

論文の内容の要旨

氏名：岡田 仁 恵

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ヒト歯嚢由来細胞の骨形成能および骨芽細胞分化における PRGF の影響

(Bone formation ability and effect of PRGF on osteogenic differentiation of human dental follicle cells)

歯嚢は、神経堤の外胚葉性間葉由来の結合組織で、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; hDFCs) 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、hDFCs 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。hDFCs は、骨芽細胞 / セメント芽細胞以外にも脂肪細胞や神経細胞にも分化すること、また、幹細胞マーカーである Notch-1, STRO-1 などの幹細胞マーカーや、CD29, CD44 などの間葉系細胞マーカーが発現することから、ヒト未分化間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells; hMSCs) と類似した性質を有していると考えられる。さらに、hDFCs は hMSCs と比較して、細胞増殖能が優れているとの報告もある。そのため、hDFCs は、骨再生医療の細胞源としてだけでなく、石灰化機序研究用の体性幹細胞としても有用ではないかと示唆される。さらに、歯嚢は歯科治療の過程で破棄される組織であり、新たに生体侵襲を加えることなく再生医療用の細胞を採取することが可能であるため、患者の負担が軽減できる。

本研究では、OIM (D-) で培養した hDFCs を生体内へ移植した時の新生骨形成能を検討することとした。hDFCs を GM または OIM (D-) で三次元培養し、ラット頭頂骨上へ移植したときの、新生骨形成への影響を Micro-CT を用いて骨梁構造の解析および計測を行うとともに、組織学的および免疫組織化学的に観察を行った。

近年、自己血から分離した血漿を再生医療に用いられるようになった。血小板を濃縮した血漿 (濃縮血小板血漿) の一つである Plasma rich in growth factors (PRGF) は、血小板の濃縮を調整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。PRGF は、骨形成や骨芽細胞分化促進に関与する TGF- β 及び VEGF のような増殖因子を高濃度に含むことが報告され、臨床的には、骨形成の促進や骨増生を図る目的で、インプラント周囲へ PRGF の埋入が行われている。しかし PRGF の骨形成能の基礎的研究は少ない。

本研究では、PRGF の骨形成能を検討することを目的に、hDFCs の石灰化過程ならびに、骨芽細胞分化における PRGF の影響を検討した。

1) hDFCs 移植後 28 日目において、Micro-CT 画像分析から BMD 値を疑似カラーで 3D 画像表示したところ、OIM (D-) 群は GM 群と比較して、より広範囲に新生骨の形成が観察された。また骨梁構造計測を行ったところ、BMD, BMC, および BV など全てにおいて高値を示した。

2) hDFCs をラット頭頂骨上へ移植すると、組織学的所見にて移植後 28 日目において両群ともに新生骨を認めたが、OIM (D-) 群は GM 群と比較して、広範囲に新生骨の形成が観察された。

3) hDFCs 移植後 28 日目において、OIM (D-) 群, GM 群ともに BMP2, Runx2, Osterix および VEGF の陽性所見を認めた。

4) PRGF F2 は全血と比べ、血小板を約 2 倍含んでいた。PRGF, 血清は白血球を含んでいなかった。

5) 増殖因子の濃度は、4 人のボランティアによって個体差を認めた。

6) IGF- I 濃度は、血清, PRGF F1, PRGF F2 で大きな差は認めなかった。TGF- β 濃度は PRGF F1, 血清と比べて PRGF F2 は高値を示した。PDGF-AB, -BB, VEGF 濃度は、PRGF F2 および血清に比べ PRGF F1 は低い値であった。

7) OIM (D-) に PRGF を添加した培地 [OIM (D-) -PRGF] で hDFCs の培養を行うと、OIM (D-) に FBS を添加した培地 [OIM (D-) -FBS] に比べ細胞数の増加を認めた。

8) OIM (D-) -PRGF で培養した hDFCs は OIM (D-) -FBS (10%) と比べ、遊走している細胞を多く認めた。

9) OIM (D-) -PRGF で培養した hDFCs は OIM (D-) -FBS に比べ, BMP2, BMP4, TGF- β , OMD, Type I collagen, および ALP の遺伝子発現量上昇が高かった.

以上の結果より, OIM (D-) で培養した hDFCs 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 存在下では, hDFCs の細胞増殖および細胞遊走の亢進, 骨形成関連遺伝子の発現上昇が明らかとなった. よって, PRGF は hDFCs の石灰化過程ならびに, 骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された.