

氏名	角谷 宏一
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6367号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	細胞由来ナノフラグメントを用いた初期海綿骨形成の再現
論文審査委員	上岡 寛 教授 西田 崇 准教授 島田 康史 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

人間の体を支持する骨組織は、リン酸カルシウムを主体とした無機成分とコラーゲンなどの有機成分により構成される。骨組織は構造内の骨細胞をはじめとして、骨芽細胞および破骨細胞など種々の細胞によって形態および機能が維持されており、それらの相互作用により絶えず変化する複雑な組織である。骨組織はその構造から、外層を覆う皮質骨と複雑な多孔構造を呈する海綿骨に分類される。特に海綿骨はその特徴的な多孔構造から、造血幹細胞をはじめとした幹細胞ニッチェや悪性腫瘍の骨転移など、生命活動において重要な役割を担うことが知られている。これらのことから、海綿骨特有の組成や多孔構造を *in vitro* で再現することで、幹細胞ニッチェ理解のための骨髄組織モデルや悪性腫瘍転移の疾患モデルなど、生命科学研究に有用な様々な研究モデルシステムの構築につながると考えられる。これまでに行われた海綿骨発生過程を材料学的なアプローチから再検討した研究の結果、マウス大腿骨遠位端における二次骨化中心付近において、肥大軟骨細胞は外部からの機械的刺激により破裂を起こし、細胞膜由来リン脂質および膜タンパク質から成る微細な断片(細胞ナノフラグメント)が形成されることが明らかになった。さらに、その後の海綿骨形成過程を観察した結果、このリン脂質を主体とする細胞ナノフラグメントが初期海綿骨形成の核となり、骨石灰化および初期海綿骨形成が始まることが明らかになった。そこで本研究では、細胞ナノフラグメントに着目し、この細胞ナノフラグメントからの石灰化物形成ならびに三次元構造体形成を行い、初期海綿骨を *in vitro* にて再現することを試みた。

【材料と方法】

1. マウス大腿骨遠位端初期海綿骨の観察

本実験ではまず、*in vitro* における海綿骨再現の参考とするためマウス大腿骨遠位端に存在する二次骨化中心における最初期の石灰化物の観察を行った。生後8日齢マウス大腿骨遠位端を摘出し、次亜塩素酸処理により有機物を除去した後、同部に形成された石灰化物を取り出した。その石灰化物をオスミウムでコーティングし、走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。

2. ナノフラグメント作製

先行研究より、細胞膜断片であるナノフラグメントを用いた石灰化物の形成は、マウス軟骨前駆細胞である ATDC5 を用いた研究において、*in vitro* で再現可能であることがわかっている。その為今回の研究でも同様に、超音波破碎によって ATDC5 を破碎しナノフラグメントを作製した。

3. 三次元構造体作製

作製したナノフラグメント由来石灰化小球を遠心分離を用いて回収し、3D プリンターで作製した鋳型に充填した後、凍結乾燥を用いて三次元構造体を作製した。

4.細胞親和性試験

マウス大腿骨骨髓由来細胞を用いて細胞との親和性を検討した。作成した三次元構造体に、骨髓由来細胞を 1.0×10^5 個の細胞を播種し、DMEM を用いて2週間培養を行った。培養後 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて固定を行い、パラフィンに包埋後切片を作製した。HE 染色を用いて細胞の接着および培養後の構造体の形態評価を行った。

【結果】

マウス大腿骨遠位端に形成された初期海綿骨は多孔構造を呈しており、高倍率では石灰化小球が積層して構造を形成する様子が観察できた。獲得した細胞ナノフラグメントと塩化カルシウムを混和することで、*in vivo* で観察されたものと同様の石灰化小球の形成に成功した。この石灰化小球は本研究で観察した初期海綿骨の石灰化小球と形、サイズのほぼ同一であり、これは過去の報告と一致した。本実験において、生成した石灰化小球を回収し、プラスチック鋳型を用いて凍結乾燥を利用することで三次元化および多孔化に成功した。この多孔化材料は原料となった石灰化小球の積層物により形成されていた。細胞親和性試験では、細胞の表面および内部において細胞の接着を認めており、細胞培養可能な構造体であることが確認された。また培養後も三次元構造体は多孔構造を維持していた。

【考察】

本研究では細胞ナノフラグメントを起点材料として海綿骨と同様の石灰化小球形成さらには海綿骨と同様の三次元構造体の作製に成功した。*In vitro* での海綿骨様モデルシステムにおいて、作製した材料は細胞との親和性および分解産物に為害性がないことが必要とされる。本研究における材料は細胞を超音波によって破碎した物質を原料としており、細胞に対する為害性は少ないものと考えられる。マウス骨髓由来細胞を用いた親和性試験においても表面および内部で細胞の接着が確認できており、材料の親和性および細胞に対する為害性はないと考えられた。一方で本材料の有する細孔のサイズに関しては課題を有している。これまでに、スキャホールド材料の細孔密度およびサイズが細胞の成長に影響を与えていることが報告されている。さらにスキャホールド内部への血管新生も細孔サイズが影響を与えており、細孔サイズの増大に伴い血管の有意な新生量が認められたという報告もある。これら細孔サイズの制御は今後の検討課題である。

論文審査結果の要旨

【緒言】

骨組織の構成要素の1つである海綿骨は、造血機能をはじめとして生命活動において重要な役割を担うことが知られている。これまでの研究結果から、マウス大腿骨遠位端の二次骨化中心付近の肥大軟骨細胞は外部からの機械的刺激により破裂し、細胞膜由来リン脂質および膜タンパク質から成る微細な断片（細胞ナノフラグメント）を形成することが明らかにされた。またこの細胞ナノフラグメントは骨石灰化および初期海綿骨形成の核となることも明らかにされた。本研究では、骨髄組織の再現に向けて、細胞ナノフラグメントからの石灰化物形成ならびに海綿骨様構造体の形成を行い、初期海綿骨を *in vitro* にて再現することを試みた。

【方法】

マウス大腿骨遠位端に存在する最初期の石灰化物を電子顕微鏡を用いて観察した。超音波破碎によって ATDC5 細胞から細胞ナノフラグメントを作製し、塩化カルシウムと混和することで石灰化物の形成を行った。得られた石灰化小球を 3D プリンターで製作した鋳型に充填し、凍結乾燥により多孔構造を有する海綿骨様構造体の作製を試みた。海綿骨様構造体にマウス骨髄由来細胞を 1.0×10^5 個播種し 2 週間培養した。培養後 4% パラホルムアルデヒドを用いて固定し、切片を作製、HE 染色を用いて細胞の接着および培養後の構造体の形態評価を行った。

【結果】

最初期海綿骨は多孔構造を呈しており、高倍率では石灰化小球が積層して構造を形成する様子が観察できた。細胞ナノフラグメント由来の石灰化物は *in vivo* で観察されたものに近似した石灰化小球であった。作製した海綿骨様構造体を電子顕微鏡を用いて観察した結果、初期海綿骨と同様の三次元多孔構造であった。細胞の表面および内部において細胞の接着を認めており、細胞培養可能な構造体であることを確認した。また培養後も海綿骨様構造体は多孔構造を維持していた。

【結論】

本研究では細胞ナノフラグメントを起点材料として海綿骨と同様の石灰化小球形成さらに海綿骨様構造体の作製に成功した。マウス骨髄由来細胞を用いた親和性試験においても表面および内部で細胞の接着が確認できており、材料の親和性および細胞に対する為害性はなかった。

本研究は、初期海綿骨形成過程によって得られた知見を応用することで、新しい骨様スキャホールドを作製している。これは極めて新規性に富んだ研究であるだけでなく、今後の臨床応用にも期待される材料である。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。