

学位論文の内容要約

Ex-vivo における骨髄由来間葉系幹細胞を用いた歯周組織構築

鈴木 雅彦

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

博士課程 医歯薬学専攻

2019 年度

主指導教官：栗原 英見 教授
(医系科学研究科 歯周病態学)

【目的】

歯周炎は歯周病原細菌の感染とそれに伴う生体の免疫応答によって歯周組織が破壊される炎症性の疾患である。歯周組織は、歯肉、セメント質、歯周靭帯および歯槽骨によって構成され、ひとつの組織として機能している。一般的に組織再生は、組織工学的には細胞、足場及びシグナル分子が重要とされ、それらを取り巻く環境と作用時間などが再生に導くための条件とされる。一方で、細胞の機能制御は、液性因子、細胞外基質、あるいは場の硬さなどの細胞を取り巻く微小環境が重要因子である。歯周組織再生において最も重要なことは、セメント質再生とセメント質および歯槽骨に埋入したコラーゲン繊維を伴う歯周靭帯の再生である。根分岐部病変に骨髓由来間葉系幹細胞を移植した研究や、脳由来神経栄養因子による歯周組織再生研究において、良好な歯周組織の再生を認めている。また両者に共通する特徴的な所見として、根表面においてオステオポンチン (OPN) が強く発現した。すなわち OPN はセメント質形成において重要なシグナルであると考えられ、歯周組織再生の鍵を握る分子と考えられる。本研究では、大規模歯周組織欠損部の再生と歯周病が原因で抜歯した歯の再植への応用を目指し、自己増殖能と多分化能を有する骨髓由来のヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を用い、*ex vivo* においてセメント質と歯周靭帯の再生を目的として以下の研究を行った。

【材料および方法】

1. 象牙質表面に播種した hMSC の分化に関する病理組織学的検討

ヒトの抜去歯を用いて象牙質片を作成し、24%EDTA を用いて象牙質表面の脱灰を行なった。タイプ I コラーゲンゲルに hMSC を懸濁し、hMSC—コラーゲン複合体を作製し、象牙質片を完全に覆うように培地に静置した。通常培地 (GM) 下で 4 週間培養し、通法に従い固定、脱灰およびパラフィン包埋を行なった。組織切片作製後に HE 染色、また免疫染色として OPN、PCNA および integrin α V β 3 について行なった。

2. 象牙質表面で培養した hMSC の増殖に関する検討

象牙質片上に hMSC を播種し、2 週間後にギムザ染色を行い、実体顕微鏡で観察した。2 および 4 週間後には位相差顕微鏡を用いて、hMSC の増殖に関する観察を行った。

3. hMSCの培養を行なった象牙質片上でのhMSC—コラーゲン複合体の3次元培養における病理組織学的検討

一次培養として象牙質片上でhMSCを播種し、GM下において2週間培養した後に、継続して二次培養として、hMSC—コラーゲン複合体を、hMSCを付着させた象牙質を覆うように培地に静置し、GM下で2週間培養した。その後、組織切片を作製しHE染色およびアザン染色を行った。

4. 一次培養時の骨分化誘導および二次培養時のコラーゲングル中のhMSCの有無に関する病理組織学的検討

一次培養として象牙質片上でhMSCを播種し、GM下において9日間培養した後に、骨分化誘導培地(OIM)下において5日間培養した。継続して二次培養として、hMSC—コラーゲン複合体を、hMSCを付着させた象牙質を覆うように培地に静置し、GM下で3日および1週間培養した。その後、組織切片を作製しHE染色、OPNの免疫染色およびアザン染色を行った。

【結果および考察】

象牙質片とコラーゲングル及びhMSCを用い、ex-vivoにおいてOPN発現およびセメント質形成に焦点をあてて、歯周組織を構築する研究を行い、以下の結果を得た。

1. hMSCは象牙質表面に偽足を伸ばし伸展し、細胞増殖した。
2. hMSCを含んだコラーゲングルは象牙質と組織化した。
3. 象牙質表面とhMSCを含んだコラーゲングルが組織化する際、OPNが発現した。
4. hMSCを象牙質上で2週間の一次培養を行い、象牙質表面にhMSCを伸展、接着させ、続けてhMSCを含んだコラーゲングル中でhMSC培養後の象牙質片を二次培養すると、象牙質表面と細胞外基質が組織化した。
5. 一次培養期間中、hMSCに骨分化誘導をかけた後に、hMSCを含んだコラーゲングル中でhMSC培養後の象牙質片の二次培養を1週間行うと、象牙質表面上の細胞の付着、象牙質表面と連続した細胞外基質産生との組織化が促進されるとともに、OPNが象牙質表面や細胞外基質内に発現した。
6. 二次培養時のコラーゲングル中のhMSCの有無は、1週間の培養期間においては、象牙質と細胞外基質の組織化に影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、*ex-vivo*において象牙質がhMSCの象牙質面への接着を介して歯周組織が構築されるメカニズムは以下の様に推察される。EDTA処理により象牙質表面は再生阻害因子であるスミア層が除去され、脱灰を受けることによりコラーゲン繊維が露出し、より細胞の遊走促進および増殖しやすい環境が整っている。象牙質表面に接着しているhMSCは、周囲を象牙質及び細胞外基質という硬い基質に囲まれ、メカノトランスダクションによる細胞の分化が制御され、より骨分化しやすい環境が整うことで多くの細胞外基質を産生し、伸展、増殖していると考えられる。またhMSCは象牙質表面で多くの液性因子を放出することにより、細胞の遊走、増殖や基質の産生は亢進する。一方でhMSCが自ら分泌するOPNを象牙質表面に堆積させると共に、インテグリンなどの接着因子を介して、細胞外基質や象牙質表面への接着性が増加すると推察できる。OPNの分泌はhMSCをセメント芽細胞へ分化させる重要な液性因子であり、象牙質表面にhMSCを効率的に接着させ、OPNを発現させることで、hMSCが象牙質表面上でセメント質形成を介して歯周靭帯が象牙質表面に封入された歯周組織構築への礎となると考えられた。

【結論】

象牙質表面上で3次元培養を行ったhMSC-コラーゲン複合体は象牙質と密着し、象牙質界面にOPNを産生し、セメント質形成細胞へと分化し、象牙質表面構造の再生の起点となる可能性が示唆された。