

ふりがな氏名	もりした あいこ 森下 愛子
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	乙 第1600号
学位授与の日付	平成27年9月18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	A histological study of mineralised tissue formation around implants with 3D culture of HMS0014 cells in Cellmatrix Type I-A collagen gel scaffold <i>in vitro</i> (Cellmatrix Type I-A コラーゲングルスキャホールド内でインプラント体とともに三次元培養した HMS0014 細胞の硬組織形成に関する組織学的研究)
学位論文掲載誌	Okajimas Folia Anatomica Japonica 第91巻 第3号 平成26年11月20日
論文調査委員	主査 今井 弘一 教授 副査 松本 尚之 教授 副査 隈部 俊二 大学院准教授

論文内容要旨

歯科インプラント治療には、インプラント体に対する機能的なオッセオインテグレーションの獲得が重要な鍵となっている。我々は以前の研究で、骨欠損部位に対する骨誘導再生法を応用したインプラント治療のための基礎研究として、*in vitro*においてコラーゲングルを生体吸収性のスキャホールドとし、ヒト骨由来 HMS0014 間葉系幹細胞とチタンインプラント体を包埋して三次元培養を行った。その結果、誘導条件下で間葉系幹細胞は骨芽細胞様細胞に分化し、インプラント体表面にセメントラインを形成した後、コンタクトオステオゲネシスに相当する硬組織形成と、周囲のコラーゲングル中にディスタントオステオゲネシスに相当する石灰化を確認した。今回の研究において、我々は骨誘導再生法によって作られた組織におけるヒト骨由来間葉系幹細胞の運命と寄与について、*in vitro*において明らかにすることを目指して実験を行った。実験群は、コラーゲングルにヒト骨由来 HMS0014 間葉系幹細胞を混和し、その中にチタンインプラント体を包埋して、骨芽細胞への誘導条件下で三次元培養した。経時的にインプラント体を周囲のスキャホールドとともに取り出し、レジン包埋し、研磨標本作製したのち光学顕微鏡で観察した。同時にインプラント体周囲のスキャホールドをインプラント体から切り離した後、通法によりエポン包埋し、超薄切片を作製して、透過型電子顕微鏡で観察した。更に、凍結切片を作製し、オートファジーのマーカである LC3 と、ギャップジャンクションのマーカである Cx43 の発現を免疫組織化学的に観察した。対照群としては非誘導条件下でコラーゲン三次元培養した試料を用いた。

その結果、実験3日の対照群において間葉系幹細胞は未成熟な型を示しており、LC3 と Cx43 の発現

は認められなかった。それに対し、実験群においては(1) 実験3日および7日では間葉系幹細胞は骨芽細胞様細胞に分化し、コラーゲン細線維の分泌と基質小胞の分泌が認められ、コラーゲン細線維を介する石灰化と、コラーゲンゲルのスキャホールドの網状構造に関連する石灰化塊の形成が認められた。また、細胞内の小胞輸送機構および細胞間結合が確認された。(2) 実験14日では細胞周囲にコラーゲン細線維の集積の増加、コラーゲン細線維を介する石灰化の増加、コラーゲンゲルスキャホールドに関連する石灰化塊の増加が認められた。(3) 実験21日では細胞はオートファジー変性の最終段階を示す形態に変化しており、細胞周囲にはコラーゲンゲル由来のコラーゲン細線維はほとんど確認できなくなった。尚、LC3とCx43は実験3日から継続して発現が認められた。

本研究は骨誘導再生法を *in vitro* でシミュレーションしたものといえるが、骨芽細胞様の HMS0014 間葉系幹細胞は歯科インプラント体のオッセオインテグレーション獲得に働くとともに、インプラント体周囲の細胞外基質のターンオーバーばかりでなく、細胞自身のターンオーバーも調節していることが示唆された。骨欠損のあるインプラント治療への生体吸収性スキャホールドの応用の可能性が期待される。

論文審査結果要旨

本研究はコラーゲンゲルをスキャホールドとしてヒト骨由来間葉系幹細胞である HMS0014 細胞を三次元培養し、その中にチタンインプラント体を包埋した際にインプラント体周囲に形成された組織における細胞および細胞外基質の経時的変化について組織学的に検討したものである。

コラーゲンゲルにヒト骨由来 HMS0014 間葉系幹細胞を混和し、その中にチタンインプラント体を包埋して、骨芽細胞への誘導条件下で三次元培養した。経時的にインプラント体周囲のスキャホールドをインプラント体から切り離した後、通法によりエポン包埋し、超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡で観察した。更に、凍結切片を作製し、オートファジーのマーカーである LC3 と、ギャップジャンクションのマーカーである Cx43 の発現を免疫組織化学的に観察した。

実験の結果、(1) 実験3日および7日では間葉系幹細胞は骨芽細胞様細胞に分化し、コラーゲン細線維の分泌と基質小胞の分泌が認められ、コラーゲン細線維を介する石灰化と、コラーゲンゲルのスキャホールドの網状構造に関連する石灰化塊の形成が認められた。また、細胞内の小胞輸送機構および細胞間結合が確認された。(2) 実験14日では細胞周囲にコラーゲン細線維の集積の増加、コラーゲン細線維を介する石灰化の増加、コラーゲンゲルスキャホールドに関連する石灰化塊の増加が認められた。(3) 実験21日では細胞はオートファジー変性の最終段階を示す形態に変化しており、細胞周囲にはコラーゲンゲル由来のコラーゲン細線維はほとんど確認できなくなった。また、LC3とCx43は実験3日から継続して発現が認められた。

本研究は骨誘導再生法を *in vitro* でシミュレーションしたものといえるが、以上の結果から、骨芽細胞様細胞に分化したヒト骨由来間葉系幹細胞は生体吸収性コラーゲンゲルの中で、細胞間で情報交換しながら、骨様組織の形成および細胞間基質の更新に働くとともに、細胞自身もオートファジー変性を起こすことにより、新しい細胞へと交替して行く可能性が示唆された。

本論文は、今まで研究が進んでいなかった、生体吸収性コラーゲンゲル内でのヒト骨由来間葉系幹細胞と細胞間基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、合格と認定した。