

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	曾根 久勝
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 can induce periodontal tissue regeneration via direct differentiation (Clumps of MSCs/ECM complexes は自身の分化能によって歯周組織再生を促進する)			
論文審査担当者			
主査	教授 柿本 直也	印	
審査委員	教授 太田 耕司		
審査委員	教授 津賀 一弘		
〔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。歯周病が進行すると歯牙を支える歯槽骨の吸収および歯周靭帯の損傷といった歯周組織破壊を引き起こすことで、最終的には歯牙の喪失をもたらす。歯周組織を再生するために現在 GTR やリグロスといった再生療法が行われているが、適応症例が限定的であり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、骨分化誘導培地で培養した C-MSCs を移植すると、対照の増殖培地のみで培養した C-MSCs と比較して効果的な歯周組織再生を示したことを既に報告している。</p> <p>一方で C-MSCs 移植による歯周組織再生機序に関しては未だ解明されていない。C-MSCs の移植先での挙動を詳細に理解し、歯周組織再生機序を理解することは、C-MSCs を用いた歯周組織再生療法を臨床応用するために非常に重要である。そこで本研究では、ラットの歯周組織欠損モデルにおいて、C-MSCs 移植によって効果的な歯周組織再生がおきるかを検討したうえで、細胞膜を標識する PKH26 でラベリングした PKH26-C-MSCs を移植し、C-MSCs の歯周組織内分布を評価することで歯周組織再生機序の解析を行った。</p> <p>F344 ラット大腿骨から分離した MSCs を 24 Well Plate に 2.0×10^5 cells/well の高密度で播種し、十分な基質を産生させるためにアスコルビン酸を添加した Growth medium を用いて 4 日間培養した。得られた細胞シートを well の底から鈍的に剥離し、デキサメタゾン(10 nmol/l)・アスコルビン酸(50 μg/ml)・βグリセロフォスフェート(10 mmol/l)含有の培地で 5 日間浮遊培養を行うことで、細胞集塊 C-MSCs を得た。細胞追跡のため C-MSCs 作製には、細胞膜を蛍光標識する PKH-26 を添加することで、PKH26-C-MSCs を樹立した。</p> <p>F344 ラット歯周組織欠損モデルは、下顎第一大臼歯遠心根が露出するように 2.0 mm×3.0 mm×1.0 mm の歯槽骨を削除し、露出させた遠心根のセメント質を SRP にて除去</p>			

した。作製したラット歯周組織欠損モデルに 10~12 個の C-MSCs を直接移植した。移植 21 日目のラットにマイクロ CT を用いて骨再生量を定量し、また移植 21 日目と 10 日目のラットには組織学的解析によって歯周組織再生の評価を行い、さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて移植された PKH26 陽性細胞の分布を観察した。

移植後 21 日目のマイクロ CT の解析から、移植無し群と比較して、C-MSCs 移植群において明らかな歯槽骨の再生が認められた。HE 染色による組織学的評価では、C-MSCs 移植群で新生セメント質と歯槽骨、さらにそれらをつなぐ歯周靭帯が観察された。さらに、アザン染色によって新生セメント質に埋入するシャープピー繊維を認めた。一方、移植無し群ではこれらの新生セメント質や歯周靭帯の再生は認められず、線維性結合組織を認めるのみであった。再生した組織中の PKH26 陽性細胞の分布を観察したところ、移植した PKH26 陽性細胞は骨表面、骨基質内部、歯周靭帯及び根面部に認められた。またこれらの部位には宿主由来の PKH26 陰性細胞も同時に認められた。

移植後 10 日目の移植無し群では欠損内部には赤血球や疎な線維組織が観察された。一方で PKH26-C-MSCs 移植群では欠損内部に細胞が密に存在しており、これらの多くが PKH26 陽性細胞であった。またドナー由来と示唆される I 型コラーゲンが多く存在していた。

以上の結果から、C-MSCs による歯周組織再生はドナー細胞と宿主細胞自身が連携することによって歯周組織再生が達成され、またドナー由来の I 型コラーゲンによって多くのドナー細胞が欠損内部に留まり分化することで、再生された歯周組織の大部分がドナー細胞によって構成された可能性を示唆された。

これらの研究成果は、歯周組織再生療法の発展に寄与するものが大きいと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が曾根久勝に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。