

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 齋藤 直朗
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 357 号
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 骨分化誘導と低酸素処理併用によるラット間葉系細胞の多面的骨誘導能促進効果の検討

論文審査委員 主査 教授 小林 正治
副査 教授 泉 健次
副査 教授 大峽 淳

博士論文の要旨

移植される間葉系幹細胞に骨形成能を期待する骨再生では、移植細胞の宿主環境における生存や新生骨形成までの期間短縮を促すという観点から、宿主での骨形成細胞誘導、血管新生促進、成長因子供給などの多面的アプローチが重要である。ティッシュエンジニアリングによる骨再生療法において、骨形成能、血管新生能、細胞誘導能などの多面的機能強化を細胞に賦与することは骨再生の効率化につながる。近年、細胞の骨誘導機能に対する骨分化誘導と低酸素処理の併用が注目されている。本研究では骨再生療法に対する間葉系細胞の多面的機能強化を図るプロトコル開発を目的として、間葉系細胞に対する骨分化誘導と低酸素処理の効果的な適用法を検討した。

実験にはラット骨髄、脂肪、歯根膜から分離した間葉系細胞を用いた。低酸素の濃度、期間、タイミングと骨分化誘導の各組み合わせにおける各細胞の反応を骨分化能、血管新生能、細胞誘導能の指標である **Runx2**、**Vegfa**、**Cxcl12** を標的遺伝子として、遺伝子発現の変化を定量的 RT-PCR 法にて評価した。また、細胞の石灰化能を石灰化結節形成の程度により確認した。

まず、骨分化誘導と低酸素の同時処理が細胞に与える影響を酸素濃度 2%、96 時間の処理で検討したところ、低酸素処理が加わった群で **Runx2** の発現が低下した。一方、**Vegfa** は低酸素処理によりいずれの細胞においても発現が上昇した。骨分化誘導と低酸素を併用した場合には、骨髄および脂肪由来細胞で低酸素処理単独でみられた **Vegfa** の発現増加が認められなかったが、歯根膜由来細胞では発現の増加を認めた。**Cxcl12** は低酸素処理により骨髄、脂肪由来細胞において発現が低下していた。骨分化誘導と低酸素の同時処理は骨分化に対して抑制的な作用を及ぼすと考えられたため、次に低酸素プレコンディショニングが細胞機能強化に貢献するか検討を行ったところ、低酸素プレコンディショニングによる **Runx2** の発現への影響は認めなかった。また、骨分化誘導が加わった細胞では **Vegfa** の発現量は低下しており、低酸素プレコンディショニングを行った群でも同様の傾向を認めた。

96 時間の低酸素処理は **Vegfa** の発現に対しては亢進的作用を示すものの、**Runx2** の発現には抑制的作用を示したため、低酸素処理が **Runx2** の発現に対して抑制作用を引き起こさない、より短い処理時間および酸素濃度 0.5%、2%、5%を検索した。その結果、酸素濃度 0.5%、12 時間の処理で **Runx2** の発現を低下させることなく、効率的に **Vegfa** の発現が亢進した。低酸素処理のタイミングとして、骨分化誘導との同時処理およびプレコンディショニングでは多面的機能強化の効果を及ぼしていないと考えられたため、骨分化誘導後に低酸素処理を行うポストコンディショニングでの検索を酸素濃度 0.5%、12 時間の処理で行った。その結果、骨髄由来細胞で骨分

化誘導のみでは Runx2、Cxcl12 の遺伝子の発現が上昇したのに対し、低酸素ポストコンディショニングを加えたところ、Runx2、Vegfa、Cxcl12 すべての遺伝子発現が上昇した。一方、脂肪、歯根膜由来細胞では低酸素ポストコンディショニングにより Vegfa の発現上昇が認められたが、Runx2、Cxcl12 の発現は亢進しなかった。さらに、低酸素ポストコンディショニングが石灰化能に与える影響を石灰化結節形成の程度により評価したところ、歯根膜由来細胞では低酸素ポストコンディショニングにより石灰化結節形成が顕著に増加した。対照的に骨髄由来細胞では低酸素ポストコンディショニングの有無によらず、骨分化誘導に対する石灰化能が圧倒的であり、脂肪由来細胞では骨分化誘導と低酸素ポストコンディショニングの両者に対する反応が乏しかった。

以上より、骨分化誘導と低酸素同時処理または低酸素プレコンディショニングの併用は実験に用いたすべての細胞において多面的骨誘導能のマーカーとして検討した遺伝子発現に抑制的な効果を示した。一方、骨分化誘導と低酸素ポストコンディショニングの併用では骨髄由来細胞において標的とした複数の骨分化、血管新生、細胞誘導の遺伝子発現が有意に上昇し、本プロトコールの有効性が示唆された。さらに、歯根膜由来細胞では低酸素ポストコンディショニングにより石灰化結節形成が顕著に増加したが、骨髄、脂肪由来細胞では低酸素ポストコンディショニングに対する反応が明らかではなかった。このことから低酸素環境を応用した骨再生医療の効率的プロトコールの開発には細胞ソースを十分考慮する必要があると考えられた。

審査結果の要旨

現在、顎骨再建治療における自家骨移植の代替治療法開発を目的にティッシュエンジニアリング技術を用いた骨再生療法に関する研究が盛んになされているが、いまだ決定的な治療法の開発には至っていない。これまで細胞を用いた骨再生研究では、成長因子や足場材料との様々な組み合わせが検討されてきたが、近年では移植する細胞に対して何らかの刺激を加えることにより、目的の機能を賦与するというプレコンディショニングという手法が注目を浴びてきている。骨再生療法では移植床部で移植細胞が骨形成を行う骨形成能、さらに好条件な骨形成環境を整えるための血管新生能、宿主由来の細胞誘導能が重要と考えられており、移植細胞にこれらの多面的機能を賦与することは骨再生療法の発展に重要であると考えられる。このような機能付加において、血管新生能に関してはすでに心臓血管系の分野で低酸素処理による血流改善作用が示されている。しかしながら、低酸素処理が骨分化に与える影響については骨分化を促進するというものと抑制するものという報告があり、未だ一致した見解が得られていないのが現状である。本研究では歯科・口腔外科での細胞ソースとして考えられる骨髄、脂肪、歯根膜由来の間葉系細胞を用いて、低酸素処理が骨分化に与える影響を確認するとともに、骨分化誘導処理と低酸素処理の効果的な適用法の検討を行っている。

手法としてはラットの骨髄、脂肪、歯根膜から分離した間葉系細胞に対して、様々な低酸素処理と骨分化誘導の組み合わせを試みており、その結果を骨分化能、血管新生能、細胞誘導能の指標として、それぞれ Runx2、Vegfa、Cxcl12 の発現で評価している。まず、骨分化誘導と低酸素処理を同時に行うプロトコールを検索したところ、低酸素処理により Vegfa の発現は亢進するものの、Runx2 の発現が抑制され、低酸素処理により骨分化が阻害されるという結果を得ている。次いで、骨分化誘導と低酸素処理のタイミングを変更し、低酸素処理の後に骨分化誘導を行うプロトコールを試みているが、低酸素処理をプロトコールの最初に行う場合ではその後に通常酸素濃度下での培養期間が加わるため、低酸素処理の効果が反映されないという結論に至っている。これらの結果を踏まえて、骨分化に抑制的な影響を与えずに血管新生能を亢進できるような酸素濃度、処理時間を検討し、24 時間以内の低酸素処理であれば低酸素処理は Runx2 の発現を抑制せずに、Vegfa の発現を亢進させることが可能であるという結果を得ている。このうち最も Vegfa 発現亢進作用が認められたのが酸素濃度 0.5%、12 時間の低酸素処理であり、この低酸素処理を 1 週間の骨分化誘導後に行うというプロトコールを用いることで骨髄由来細胞の Runx2、Vegfa、Cxcl12 の発現亢進に至っている。脂肪、歯根膜由来細胞については同様の反応が認められな

ったが、この差は由来組織による低酸素応答性の違いを表しているものと考察しており、今後、由来組織に応じた検討が期待される。

また、本研究では遺伝子発現評価における内在性コントロールの重要性についても言及している。過去の報告において低酸素処理と骨分化における見解が一致していない点に関して、細胞に加える処理によって目的とする遺伝子発現の基準となる遺伝子自体が変動を受けているということを一因として述べている。これは遺伝子発現評価において非常に基本的な事項であるが、それゆえに軽視されやすい部分でもある。本研究では手法の妥当性についても検討がなされており、信憑性の高い結果であると考えられる。

以上より、本研究では細胞機能強化プロトコールとして、1週間の骨分化誘導の後に酸素濃度0.5%、12時間の低酸素処理を行う方法により遺伝子レベルで骨髄由来細胞の骨分化能、血管新生能、細胞誘導能の全てを亢進させることに成功しており、その手法についても妥当なものであると考えられる。骨髄由来細胞に対する本プロトコールはリコンビナントタンパクのような高価な成長因子を用いることなく、骨分化能、血管新生能、細胞誘導能の賦与の可能性を示しており、臨床において実現性の高い手法と成り得る意義深い成果であり、学位論文としての価値を認める。

