

ふりがな氏名	ろきんしょう 呂金釧
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 922 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 4 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	Comparison of Osteogenic Potentials of Dental Pulp and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using the New Cell Transplantation Platform, CellSaic, in a Rat Congenital Cleft-Jaw Model  （ラット先天性裂顎モデルにおける新規細胞移植プラットフォーム CellSaic を使用した歯髄および骨髄間葉系幹細胞の骨形成能の比較）
学位論文掲載誌	International Journal of Molecular Sciences 第 22 巻 第 17 号 令和 3 年 9 月
論文調査委員	主査 松本 尚之 教授 副査 橋本 典也 教授 副査 本田 義知 教授

### 論文内容要旨

近年、骨髄間葉系幹細胞（BMSC）治療法は臨床的に使用されているが、痛みを伴う収集方法や貧しいドナーなど、いくつかの実的な欠点がある。それに対して、人間の歯髄から単離された歯髄幹細胞（DPSC）は、損傷が少なく、増殖率が高い、優れた骨芽細胞分化能などに多くの利点がある。ヒト I 型コラーゲンの  $\alpha$ -1 配列に基づいて開発した「Cellnest」と呼ばれる新しいタイプの 3D 吸収性生体材料に着目した。Cellnest は細胞を融合させて「CellSaic」と呼ばれる立体構造を形成する。本研究では、新しい細胞移植プラットフォーム rBMSC-CellSaic および rDPSC-CellSaic を使用して、骨芽細胞分化および非分化培地におけるラット下顎骨先天欠損モデルを用いて骨形成能を評価した。

in vitro では、6 週齢 F344 ラットから rBMSCs および rDPSCs 細胞を取得した。フローサイトメトリーを使用し、両細胞とも CD90、CD73、および CD44 に対して陽性であり、CD45 に対して陰性であった。多能性分化誘導培地を使用して、rBMSC および rDPSC の骨芽細胞分化能、軟骨芽細胞分化能、および脂肪細胞分化能を認めた。rDPSC-CellSaic を骨分化培地で 21 日培養後、走査型顕微鏡により細胞と足場材料が一体化しており、内部に気孔が観察された。シリウスレッド染色の結果は、偏光顕微鏡下で黄橙色を示す足場材料に細胞が接着していることが示された。DAPI 染

色により、すべての期間で細胞核の存在を確認できた。アリザリンレッドの結果、14日後、rDPSC-CellSaicはrBMSC-CellSaicよりも高い染色が認められた。両グループともlive/dead染色では、中心に死細胞は認められなかった。RT-PCR分析の結果、RUNX2発現は、7日目のrBMSC-CellSaicが最も高かった ( $p < 0.05$ )。COL1とALPはすべてのグループで14日目に高い値を示した。

in vivoでは、分化したrDPSC-CellSaicグループでは、すべての期間で骨体積率が最も高かった。さらに、未分化のrDPSC-CellSaicグループは4週目から骨形成を示し、経時的に増加した。4週目には、分化群で骨芽細胞が観察されたが、未分化群では骨芽細胞は観察されなかった。6週目と8週目には、未分化のrDPSC-CellSaic群でも骨芽細胞が観察された。骨形成の認められた組織の領域ではトルイジンブルーの染色が認められた。

本研究は、Cellnest™を足場として使用して作成されたrDPSC-CellSaicおよびrBMSC-CellSaicは、ラット下顎骨先天欠損モデルの骨形成を促進するための優れた複合体であった。さらに、rDPSC-CellSaicがrBMSC-CellSaicよりも頭蓋顔面骨形成に有用であることが示唆された。

#### 論文審査結果要旨

本研究では、新しい細胞移植プラットフォームrBMSC-CellSaicおよびrDPSC-CellSaicを使用して、骨芽細胞分化および非分化培地におけるラット下顎骨先天欠損モデルを用いて骨形成能を評価した。

in vitroでは、6週齢F344ラットからrBMSCsおよびrDPSCs細胞を取得した。フローサイトメトリーを使用し、両細胞ともCD90、CD73、およびCD44に対して陽性であり、CD45に対して陰性であった。多能性分化誘導培地を使用して、rBMSCおよびrDPSCの骨芽細胞分化能、軟骨芽細胞分化能、および脂肪細胞分化能を認めた。rDPSC-CellSaicを骨分化培地で21日培養後、走査型顕微鏡により細胞と足場材料が一体化しており、内部に気孔が観察された。シリウスレッド染色の結果は、偏光顕微鏡下で黄橙色を示す足場材料に細胞が接着していることが示された。DAPI染色により、すべての期間で細胞核の存在を確認できた。アリザリンレッドの結果、14日後、rDPSC-CellSaicはrBMSC-CellSaicよりも高い染色が認められた。両グループともlive/dead染色では、中心に死細胞は認められなかった。RT-PCR分析の結果、RUNX2発現は、7日目のrBMSC-CellSaicが最も高かった ( $p < 0.05$ )。COL1とALPはすべてのグループで14日目に高い値を示した。

in vivoでは、分化したrDPSC-CellSaicグループでは、すべての期間で骨体積率が最も高かった。さらに、未分化のrDPSC-CellSaicグループは4週目から骨形成を示し、経時的に増加した。4週目には、分化群で骨芽細胞が観察されたが、未分化群では骨芽細胞は観察されなかった。6週目と8週目には、未分化のrDPSC-CellSaic群でも骨芽細胞が観察された。骨形成の認められた組織の領域ではトルイジンブルーの染色が認められた。

以上、本研究は、Cellnest™を足場として使用して作成されたrDPSC-CellSaicおよびrBMSC-CellSaicは、ラット下顎骨先天欠損モデルの骨形成を促進するための優れた複合体であった。さらに、rDPSC-CellSaicがrBMSC-CellSaicよりも頭蓋顔面骨形成に有用であることが示唆されたという点において、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。