

論文審査の結果の要旨

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)

審査委員：（主査） 日本大学教授 博士（理学） 吉垣 純子

（副査） 日本大学教授 博士（歯学） 久山 佳代

（副査） 日本大学教授 歯学博士 近藤 壽郎

歯嚢組織には未分化間葉系幹細胞が存在し、ヒト歯嚢から分離したヒト歯嚢由来細胞（human dental follicle cells: hDFCs）は、骨芽細胞分化誘導培地（osteogenic induction 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、石灰化すると報告されている。副作用の多い DEX 非存在下でも石灰化する 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ている。一方、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は、再生医療に用いる自家移植材料として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、白血球を含まず、TGF- β や VEGF のような骨形成に関与する増殖因子を多く含むと報告されている。

著者は、OIM (D-) を用いて 3 次元培養した hDFCs をラット頭頂骨上に移植し、新生骨形成の検討を行った。さらに、hDFCs の培養系を用いて、PRGF が石灰化 / 骨芽細胞分化に与える影響について検討を行い、以下の結果を得た。

- 1) hDFCs をラット頭頂骨上へ移植後 28 日目、Micro-CT の画像分析にて、OIM (D-) 群は増殖培地（Mesenchymal stem cell growth medium: GM）群と比較してより多くの新生骨を認め、BMD, BMC, 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、組織学的所見として移植後 28 日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、広範囲に新生骨が形成された。また両群ともに、新生骨辺縁には骨芽細胞様細胞の配列が観察された。
- 3) hDFCs をラット頭頂骨上へ移植後 28 日目、免疫組織化学的所見において、両群ともに BMP2, Runx2, および Osterix の陽性反応が、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.

- 4) PRGF F2 は全血と比べ, 血小板を 2 倍含んでいた. PRGF, 血清は白血球を含んでいなかった.
- 5) TGF- β 量は, PRGF F2 で F1, 血清と比べて高値を示した. また増殖因子の濃度は, 4 人のボランティアによって個体差を認めた.
- 6) OIM (D-) -PRGF で hDFCs の培養を行うと, OIM (D-) -FBS に比べ細胞数の増加を認めた.
- 7) OIM (D-) -PRGF (10%) で培養した hDFCs は OIM (D-) -FBS と比べ, 遊走している細胞を多く認めた.
- 8) OIM (D-) -PRGF で培養した hDFCs では, OIM (D-) -FBS で培養した hDFCs と比べ, BMP2, BMP4, TGF- β , OMD, Type I collagen, および ALP の遺伝子発現の上昇が認められた.

本論文は, OIM (D-) で培養した hDFCs をラット頭頂骨上に移植すると骨形成が促進したことから, 歯嚢は骨再生医療の細胞供給源候補としての可能性を明らかにしたと同時に, PRGF の骨再生医療用材料としての有用性を明らかにした. これらの結果は, 今後の骨再生医療に貢献するものと考えられる.

よって, 本論文の著者は, 博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる.

以 上

平成 28 年 2 月 25 日