

ふりがな 氏名	なかま ひとみ 仲間 ひとみ
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	乙 第1667号
学位授与の日付	令和6年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項に該当
学位論文題目	Effects of Vitamins Added to Culture Medium for Calcified Nodule Formation by Rat Bone Marrow Cells (ラット骨髄細胞培養における石灰化結節形成に対するビタミン添加の効果)
学位論文掲載誌	Nano Biomedicine 第15巻 第2号 令和5年12月
論文調査委員	主査 前田 博史 教授 副査 山本 一世 教授 副査 梅田 誠 教授

論文内容要旨

間葉系幹細胞 (MSCs) が存在する歯髄組織は歯や骨の再生医療にとって適切なセルソースとなり得るが、そこに存在する MSCs の数は少ない。長い期間を要する歯や骨の再生には多数の MSCs が必要で、MSCs を速やかに増殖・分化させ、硬組織を再生するための増殖・分化因子が求められる。MSCs の分化と骨形成を誘導する因子として従来から用いられている Dexamethasone (Dex) の他に、より効果的に硬組織の形成を誘導する新たな因子が必要と考え、生理活性物質である Vitamin 類、とくに、Vitamin B (VB) 類に着目した。そして、MSCs を含むラット骨髄細胞 (rBMCs) の培養液に Dex、 β -Glycerophosphate (β -GP)、アスコルビン酸 (VC)、そして、3 種の VB を添加し、r MSCs による凝集塊すなわち石灰化結節の形成から、骨形成に及ぼす VBs の効果を知る目的で本研究を行った。

生後 6 週齢の雄性 Fischer 344/N Slc ラット 3 匹の大腿骨から rBMCs を採取した。本研究は大阪歯科大学・動物実験委員会で承認され (承認番号 21-07001, 23-07003)、本学が定める動物実験規定に従って行われた。rBMCs の培養には、15% ウシ胎児血清、Penicillin 100 units/mL、Streptomycin 100 μ g/mL および Amphotericin B 0.25 μ g/mL を加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium (E-MEM) を用いた。1 週間の初代培養後、6-well cell culture plate で 11 日間の継代培養を、5% CO₂、相対湿度 95%、37°C のインキュベーター内で行った。継代培養では、E-MEM に 10 nM Dex、1 mmol β -GP、82 μ g/mL VC の各 20 μ L をそれぞれ添加した MEM-Dex と、 β -GP のみを 20 μ L 添加した MEM-GP とを調整し、rBMCs を 0.5×10^5 個/mL 含む MEM-Dex または MEM-GP を各 well に 2mL 分注した。さらに、20 μ L の 10 μ M、100 μ M、1mM、10mM または 100mM 濃度の Vitamin B₁ (VB₁)、B₃ (VB₃) あるいは B₅ (VB₅) を MEM 交換時に添加、培養した。培養液は週に 3 度交換した。継代培養後、形成された凝集塊が石灰化物であることを Von Kossa 染色で確認し、別の well で rBMCs の Alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定した。形

成された凝集塊としての結節は脱灰して、含まれる Ca^{2+} を生化学的に定量した。結果は Tukey-Kramer 法を用いて統計的に分析した。

rBMCs を継代培養して培養液中に形成された凝集塊が石灰化物であることを Von Kossa 染色で確認した。石灰化凝集物を脱灰して得た Ca^{2+} 量から、MEM-Dex への VB_1 および VB_3 添加が石灰化物形成を誘導し、MEM-Dex への 10、100 μM あるいは 1 mM 濃度の VB_1 の添加で Ca^{2+} 量が有意に多く、10 μM 濃度の VB_3 の添加でも MEM-Dex のみよりも Ca^{2+} 量が有意に多かった。また、 VB_5 添加での MEM-Dex における結節から得た Ca^{2+} の値は有意に低かった。

VB 類は一般に体内で糖をエネルギーに変えるが、Vitamin B_6 (VB_6) や B_{12} (VB_{12}) は骨質強化にも関与すると言われている。 VB_6 および VB_{12} との比較は行っていないが VB_1 と VB_3 も Dex と β -GP の骨形成能を高める効果を有すると思われる。一方、骨質を強化すると言われている VB_5 は、石灰化結節の形成を抑制して Dex の骨形成作用を阻害する可能性がある。この実験では MSC s による硬組織形成に対する VB の効果を *in vitro* の実験結果から評価したが、今後、生体の複雑な生理機構で働く MSCs に対する VBs の影響を *in vivo* で検証するべきと考える。

MEM-Dex に添加した VB_1 と VB_3 は、それぞれ、MEM-Dex における継代培養で rMSCs による石灰化結節の形成を促進した。一方、rMSCs の継代培養で添加された VB_5 は Dex の石灰化結節形成を抑制した。

なお、外国語 1 か国語 (英) で試問を行った結果、合格と判定した。

論文審査結果要旨

歯や骨の再生には多数の間葉系幹細胞 (MSC s) が必要であり、MSC s を速やかに増殖・分化させ、硬組織を再生するための増殖・分化因子が求められる。従来、*in vitro* における MSC s を用いた実験では、イーグル最小必須培地 (E-MEM) に Dexamethasone (Dex)、 β -Glycerophosphate (β -GP)、アスコルビン酸 (VC) を分化の誘導因子として添加した培養液が用いられるのが一般的である。

申請論文においては、MSCs の分化と骨形成誘導する因子として Dex の他に、より効果的に硬組織の形成を誘導する新たな因子として、生理活性物質である Vitamin 類、とくに、Vitamin B 類 (Vitamin B_1 、Vitamin B_3 、Vitamin B_5) に着目し、ラット骨髄細胞 (rBMCs) を採取・培養し、それらの添加の効果を様々な濃度で *in vitro* で検討している。

その結果、Dex を含む E-MEM で rBMCs を継代培養した場合、いずれの Vitamin B 類の添加でも石灰化結節の形成を認めた。また、Vitamin B_1 はいずれの濃度でも、Vitamin B_3 は低濃度の添加により、Dex の添加のみよりも有意に多いカルシウム形成を認めた。しかし、Dex を添加しない培地に Vitamin B 類を添加しても石灰化結節形成は認められなかった。

以上の結果より、*in vitro* での rBMCs の増殖と分化および骨形成の誘導において、Vitamin B_1 および Vitamin B_3 は従来の培養液への添加することで効果促進することが明らかとなった。この点において高い新規性と臨床応用への発展性を評価し、本論文は、博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。

なお、外国語 1 か国語 (英) で試問を行った結果、合格と判定した。