

ふりがな氏名	かいだ こうじ 海田 浩治
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 774 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 11 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	Application of Green Tea Catechin for Inducing the Osteogenic Differentiation of Human Dedifferentiated Fat Cells <i>in Vitro</i> (ヒト脱分化脂肪細胞の骨芽細胞分化誘導にむけた <i>in vitro</i> での緑茶カテキンの応用)
学位論文掲載誌	International Journal of Molecular Sciences 第 16 巻 第 12 号 平成 27 年 12 月
論文調査委員	主査 馬場 俊輔 教授 副査 田中 昌博 教授 副査 今井 弘一 教授

論文内容要旨

脱分化脂肪細胞（Dedifferentiated fat cells: DFAT 細胞）は、採取制限の少ない脂肪組織を起源とし、間葉系幹細胞同様の多分化能を有するなど、骨再生治療領域での更なる応用が期待される細胞である。しかしながら、同細胞を高効率に骨芽細胞へと分化させる因子については解明の余地を残す。緑茶に多く含まれるカテキンの一成分であるエピガロカテキンガレート（EGCG）は、戦略的な局所薬剤徐放システム下で使用された場合、*in vivo* でも骨形成を促進する薬理効果を持つ。しかし、EGCG が DFAT 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響は、未だ明らかでない。

本論文では、DFAT 細胞の骨再生医療での更なる活用を視野に入れ、*in vitro* において EGCG が DFAT 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。

本研究は、大阪歯科大学医の倫理委員会(承認番号：110839)の承認を得て行われた。実験で用いたヒト DFAT 細胞は、口腔外科手術後に廃棄予定の脂肪組織から、天井培養法を用いて採取した。採取された細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地に牛胎児血清と抗菌薬を添加したコントロール培地内で維持された後、下記の実験に用いられた。同細胞は、48 well plate に 1×10^3 /well あるいは 3.5×10^4 /well で播種された後、EGCG (0-10 μ M)を加えた骨分化培地内で最長 12 日間培養された。骨分化培地には、コントロール培地に 50 μ M L-アスコルビン酸 2 リン酸, 10 mM β -グリセロホスフェートと、100 nM のデキサメタゾン (Dex) を含有・非含有させた培地の 2 種類を用いた。骨芽細胞への分化は、アルカリホスファターゼ染色, アリザリンレッド染色, 定量 PCR 法を用いて評価し, 細胞増殖能の測定には Cell counting kit-8 を用いた。また, EGCG による骨芽細胞分化誘導の機序を解明するため, 4 種類のシグナ

ル伝達経路(ERK1/2, AKT, p38-MAPK, JNK)の阻害剤を用いて阻害実験を行った。

DFAT 細胞の骨芽細胞分化・細胞増殖は、1.25 μM の EGCG を含有した Dex 非含有骨分化培地によって最も促進された。10 μM の EGCG を含有させた Dex 含有骨分化培地を用いた場合には顕著な細胞増殖抑制が認められた。阻害実験から、4 経路全てが DFAT 細胞の骨芽細胞分化誘導を介した石灰化物形成機序に関与している事が明らかとなった。

以上の結果から、Dex 非含有骨分化培地への適正量の EGCG 添加が DFAT 細胞の骨芽細胞分化・細胞増殖を最も促進させることが明らかとなった。DFAT 細胞と、適正量の EGCG を担持した生体材料の併用は、将来的に優れた骨形成能を発揮する治療法となると考えられる。

論文審査結果要旨

本論文では、DFAT 細胞の骨再生医療での更なる活用を視野に入れ、*in vitro* において EGCG が DFAT 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。

本研究は、大阪歯科大学医の倫理委員会(承認番号：110839)の承認を得て行われた。実験で用いたヒト DFAT 細胞は、口腔外科手術後に廃棄予定の脂肪組織から、天井培養法を用いて採取した。採取された細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地に牛胎児血清と抗菌薬を添加したコントロール培地内で維持された後、下記の実験に用いられた。同細胞は、48 well plate に $1 \times 10^3/\text{well}$ あるいは $3.5 \times 10^4/\text{well}$ で播種された後、EGCG (0-10 μM)を加えた骨分化培地内で最長 12 日間培養された。骨分化培地には、コントロール培地に 50 μM L-アスコルビン酸 2 リン酸、10 mM β -グリセロホスフェートと、100 nM のデキサメタゾン (Dex) を含有・非含有させた培地の 2 種類を用いた。骨芽細胞への分化は、アルカリホスファターゼ染色、アリザリンレッド染色、定量 PCR 法を用いて評価し、細胞増殖能の測定には Cell counting kit-8 を用いた。また、EGCG による骨芽細胞分化誘導の機序を解明するため、4 種類のシグナル伝達経路(ERK1/2, AKT, p38-MAPK, JNK)の阻害剤を用いて阻害実験を行った。

DFAT 細胞の骨芽細胞分化・細胞増殖は、1.25 μM の EGCG を含有した Dex 非含有骨分化培地によって最も促進された。10 μM の EGCG を含有させた Dex 含有骨分化培地を用いた場合には顕著な細胞増殖抑制が認められた。阻害実験から、4 経路全てが DFAT 細胞の骨芽細胞分化誘導を介した石灰化物形成機序に関与している事が明らかとなった。

以上の結果より、Dex 非含有骨分化培地への適正量の EGCG 添加が DFAT 細胞の骨芽細胞分化・細胞増殖を最も促進させることが明らかとなった。DFAT 細胞と、適正量の EGCG を担持した生体材料の併用は、将来的に優れた骨形成能を発揮する治療法となると考えられる。

以上のことから、適正量の EGCG が脂肪由来幹細胞の骨芽細胞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。