MSCs は直径約 1mm の立体構造を持ち、人工足場材料を用いることなく様々な組織欠損形態に適合した細胞移植が可能である。さらに、C-MSCs は移植前の細胞の機能調節を行うことが可能であり、骨分化誘導を施した C-MSCs が自身の膜性骨化を介して骨再生を促進することを既に報告している。</p> <p>一方、発生における骨の形成には膜性骨化と軟骨内骨化がある。軟骨内骨化の過程において MSCs は軟骨細胞へと分化し、その後肥大軟骨細胞まで成熟することで骨形成の起点となる。この軟骨細胞は、低栄養・低酸素条件下においても生存可能な特性を持つため、細胞移植時に血液供給の乏しくなる大規模欠損に対しても、細胞機能を損なうことなく軟骨内骨化によって骨再生を達成できる可能性がある。実際に、MSCs とサイトカイン投与によって、軟骨内骨化を経た骨再生療法の報告もある。そこで本研究では、新規骨再生細胞療法の開発を目指し、軟骨誘導を施した C-MSCs の骨再生効果を検討した。</p> <p>ヒト骨髄由来 MSCs を 48 well plate に 1.0×10^5 cells/well の高密度で播種し、4 日間 Xeno-free 増殖培地にて培養することで十分な ECM を産生させた。得られた細胞シートを well の底から鈍的に剥離し、Xeno-free の軟骨誘導培地にて 5・10・15 日間浮遊培養を行うことで分化程度の異なる軟骨誘導 C-MSCs(CIM-C-MSCs)を作製した。軟骨誘導培地による C-MSCs 内の細胞の変化を観察するため、HE・Safranin O 染色および real-time PCR を行った。また、CIM-C-MSCs の骨再生効果を調べるために SCID マウスの頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルへと移植した。頭蓋骨を回収し、micro CT および組織学的解析を行い、移植した細胞の分布をヒト Vimentin の蛍光免疫染色によって観察した。</p> <p>軟骨誘導を施した C-MSCs において、軟骨分化マーカー Sox9・Aggrecan・Col II・Col X mRNA の経時的な発現増加を認めた。また組織学的解析の結果、HE 染色にて軟骨細胞様の細胞を認め、軟骨誘導 10・15 日では Safranin O に濃染される軟骨基質の産生を認めた。</p>			

移植実験の結果、培養 5 日の CIM-C-MSCs 移植群では micro CT にて欠損周囲からの石灰化物の伸長が見られたが、欠損中央部での硬組織形成は得られなかった。組織学的解析の結果、骨欠損部には主にヒト Vimentin 陽性の細胞が構成する線維性結合組織が形成されていた。

培養 10 日の CIM-C-MSCs 移植群では、周囲からの旺盛な骨添加および欠損中央部での石灰化物形成を認め、さらに移植 12 週目には石灰化物と周囲骨が癒合していた。組織観察により、欠損中央の石灰化物は移植した C-MSCs 由来のものであることがわかり、移植 12 週間後には成熟骨の形成を認めた。また移植 1 週間後において、Safranin O に染まる軟骨基質が残存しており、その周囲にエオジンに染まる初期石灰化が生じていることも観察した。ヒト Vimentin 抗体を用いた免疫染色の結果、移植 4 週までは移植した C-MSCs 内の細胞のほとんどがヒト Vimentin 陽性の細胞であることが観察された。一方 4 週以降では、多くのヒト Vimentin 陰性の宿主マウス細胞の侵入を認め、移植 12 週間後の成熟骨内の細胞は主にマウスの細胞で構成されていた。

軟骨誘導 15 日の CIM-C-MSCs 移植群においても、培養 10 日のものと類似した硬組織形成が認められたが、一方で周囲からの骨形成は緩やかであった。また培養 10 日移植群と比較して、Safranin O に染まる軟骨基質が長期間残存していることも確認した。

以上の結果から、本論文は適度な軟骨誘導を施した C-MSCs 移植は、移植体自身の骨化と宿主細胞による骨形成によって、骨再生を促進する可能性を明らかにした。

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