

ふりがな氏名	にしお あきひろ 西尾 謙宏
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 763 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	Chondrocyte differentiation of human buccal fat pad-derived dedifferentiated fat cells and adipose stem cells using an atelocollagen sponge (アテロコラーゲンスポンジを用いたヒト頬脂肪体由来の脱分化脂肪細胞と脂肪幹細胞の軟骨分化)
学位論文掲載誌	Journal of Osaka Dental University 第 49 巻 第 2 号 平成 27 年 10 月
論文調査委員	主査 覚道 健治 教授 副査 田中 昭男 教授 副査 森田 章介 教授

論文内容要旨

唇顎口蓋裂などの先天性形態欠損や腫瘍の外科的除去に付随するものなどの軟骨欠損は顔面形態に影響を及ぼし、患者の QOL に大きな影響を及ぼす。近年、それらの処置法として注目されているのが軟骨細胞や間葉系幹細胞を播種した足場材料を用いるものである。そこで今回我々は、ヒト頬脂肪体 (hBFP) から分離した間葉系幹細胞である脱分化脂肪細胞 (DFATs) と脂肪幹細胞 (ASCs) をアテロコラーゲンスポンジに播種して 3 次元培養を行い、21 日間軟骨分化させたものを比較・検討した。

当科で外科手術を施行した患者の余剰な hBFP を採取した。PBS にて洗浄後、コラゲナーゼ処理を行い、ナイロンメッシュにて濾過した。次に、遠心分離にかけ、最上層に浮遊した成熟脂肪細胞と沈殿した細胞ペレット (SVF) とに分離させた。浮遊細胞を採取し天井培養により DFATs を調整し、SVF より通常培養により ASCs を調整した。さらに DFATs と ASCs を各々アテロコラーゲンゲルと混和し、約 50×10^4 個ずつアテロコラーゲンスポンジに細胞を播種し、軟骨分化誘導培地で 7、14 および 21 日間 3 次元培養した。その後、Real-time PCR (aggrecan, collagen type2, SOX9)、Western blotting (aggrecan)、Alcian blue 染色および免疫染色 (aggrecan) を行った。また、軟骨誘導前にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、ES 細胞マーカー (Nanog, Sox2, Oct4) を Real-time PCR にて測定した。統計解析には Mann-Whitney U-test を用いて、有意水準は 5% 以下とした。

天井培養により Flask の天井面に付着した細胞には細胞質の伸展、脂肪滴の縮小といった DFATs に特徴的な所見を認め、SVF を培養した細胞にも紡錘形の線維芽細胞様の形態の細胞を認めた。また、HE 染色によりアテロコラーゲンスポンジ全体にほぼ均一な細胞分布が確認され、培養後 7、14、21

日のいずれでも、Alcian blue 染色と免疫染色では軟骨細胞に陽性の所見を呈していた。さらに、Real-time PCR では3つのターゲット全てで培養後14, 21日間において、また、Western blotting では培養後7, 14, 21日間全てでDFATsがASCsより有意に高値であった。そして、ES細胞マーカーのReal-time PCRでも3つのターゲット全てでDFATsがASCsより有意に高値を示した。

hBFPを用いることには局所麻酔下にて行えることによる身体への負担が少ないことや、口腔内よりアプローチすることによる審美性の確保などの多くの利点がある。さらに、我々が用いたアテロコラーゲンスポンジは、整形性を備え、圧縮負荷にも耐える耐久性も備えている。今回、これらを用いた研究において、軟骨組織再生にはDFATsがASCsよりも優れていることが示された。その理由として、DFATsがASCsより純度の高い細胞であることやES細胞マーカーが高いことが関係していると考えられる。これらより、hBFP由来のDFATsが軟骨組織工学の理想的な細胞であるということが示唆された。

論文審査結果要旨

本論文はヒト頬脂肪体(hBFP)から分離した間葉系幹細胞である脱分化脂肪細胞(DFATs)と脂肪幹細胞(ASCs)をアテロコラーゲンスポンジに播種して3次元培養を行い、21日間軟骨分化させたものを比較・検討したものである。hBFPを用いることには局所麻酔下にて行えることによる身体への負担が少ないことや、口腔内よりアプローチすることによる審美性の確保などの多くの利点があること、臨床応用に有用な整形性や圧縮負荷にも耐える耐久性を備えたアテロコラーゲンスポンジを用いた3次元培養を行ったことなどが本論文の特徴である。さらに、これらを用いた今回の研究において、軟骨組織再生にはDFATsがASCsよりも優れていることが示されている。その理由として、DFATsがASCsより純度の高い細胞であることやES細胞マーカーが高いことが関係していると考えられるとされている。これらの結果や考察は、過去の論文にはみられない新規性を有している。

以上、hBFP由来のDFATsが軟骨組織工学の理想的な細胞であるということが示唆された点において、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。