

ふりがな氏名	みかみ ゆたか 三上 豊
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	乙 第 1585 号
学位授与の日付	平成 25 年 12 月 25 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	コラーゲンをスキャホールドとして 3 次元培養した HMS0014 細胞による硬組織形成
学位論文掲載誌	日本再生歯科医学会誌 第 11 巻 第 1 号 平成 25 年 12 月 30 日
論文調査委員	主査 岩井 康智 教授 副査 山本 一世 教授 副査 武田 昭二 教授

#### 論文内容要旨

コラーゲンをスキャホールドとした再生療法の研究にはこれまで関節軟骨、胆管、角膜などに関するものが行われてきた。われわれは以前の研究で、*in vitro* においてマウス骨髄由来幹細胞 KUSA/A1 (JCRB 細胞バンク、茨木市) を、コラーゲンをスキャホールドとして用いて 3 次元包埋培養し、その中に市販のチタンインプラント体を埋入し、インプラント体表面への硬組織形成を誘導した。それらの研究で細胞は分化誘導を開始してから 7 日目でオステオカルシンの発現が増加し、骨芽細胞様細胞に分化したことが示された。また 3 次元包埋培養 21 日目の観察でインプラント体表面に *contact osteogenesis* に類似した硬組織の形成が認められた。本研究では、より臨床に近づけるためヒトの骨由来の間葉系幹細胞である HMS0014 細胞（理化学研究所バイオリソースセンター、つくば市）を用いた。この細胞が骨芽細胞様細胞へ分化するかどうか確認するため、細胞をコラーゲンに包埋し、分化誘導を行った後、生化学的に検索した。骨芽細胞様細胞へ分化していることを確認した後、細胞を混和したコラーゲン内にチタンインプラント体を包埋し骨芽細胞様細胞への分化誘導を行った。インプラント体表面と周囲のコラーゲンの石灰化の様相を経日的に観察した。21 日経過後にインプラント体と周囲のコラーゲンを切り出し、インプラント体と周囲のコラーゲンのレジン研磨標本、インプラント体周囲のコラーゲンの凍結切片および超薄切片を作製し観察した。今回のヒト間葉系幹細胞においてもインプラント体表面と周囲のコラーゲンに硬組織の形成が起こるかどうか、また、これまであまり検討されてこなかったコラーゲン内での線維性構造の変化についても検索した。

本研究において、骨芽細胞様細胞に分化誘導された HMS0014 細胞は、(1) インプラント体上に *cement line* となる石灰化物を形成した。(2) スキャホールドとして用いたコラーゲンを吸収しながら新たにコラーゲン線維を形成した。(3) インプラント体周囲のコラーゲン内に石灰化ノジュ

ールを形成した。(4) タイプ 2 の Non-apoptotic プログラム細胞死して行く細胞が観察された。

今回の研究の結果から、ヒト骨由来間葉系幹細胞を用いて、骨欠損のあるインプラント窩内において生体吸収性のスキャフォールドの中でインプラント体周囲に骨形成が可能であることが示唆された。また、そこで造成された骨様組織は骨改造現象を受けることによりインプラント周囲骨組織の治癒が進むと考えられ、より安定した咀嚼機能を可能にするオッセオインテグレーション (functional osseointegration) の獲得につながることを期待される。

### 論文審査結果要旨

本研究はコラーゲンをスキャホールドとしてヒト骨由来間葉系幹細胞 HMS0014 を 3 次元培養し、その中にチタンインプラント体を包埋した際のインプラント体表面の硬組織形成、特に細胞成分と細胞間質の turn-over について組織学的に検討したものである。

ヒト骨由来間葉系幹細胞 HMS0014 が骨芽細胞様細胞へ分化するかどうか確認するため、細胞をコラーゲンを包埋し、分化誘導を行った後、生化学的に検索した。石灰化組織の形成、アルカリホスファターゼ活性、オステオカルシンの発現により骨芽細胞様細胞へ分化していることを確認した後、細胞を混和したコラーゲン内にチタンインプラント体を包埋し骨芽細胞様細胞への分化誘導を行った。インプラント体表面と周囲のコラーゲンの石灰化の様相を経日的に観察した。21 日経過後にインプラント体と周囲のコラーゲンを切り出し、インプラント体と周囲のコラーゲンのレジ研磨標本、インプラント体周囲のコラーゲンの凍結切片および超薄切片を作製し観察した。ヒト間葉系幹細胞においてインプラント体表面と周囲のコラーゲンに硬組織の形成が起こるかどう、また、これまであまり検討されてこなかった細胞成分とコラーゲン線維を中心とした細胞間質の turn-over についても検討した。

実験の結果、骨芽細胞様細胞に分化誘導された HMS0014 細胞は、(1) インプラント体上に cement line の形成に従って、contact osteogenesis による石灰化物を形成した。(2) スキャホールドとして用いたコラーゲンを吸収しながら新たにコラーゲン線維を形成した。(3) インプラント体周囲のコラーゲン内に石灰化ノジュールを形成した。(4) タイプ 2 の non-apoptotic プログラム細胞死して行く細胞が観察された。以上の結果から、ヒト骨由来間葉系幹細胞を用いて、骨欠損のあるインプラント窩内において生体吸収性のスキャホールドの中でインプラント体周囲に骨形成が可能であることが示唆された。

本研究論文では、ヒト骨由来間葉系幹細胞からチタンインプラント体表面に骨様組織の形成を開始されたことが確認され、コラーゲンの生体吸収性スキャホールドとしての有用性を明らかにした。また、細胞と細胞間質の変化の様相を明らかにした点において、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 (英語) について試問を行った結果、合格と判定した。