

ふりがな氏名	おきた なおや 沖田 直也
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 753 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 6 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	Effects of Strontium Ions on the Chondrogenic Differentiation of Adipose-derived Stem Cells (ストロンチウムが脂肪由来幹細胞の軟骨分化誘導に及ぼす影響)
学位論文掲載誌	Journal of Oral Tissue Engineering 第 12 巻 第 1 号 平成 26 年 9 月
論文調査委員	主査 松本 尚之 教授 副査 池尾 隆 教授 副査 今井 弘一 教授

論文内容要旨

口唇口蓋裂などの鼻部軟骨欠損に対して軟骨細胞を用いた再生療法が試みられている。脂肪組織から単離された脂肪由来幹細胞（Adipose-Derived Stem Cells : ADSCs）は採取制限が少ない脂肪組織中に大量に存在し、多分化能を有するなど軟骨細胞調達への優れた細胞ソースとして考えられている。しかしながら、同細胞を高効率で軟骨分化誘導する手法には未だ改善の余地を残す。

今回われわれは、生体安全性に優れ、細胞賦活効果が報告されているストロンチウム（Sr）に着目した。Sr はカルシウムに類似した生化学的性質を持ち、既に骨芽細胞分化誘導能、破骨細胞分化抑制能が報告され、骨領域を中心に応用されているものの、軟骨領域での知見は未だ乏しい。本研究では、ADSCs の効果的な軟骨分化誘導法の開発を目指し、Sr が ADSCs の軟骨分化に及ぼす影響を検討した。

実験に用いた ADSCs は、口腔外科手術時に切除されたヒト頬脂肪体から取得した。研究に先立ち、大阪歯科大学医の倫理委員会による承認（承認番号 110760）を得て実験を行った。ADSCs の採取方法は、コラゲナーゼ処理を行ったヒト頬脂肪体を、メッシュにて濾過後、遠心処理を行い、沈殿した細胞ペレットを再懸濁し回収した。細胞の同定には、フローサイトメトリーを用いて細胞表面抗原を確認した。ADSCs の軟骨分化誘導は、 3×10^4 cells/well の細胞数で細胞培養プレートに播種後、下記の 3 種類の培地中で最長 2 週間培養した。培地には、(1) 基本培地、(2) 既報の軟骨分化誘導培地、(3) Sr 含有軟骨分化誘導培地を用いた。含有させる Sr 濃度は、15 mM を最大濃度に設定した。各培地の軟骨分化誘導能は Alcian Blue 染色・定量法と定量 PCR 解析を用いて評価した。一方、Sr は骨再生領域で骨芽細胞誘導に用いられる。上記培養条件が軟骨細胞以外への細胞分化を促した可能性も危惧された。

従って、骨芽細胞、肥大軟骨細胞、脂肪細胞への分化マーカーの遺伝子発現も合わせて評価した。細胞毒性評価には、Cell counting kit-8 (Dojindo) を用いた。

Sr は濃度依存的に ADSCs の軟骨細胞分化を促進し、既報の軟骨分化誘導培地に比べ高い分化誘導を促した。Sr の濃度 15 mM までは顕著な細胞毒性は認められなかったものの、軟骨基質産生は 1.5 mM 近傍において最も増強された。一方、Sr による骨芽細胞、肥大軟骨細胞、脂肪細胞への分化誘導促進は認められなかった。

以上の結果から、Sr は ADSCs の軟骨細胞分化誘導因子として有用であることが分かった。軟骨分化誘導培地への Sr 添加は唇顎口蓋裂などの治療に求められる軟骨再生医療に向けた、ADSCs 由来軟骨細胞を調達するための有望な技術となり得ることが示唆された。

論文審査結果要旨

本研究では、ADSCs の効果的な軟骨分化誘導法の開発を目指し、Sr が ADSCs の軟骨分化に及ぼす影響を検討した。

実験に用いた ADSCs は、口腔外科手術時に切除されたヒト頬脂肪体から取得した。研究に先立ち、大阪歯科大学医の倫理委員会による承認（承認番号 110760）を得て実験を行った。ADSCs の採取方法は、コラゲナーゼ処理を行ったヒト頬脂肪体を、メッシュにて濾過後、遠心処理を行い、沈殿した細胞ペレットを再懸濁し回収した。細胞の同定には、フローサイトメトリーを用いて細胞表面抗原を確認した。ADSCs の軟骨分化誘導は、 3×10^4 cells/well の細胞数で細胞培養プレートに播種後、下記の 3 種類の培地中で最長 2 週間培養した。培地には、(1) 基本培地、(2) 既報の軟骨分化誘導培地、(3) Sr 含有軟骨分化誘導培地を用いた。含有させる Sr 濃度は、15 mM を最大濃度に設定した。各培地の軟骨分化誘導能は Alcian Blue 染色・定量法と定量 PCR 解析を用いて評価した。一方、Sr は骨再生領域で骨芽細胞誘導に用いられる。上記培養条件が軟骨細胞以外への細胞分化を促した可能性も危惧された。従って、骨芽細胞、肥大軟骨細胞、脂肪細胞への分化マーカーの遺伝子発現も合わせて評価した。細胞毒性評価には、Cell counting kit-8 (Dojindo) を用いた。

Sr は濃度依存的に ADSCs の軟骨細胞分化を促進し、既報の軟骨分化誘導培地に比べ高い分化誘導を促した。Sr の濃度 15 mM までは顕著な細胞毒性は認められなかったものの、軟骨基質産生は 1.5 mM 近傍において最も増強された。一方、Sr による骨芽細胞、肥大軟骨細胞、脂肪細胞への分化誘導促進は認められなかった。

以上の結果より、Sr は ADSCs の軟骨細胞分化誘導因子として有用であることが分かった。軟骨分化誘導培地への Sr 添加は唇顎口蓋裂などの治療に求められる軟骨再生医療に向けた、ADSCs 由来軟骨細胞を調達するための有望な技術となり得ることが示唆された。

以上のことから、ストロンチウムが脂肪由来幹細胞の軟骨分化誘導に及ぼす影響を明らかにした、この点について本論文は博士(歯学)の学位を授与するに値すると判定した。