

氏名	千原 隆弘
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第198号
学位授与の日付	2015年3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	培養骨の骨形成過程におけるステロイド系抗炎症薬の影響
指導教員	(主) 教授 各務 秀明 (副) 教授 長谷川 博雅 (副) 教授 宇田川 信之
論文審査委員	主査 教授 中村 浩彰 副査 教授 吉成 伸夫 副査 教授 大須賀 直人

## 学位論文の内容の要旨

### 【目的】

皮質骨由来の細胞を *in vitro* で骨芽細胞系細胞に分化誘導し、*in vivo* 移植による骨再生モデルを確立するとともに、局所の炎症が骨再生に与える影響を検討するために、抗炎症作用を持つステロイドを投与して組織学的に検討した。

### 【材料・方法】

マウスの大腿骨、脛骨の皮質骨から細胞を採取し、接着性細胞について細胞表面マーカー発現を FACS 解析した。また、得られた細胞を BMP2 含有骨誘導培地にて 14 日間培養し、アルカリホスファターゼ活性を指標に骨芽細胞系細胞への分化能を検討した。*in vivo* 実験として、 $\beta$ -TCP 顆粒と皮質骨由来細胞と培養後、マウスの背部皮下に移植し、骨再生能を形態学的に検討した。さらに、炎症が骨再生に与える影響を明らかにするために、抗炎症作用を持つベタメタゾリン酸エステルナトリウムを投与し、移植後 3, 7, 28 日後に試料を採取して、HE 染色、TRAP 染色、免疫染色 (F4/80, TNF- $\alpha$ , Sp7) により組織学的に観察した。

### 【結果】

皮質骨由来の接着性細胞は間葉系幹細胞のマーカーである CD29, CD105, Sca-1 を発現していた。この細胞は BMP2 を含む骨誘導培地で培養するとアルカリホスファターゼ活性が上昇し、骨芽細胞系細胞に分化することがわかった。 $\beta$ -TCP を担体とした移植実験により、ステロイド系抗炎症薬の投与群では、移植 3 日目においてマクロファージの浸潤がコントロール群に比べ少なかったが、7 日目以降は差がみられなかった。TRAP 陽性破骨細胞は移植後 7 日目ではステロイド投与群において多い傾向を示したが、28 日目にはコントロール群と同様であった。Sp7 陽性骨芽細胞は移植後 3 日目からステロイド投与群とコントロール群で認められ、両群において差は見られなかった。また、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  陽性細胞の分布についてもステロイド投与群とコントロール群で差はなく、TNF- $\alpha$  発現は real-time PCR でも同様の傾向を示した。

### 【考察】

マウス下腿皮質骨由来の細胞は、間葉系幹細胞のマーカーを発現し、骨誘導培地で培養すると骨芽細胞系細胞へ分化することがわかった。また、 $\beta$ -TCP を担体としてマウスに移植すると骨形成が生じることから、皮質骨由来細胞を用いた *in vivo* での骨

再生モデルを確立することができた。移植後短期間のステロイド系抗炎症薬投与により初期の炎症を抑制すると、マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤が軽減されるが、移植後 28 日では骨芽細胞や破骨細胞の分布には差が見られなかった。移植部位における炎症が骨再生を抑制するという報告があるものの、本研究においては抗炎症系ステロイド投与が骨再生に与える影響については明らかではなく、骨再生治療の実用化に向けて、臨床的に有用な投与量や投与方法を検討する必要がある。

## 学位論文審査の結果の要旨

学位申請論文は、細胞療法による骨再生における炎症の影響を明らかにする目的で、マウス皮質骨由来細胞と・-TCP を移植し、ステロイド系抗炎症薬投与により炎症を抑制した際の、骨再生に対する影響を形態学的に検討したものである。

皮質骨由来細胞は増殖も安定しており、間葉系幹細胞のマーカーを発現していることが FACS 解析により明らかとなった。また、BMP2 を含む骨誘導培地で培養すると、アルカリホスファターゼ活性が上昇し、骨芽細胞系細胞の特徴を示すことがわかった。この細胞を・-TCP とともに移植すると、Sp7 陽性骨芽細胞や TRAP 陽性破骨細胞が出現し、骨形成と骨リモデリングが生じることが示された。ステロイド系抗炎症薬投与は移植初期の炎症を抑制するが、移植 28 日目では骨芽細胞と破骨細胞の分布には非投与群と差が認められなかった。著者は、ステロイド系抗炎症薬の投与量や投与方法を改善することにより、骨再生に有効な方法を検討する必要があると結論づけている。

本論文は、その手法、得られた結果から導いた考察とその結論はいずれも適切で、皮質骨由来細胞の有用性と抗炎症薬の応用の可能性を示唆しており、骨再生のための細胞療法の開発のために価値のある手法を提起するものである。また、臨床を踏まえた基礎的研究として学術的にも重要なものであり、発展性、将来性においても優れた論文である。

以上から、本論文が博士(歯学)の学位論文に値すると評価した。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文について、研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄および研究成果の今後の展開などについて、口答による試験を行った。

質問事項は、次のとおりである。

- 9) 炎症性細胞について
  - 1 0) ステロイド系抗炎症薬の作用機序について
  - 1 1) 骨髄間質細胞と皮質骨由来細胞の違いについて
  - 1 2) 骨形成にはステロイドの投与量と投与方法のどちらが影響を与えると考えられるか
  - 1 3) 骨形成と骨再生の用語としての違いについて
  - 1 4) 皮質骨由来細胞は生体ではどこに存在するのか
  - 1 5) メスの皮質骨由来細胞をオスに移植した理由について
  - 1 6) 皮質骨由来細胞の骨芽細胞系細胞へ分化には、デキサメサゾンと BMP の両方が必要であるのか
  - 1 7) 移植後 3, 7, 28 日に組織観察した理由について

質問事項に対し文献的知識を踏まえて、適切な回答があり、その説明は論理的で説得力があった。また、申請者は本研究に用いた細胞培養法、細胞生物学的手法、形態学的手法を習得しており、博士課程修了者として再生歯科医学の発展性、将来性についての見識を有していると判断した。

以上により、本審査会は本申請者が博士（歯学）として十分な学力および見識を有するものと認定し、最終試験を合格と判定した。