

ふ り が な 氏 名	ささやま さとし 笹山 智史
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	甲 第 838 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学 位 論 文 題 目	Osteogenesis of Multipotent Progenitor Cells using the Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatin Sponge Scaffold in the Rat Congenital Cleft-Jaw Model  （ラット先天性顎裂モデルにおける多能性前駆細胞を播種し た EGCG 結合ゼラチンの骨形成）
学 位 論 文 掲 載 誌	International Journal of Molecular Sciences 第 19 巻 第 12 号 平成 30 年 12 月
論 文 調 査 委 員	主 査 馬場 俊輔 教授 副 査 今井 弘一 教授 副 査 三宅 達郎 教授

## 論文内容要旨

唇顎口蓋裂や広域骨欠損部位での骨再生は未だ困難である。緑茶由来エピガロカテキンガレート (EGCG) に注目し、EGCG をゼラチンに化学結合させた EGCG 結合ゼラチンスポンジ(EGCG-GS)を開発し、その骨再生研究を日々進めている。さらに、EGCG-GS に真空加熱を施した真空加熱型カテキンゼラチン(vhEGCG-GS)が、EGCG-GS や真空加熱型ゼラチン(vhGS)に比べ優れた骨再生能を示すことを明らかにした。しかし、骨再生用細胞播種材料としての有用性は明らかになっていない。本研究では、新規細胞播種担体の開発に向け、vhEGCG-GS の材料学的評価を行った。また、ラット先天性顎裂モデルに多能性前駆細胞である脱分化脂肪細胞(DFAT)と脂肪由来幹細胞(ADSC)を播種した vhEGCG-GS と vhGS を埋入し、骨形成能・機序を比較検討した。

vhEGCG-GS は、EGCG を豚皮膚由来タイプ A ゼラチンに化学結合させ、凍結乾燥、真空加熱処理 (150℃、24 時間)を施して作製した。対照実験として、同様の方法を応用し EGCG を含有しない vhGS を作製した。得られた両担体の材料学的評価に、走査型電子顕微鏡(SEM)観察、Zeta 電位測定、接触角測定を行った。両細胞は、F344 ラット雄 8 週齢の鼠径部より採取した脂肪組織から調整した。骨形成能は、同ラット雄 8 週齢 70 匹の顎裂欠損部(直径 2mm、高さ 4mm)に各試料を埋入し、4、8 週後マイクロ CT による骨形態計測と組織学的評価を行った。実験群として両担体へ DFAT あるいは ADSC を播種した群、対照群として非埋入群、vhGS、vhEGCG-GS 単独群の計 7 群(n=5)を用いた。さらに、in vitro にて細胞接着性を dsDNA アッセイと蛍光免疫染色、リン酸カルシウムの析出をフーリエ変換赤外分光分析と X 線光電子分光法を用いて評価した。統計解析には、一次元分散分析と Tukey-Kramer

法を用いた。(大阪歯科大学動物実験委員会承認承認番号 17-03003)

SEM 観察、dsDNA アッセイ、蛍光免疫染色より vhEGCG-GS は vhGS に比べ細胞接着能に優れ、より多くの細胞を効率的に捕捉した。骨形態計測と組織学的評価より、両細胞とも vhEGCG-GS へ播種した群で優れた骨形成を認めた。また、Zeta 電位測定では、vhGS はプラスに帯電、vhEGCG-GS はマイナスに帯電していた。文献的考察によると EGCG は多様な薬理効果を持つが、本結果を考慮すると、EGCG の結合はゼラチン担体の表面性状を変化させ、効率的な多能性前駆細胞の捕捉、骨形成を増強させる新たな表面修飾方法となる可能性が示唆された。以上より、vhEGCG-GS は唇顎口蓋裂、広域骨欠損や外傷部位などの骨形成を促進させ、審美的な回復に貢献する新規細胞播種担体となりえる可能性が示唆された。

### 論文審査結果要旨

緑茶から抽出されるエピガロカテキンガレート(EGCG)をゼラチンに化学結合させた新規骨再生材料(vhEGCG-GS)の開発を進めている。一方、多能性前駆細胞である脂肪由来幹細胞(ADSC)や脱分化脂肪細胞(DFAT)は、in vitro において適切な環境下で培養された場合、骨芽細胞へと分化しうるものの、in vivo において両細胞をより効率的に分化させ、骨形成させる優れた細胞播種担体の開発は未だ検討の余地を残す。本研究では、広域骨欠損の治療に用いる有効な細胞播種担体の開発に向け、ラット先天性顎裂モデルを用い、両細胞を播種した vhEGCG-GS とゼラチンスポンジ(vhGS)の骨形成能を比較検討した。さらに機序解明を目指し、in vitro において、細胞接着挙動、担体の石灰化挙動、表面性状を評価した。

vhEGCG-GS は、EGCG を豚皮膚由来 Type A ゼラチンに化学結合させ、凍結乾燥、真空加熱処理にて作製した。材料評価は、走査型電子顕微鏡(SEM)観察、Zeta 電位測定、接触角測定にて行った。両細胞は、F344 ラット雄 8 週齢の鼠頸部より採取した脂肪組織から調製した。DFAT の調製には、天井培養法を用いた。骨形成能は、ラット雄 8 週齢 70 匹の下顎骨正中部に顎裂(直径 2mm×高さ 4mm)を形成し、各試料を埋入し、4・8 週後マイクロ CT による骨形態計測と組織学的評価を用いて見積もった。実験群として両担体へ DFAT あるいは ADSC を播種した群、対照群として非埋入群、vhGS、vhEGCG-GS 単独群の計 7 群、各群 5 匹を用いた。また、in vitro での細胞接着能を dsDNA アッセイ、SEM 観察、蛍光免疫染色にて評価した。さらに、培養液中で担体上に析出したリン酸カルシウムを X 線光電子分光分析にて確認した。統計評価には、一次元分散分析と Tukey-Kramer 法を用いた。

両細胞ともに vhEGCG-GS へ細胞播種した群が、非細胞播種群(vhEGCG-GS 単独)に比べ優れた骨形成を促した。vhEGCG-GS へ DFAT を播種した群が最も高い骨形成を示した。さらに、vhEGCG-GS は vhGS に比べ細胞接着能に優れていた。また、Zeta 電位測定では vhGS はプラスに帯電していたのに対して vhEGCG-GS はマイナスに帯電していた。接触角測定では vhEGCG-GS は親水性を示し、vhGS は疎水性を示した。また、vhEGCG-GS 上にリン酸カルシウムの沈着を認めた。

以上、ADSC と DFAT 細胞という 2 つの多能性前駆細胞を用いているが、いずれの細胞も vhGS に比べ vhEGCG-GS に播種された環境下でより骨を形成した。過去の報告において EGCG は潜在的に骨芽細胞誘導能を持つことが知られていることや、in vitro 実験での vhEGCG-GS と vhGS の表面性状の違いを考慮すると、vhEGCG-GS は効率的に多くの細胞を捕捉し、さらに in vivo で骨芽細胞分化を促すなど、骨形成を促すための適切な環境を提供し、唇顎口蓋裂や外傷部位の骨形成を促進させ、

審美性や口腔機能の回復に有効な新規細胞播種担体となることを明らかにした点において、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。