

## 論文の内容の要旨

氏名：秋 田 大 輔

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose-derived stromal cells in combination with PLGA-based solid scaffolds

（脂肪組織由来間質細胞と DL-乳酸-グリコール酸共重合体による歯周組織の再生）

歯周炎、外傷など種々の原因で破壊された歯槽骨ならびに歯根膜の再生には、人工骨移植や組織再生誘導法が用いられ、また、エナメルマトリックスタンパクや多血小板血漿を併用した療法も行われているが、適応や効果は限定的であると言わざるを得ない。

近年、生体材料と組み合わせた間葉系幹細胞移植治療が歯周組織再生の効果向上に有望視されている。これは、歯周組織再生医療に有効で生体親和性と安全性に優れた担体として乳酸-グリコール酸共重合体を基材とする担体（以下 PLGA scaffold）が開発されたことが一因である。しかし、その効果に関する報告は未だ十分でない。一方、脂肪組織由来の間質細胞群（以下 ASCs）は、骨髄由来間葉系幹細胞と同様の多分化能を示し、脂肪組織が骨髄より採取に有利な部位であることから、再生医療用の移植細胞源としての ASCs には注目が集まっている。

そこで、本研究では、9 週齢の近交系 F344 雄性ラット(n=14)と 8 週齢の非近交系 SD 雄性ラット(n=10)を用い、ラット ASCs と PLGA scaffold の複合体が示す歯周組織再生能についての検討を行った。

まず、F344 ラット(n=4)および SD ラット(n=4)の鼠径部皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理後、低速度遠心分離を行って ASCs を得た。この ASCs を 2-3 継代、通法どおり培養した後、脂肪細胞、軟骨細胞あるいは骨芽細胞への分化誘導培地で最大 21 日間培養し、Oil-Red O、Alcian Blue および Alizarin Red 染色性、Alkaline phosphatase(ALP)活性、カルシウム沈着量などを指標に分化能の有無を検討した。一方、移植実験では、F344 ラット(n=8)および SD ラット(n=6)を用いて、これらの左側下顎臼歯部頰側に麻酔下で作製した歯周組織欠損(縦 2mm×横 3mm×深さ 1mm)に、ASCs を播種した PLGA scaffold あるいは PLGA scaffold のみを移植した。前者・実験群(ASCs/PLGA 群)と後者・対照群(PLGA 群)で、0, 1, 2 および 5 週における骨の再生状況について、*in vivo* micro-CT を用いた観察を行った。また、得られた CT データをもとに、データ解析ソフトを用いて、欠損部の骨再生量を定量化した。5 週経過後のラットは、通法どおり、固定、脱灰、パラフィン包埋を行って薄切し、前頭面断あるいは水平面断の組織切片標本とした。これらは、欠損部の骨再生像観察用および再生セメント質や歯根膜の厚み計測用とした。また、一部の切片では、Picrosirius 染色を施して偏光顕微鏡による線維成分の観察も行った。なお、F344 ラット(n=2)由来 ASCs の一部は、蛍光色素 DiI によるラベリングを行った後に ASCs/PLGA 群と同様に移植し、2 週経過後に固定、脱灰し、凍結切片を作製して蛍光観察を行った。

これら一連の観察や実験的検討により、次のような結果が得られた。

1. ラット鼠径部皮下脂肪組織から採取した ASCs は、脂肪細胞への分化誘導の結果、培養 21 日目に Oil-Red O 陽性の脂肪滴を有する細胞が観察された。軟骨細胞への分化誘導の結果、培養 21 日目に Alcian Blue 陽性の細胞外マトリックスが観察された。骨芽細胞への分化誘導の結果、培養 3 日目に ALP 活性の増加がみられ、培養 21 日目までには Alizarin Red 陽性の石灰化物が出現した。定量解析の結果、骨芽細胞分化誘導群において検出されたカルシウム量は、非誘導群よりも有意に高かった。
2. 移植を行った ASCs/PLGA 群および PLGA 群では、CT による経日的観察の結果、歯根吸収や骨性癒着は観察されず、欠損部に硬組織形成が生じていることが明瞭に観察された。定量解析の結果、F344 および SD いずれに由来する ASCs を用いた場合でも、ASCs/PLGA 群における硬組織再生量は、移植後経日的に増加し、5 週経過後においては PLGA 群よりも有意に高かった。なお、こうした ASCs/PLGA 群と PLGA 群との差異は、近交系 F344 ラット由来の ASCs、非近交系 SD ラット由来の ASCs のいずれでも同様に観察された。
3. 組織学的には、ASCs/PLGA 群と PLGA 群のいずれにおいても、移植部には新生骨組織がみられ、また、欠損調製時に露出した象牙質面上にセメント質様硬組織の形成も認められた。Picrosirius 染色標本の偏

光像では、再生した骨面およびセメント質様硬組織にコラーゲン線維の埋入が認められ、ASCs/PLGA 群における線維束が PLGA 群よりも太い傾向があるように思われた。組織形態計測の結果、セメント質様硬組織は、歯頸側よりも根尖側で厚い傾向があり、ASCs/PLGA 群では PLGA 群よりも有意に厚かった。歯根膜も、歯頸側よりも根尖側で厚い傾向があったが、ASCs/PLGA 群と PLGA 群とで有意差が認められたのは、歯頸側および歯根中央付近のみであった。

4. DiI ラベリングを行った ASCs/PLGA 群では、移植 2 週経過後において、蛍光標識された細胞が主に歯根膜組織中に散在性に認められた。

以上の結果は、歯周組織欠損部への ASCs/PLGA 複合体の移植は、PLGA 担体が歯周組織の再生の場を確保し、多分化能を示す細胞を含んだ ASCs が、歯槽骨、セメント質様硬組織および線維性の歯根膜組織の再生において促進的に作用することを示唆している。したがって、ASCs/PLGA 複合体移植は、歯周炎、外傷など種々の原因で破壊された歯周組織再建に有効な新たな再生療法として有望だと考えられる。