

論文の内容の要旨

氏名：枝 卓 志

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ラット頭蓋骨骨膜挙上モデルにおける骨形成に関する研究

-ヒト歯嚢由来細胞および plasma rich in growth factors の移植について-

(Study of bone formation using periosteal elevation model on rat calvaria

-transplantation of human dental follicle cells and plasma rich in growth factors-)

口腔外科領域において、種々の原因で顎骨欠損が生じ、骨造成が必要な場合には、自家骨、他家骨および人工材料を用いた骨造成が行われている。自家骨を用いる際の骨採取部位への手術侵襲、他家骨および人工材料を用いる際の合併症などを考慮し、患者自身から採取可能な細胞や血液を用いた、再生医療が注目されている。

歯科治療の際に破棄される組織である歯嚢には、未分化間葉系幹細胞が存在し、歯嚢から分離したヒト歯嚢細胞 (human dental follicle cells; hDFC) は、骨芽細胞誘導培地 (osteogenic induced medium; OIM) で培養すると石灰化することが報告されている。従来、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導する際には、培地中に dexamethasone (DEX) の添加が必要とされるが、hDFC は *in vitro* にて DEX を含まない OIM [OIM (D-)] で培養しても骨芽細胞に分化すると報告されている。本研究は、OIM (D-) で培養した hDFC の骨形成効果を検討するため、ラット頭頂骨上に hDFC を移植したときの新生骨形成への影響を組織学的および免疫組織化学的に観察するとともに、Micro-CT を用いて骨梁構造の解析および計測を行った。

再生医療に用いる自家移植材料として、患者から採取した血液を遠心分離して作製する濃縮血小板血漿が臨床応用されている。濃縮血小板血漿の一つである Plasma rich in growth factors (PRGF) は、血小板の濃縮を調製するための方法や遠心分離機が規格・統一化されており、一回の遠心分離で血漿ならびに血小板成分のみを抽出することが可能で、白血球を含まない特徴を有する。さらに PRGF は、新生骨形成に関連する TGF- β 及び VEGF のような増殖因子と、細胞接着に必要な足場となるフィブリンを多く含むため、骨再生および迅速な軟組織の治癒の促進が認められている。本研究では、PRGF の骨形成能を検討するために、ラット頭頂骨上に PRGF を移植し、骨形成を経時的に組織学的および免疫組織化学的に観察するとともに、Micro-CT を用いて骨梁構造の解析および計測を行った。

本研究により、以下の結果を得た。

- 1) hDFC をラット頭頂骨上へ移植すると、組織学的所見として移植後 4 週目に両群ともに新生骨が観察された。OIM (D-) 群は GM 群と比較して、広範囲の新生骨が形成された。また両群ともに、新生骨周囲の結合組織には拡張した毛細血管が認められ、新生骨辺縁には骨芽細胞の配列が観察された。
- 2) 免疫組織化学的所見では、hDFC 移植後 4 週目において両群ともに BMP-2、Runx2 および Osterix 陽性反応が、結合組織内の新生骨辺縁に配列した骨芽細胞で観察された。VEGF は、両群ともに血管内皮細胞および新生骨辺縁に配列した骨芽細胞で陽性反応を認めた。
- 3) hDFC 移植後 4 週目、Micro-CT による骨梁構造の解析後、BMD 値を擬似カラーで 3D 画像表示したところ、GM 群および OIM (D-) 群ともに頭頂骨側から新生骨形成を認め、GM 群と比較して、OIM (D-) 群は広範囲に新生骨の形成が観察された。また、骨梁構造計測では、OIM (D-) 群は GM 群と比較して計測した全ての値において高値を示した。
- 4) 組織学的所見にて術後 2 週目において、対照群ではほとんど新生骨の形成を認めなかったが、PRGF 群では骨膜と頭頂骨の間で新生骨の形成を認めた。術後 8 週目において PRGF 群は、対照群と比べて、広範囲に新生骨の形成が観察された。
- 5) 免疫組織化学的所見では、術後 2 週目にて、Runx2 と Osterix は対照群では頭頂骨辺縁に骨芽細胞に陽性所見を認め、PRGF 群では新生骨内の骨芽細胞で陽性所見が観察された。Bone Alkaline Phosphatase (BAP) お

よび Osteocalcin は、PRGF 群の新生骨辺縁の骨芽細胞および新生骨内の骨芽細胞で陽性所見を認め、対照群では認められなかった。術後 8 週目の免疫組織化学的所見では、Runx2, Osterix, BAP および Osteocalcin は両群において陽性反応を骨芽細胞に認めた。

6) Micro-CT による骨梁構造の解析および計測を行い、BMD 値を擬似カラーで 3D 画像表示したところ、術後 2 週目では PRGF 群において頭頂骨上に新生骨形成を認めた。術後 8 週目では、術後 2 週目と比較して両群とも新生骨の形成範囲は増加した。術後 8 週目において PRGF 群は対照群より広い範囲で新生骨形成を認めた。骨梁構造計測では、術後 2 週目において BMD, BMC, および BV の値は両群間で有意な差はないものの、PRGF 群で高い傾向を示した。術後 8 週目において、BMC および BV で PRGF 群が対照群より有意に高値を示した。

以上の結果より、DEX を含まない OIM で培養した hDFC は、ラット頭頂骨上に移植すると骨形成を促進させることから、歯嚢は再生医療の細胞供給源として有用であることが示唆された。また、PRGF は骨再生において増殖因子を多く含む細胞接着の足場として有用な自家移植材料であることが示唆された。