

別記様式第6号（第16条第3項，第25条第3項関係）

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	中島 健吾
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
ヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞、ヒト永久歯歯髓由来間葉系幹細胞およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞における骨再生能の比較検討			
論文審査担当者			
主査教授 加藤 功一		印	
審査委員 教授 栗原 英見			
審査委員 教授 香西 克之			
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>顎裂部閉鎖治療として自家腸骨海綿骨移植が広く行われている。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は小さくなく、合併症として、外側大腿皮神経損傷、3ヶ月以上継続する疼痛、術後疼痛に伴う歩行障害などが報告されている。これらは、学童期である患者にとって大きな負担となるため、申請者の所属する診療科では、外科的侵襲を回避しながら、骨再生を達成する方法が模索されてきた。その結果、ビーグル犬顎裂モデルを用いて骨髄由来間葉系幹細胞（BMSCs）移植による顎骨再生を達成し、再生部位への歯の移動が可能であることが明らかになった。しかしながら、骨髄液を採取するには、骨髄穿刺が必要であり、患者の負担を十分に軽減したとは言えない。そこで、本論文では、2000年に永久歯歯髓より単離に成功したヒト永久歯歯髓由来間葉系幹細胞（human dental pulp stem cells; hDPSCs）および2003年に乳歯歯髓より単離に成功した乳歯歯髓由来間葉系幹細胞（stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED）に着目した。これらは、human BMSCs（hBMSCs）と比較して採取が容易であるため、その有用性が期待されている。</p> <p>以上の背景より、本研究においては、SHEDおよびhDPSCsの生体内における骨再生能をhBMSCsのそれと比較することを目的とした。当院通院中の患者より矯正歯科治療のため抜去された乳歯および永久歯を採取し、SHEDおよびhDPSCsを単離培養した。それらが幹細胞の性質を有しているかを調べるため、骨・軟骨・脂肪への分化培養を行った。また、フローサイトメトリーにより、幹細胞マーカーとして知られる表面抗原について解析した。一方、SHEDおよびhDPSCsの増殖能、骨分化能をin vitroにおいて調べ、hBMSCsと比較した。さらに、SHEDおよびhDPSCsの生体内における骨再生能を評価するため、6週齢免疫不全マウスの頭頂骨に骨欠損を作製し、SHED、hDPSCsおよびhBMSCsを播種したPLGAメンブレンを移植した。一方、メンブレンの移植のみを行ったものを対照群とした。移植12週後にMicro CTを撮影し、再生骨体積率を算出し比較した。組織学的検討を行うため屠殺後に脱灰・固定をした後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン染色およびマッソントリクローム染色により、骨欠損部面積に対する、scaffoldの残存面積率およびコラーゲン線維および類骨の面積率を算出した。</p> <p>分化培養の後、分化マーカーを蛍光免疫染色した結果、本研究で単離したSHEDおよびhDPSCsは骨分化能、軟骨分化能および脂肪分化能を有していることが示された。フローサイトメトリー分析の結果、それらの細胞は、CD29、CD44、CD73、CD105、CD146、STRO-1の全てにおいて陽性を示すことがわかった。これらの結果より、乳歯、永久歯より単離した細胞は、SHEDおよびhDPSCsであることが確認された。また、増殖能の比較においては、SEHDがhDPSCsおよびBMSCsより高い増殖能を有していることがわかった。骨分化能については、hBMSCsがSEHDおよびhDPSCsと比較して高い骨分化能を有していることが明らかとなった。動物実験による検討において、再生骨体積率はSHEDを移植した群が最も高い値を示したが、有意差は認められなかった。組織学的検討において、scaffoldの残存面積率には、各群において有意な差は認められなかったが、コラーゲン線維および類骨の面積率において、SHEDを移植した群が他と比較して有意に大きな値を示した。以上のことから本研究において単離したSHEDは、hDPSCs</p>			

および hBMSCs と比較して増殖能は高いことが示唆された。さらに生体内における骨再生能は、SHED は、hDPSCs および hBMSCs と同程度もしくは、それ以上であることが明らかとなった。

以上の結果から、SHED は、細胞採取時の生体侵襲が低いことを考慮すると、口蓋裂顎裂部骨再生治療の細胞源として有用であると考えられる。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	中島 健吾
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
ヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞、ヒト永久歯歯髓由来間葉系幹細胞およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞における骨再生能の比較検討			
最終試験担当者			
主査教授 加藤 功一		印	
審査委員 教授 栗原 英見			
審査委員 教授 香西 克之			
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年11月15日の第5回広島大学研究会発表会（歯学）および平成30年2月2日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 採取時期、う蝕の有無、前歯／臼歯の違い等が SHED の採取成功率に及ぼす影響について</li> <li>2 細胞治療に使用できる細胞の種類について</li> <li>3 社会的、倫理的、医療経済的観点における SHED の利点欠点について</li> <li>4 自家移植である SHED 移植と同種移植の比較について</li> <li>5 顎裂の再生治療に必要な細胞数について</li> <li>6 細胞採取後の加工と骨再生の効果について</li> <li>7 本研究で使用した3種類の細胞の不均質性について</li> <li>8 本研究で示された SHED の増殖能の高さ以外の利点について</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容および関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			