

池田 秀吉 論文内容の要旨

主 論 文

Engineering Bone Formation from Human Dental Pulp- and Periodontal Ligament-Derived Cells

(ヒト歯髄、歯根膜由来細胞を用いた骨形成)

HIDEYOSHI IKEDA, YOSHINORI SUMITA, MIHOKO IKEDA, HISAZUMI IKEDA, TERUHITO OKUMURA, EIKO SAKAI, MASAHIRO NISHIMURA, and IZUMI ASAHINA

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：朝比奈泉教授)

緒 言

近年、間葉系幹細胞を用いた再生医療が注目されており、特に骨髄、骨膜由来の幹細胞を用いた骨再生は広く臨床応用されようとしている。一方、入手の容易な歯髄および歯根膜組織も骨再生のための細胞源として注目を集めており、過去の研究においても、歯髄、歯根膜由来幹細胞は培養条件によって石灰化基質を形成するなど骨芽細胞様性質を持つと考えられている。そこで我々は、骨髄、骨膜由来間葉系幹細胞に代わる細胞源として歯髄、歯根膜を採取し、それぞれの細胞に bone morphogenetic protein 2 (rhBMP2) を作用させ、硬組織形成能を比較検討することによって、採取した細胞を用いた硬組織再生法の開発を試みた。

対象と方法

同意の得られた患者から抜歯された第三大臼歯より歯髄、歯根膜を採取し 10% α -MEM 培地を用い expansion culture を行った。

1. in vitro での解析

- 細胞増殖活性：歯髄細胞(DPCs)、歯根膜細胞(PDLCs)それぞれについて MTT assay を用いて細胞増殖測定を行った。
- 分化誘導活性：A) control 群; 10% α -MEM のみ、B) osteogenic medium (OM) 群; 10% α -MEM + osteogenic medium (100 μ M ascorbic acid (AA) + 10⁻⁸M Dexamethazone (Dex) + 10mM β -Glycerophosphate (β -Gly)), C) BMP 群; 10% α -MEM + osteogenic medium + rhBMP2 (30, 100, 300ng/ml) に分け 14 日間培養し、i) Alkaline phosphatase (ALP) 活性 ii) 石灰化能を Alizarin red staining で iii) 骨細胞分化にかかわる遺伝子発現を RT-PCR 測定を行った。

2. in vivo での解析

それぞれ 1.0 \times 10⁶ 個の細胞を 30mg の hydroxylapatite (HA) granules に播種し、それぞれを A) control 群、B) OM 群、C) BMP 群、さらに D) 10% α -MEM + 300ng/ml rhBMP2

に分け 14 日間培養。HA のみあるいは HA を BMP を含む培地に浸漬したもの(細胞なし)を対象として 6 週齢、メス BALB/cAJcl-nu/nu mouse の背部皮下に移植し、8 週間後に回収して、組織形態計測法によって骨形成能を評価した。

結 果

1. DPCs、PDLCs とともに紡錘形を呈しており、増殖能は類似していた。
2. いずれの細胞においても BMP2 の濃度依存的に ALP 活性は上昇していた。DPCs に比べ PDLCs の方が高い ALP 活性を示した。
3. いずれの細胞においても control 群 < OM 群 < BMP 群の順で石灰化結節の形成が確認された。
4. osteocalcin(OCN)、osteopontin(OPN)、dentin matrix protein-1(DMP-1)の測定。いずれの遺伝子も BMP 群でより高い発現を示した。
5. 細胞を含まない HA のみの移植では硬組織様のものは確認できなかった。また、control 群でも硬組織様の形成は認められなかった。OM 群ではごく少量の硬組織様物質が認められた。また 10% α -MEM + 300ng/ml BMP2 のものでは、少量の硬組織様物質が認められた。一方、BMP 群では多量の硬組織様物質が確認できた。

考 察

ALP 活性は間葉系細胞が骨芽細胞をはじめとする硬組織形成細胞へ分化する際の、初期の marker と考えられているが、BMP2 を DPCs と PDLCs に作用させることによって ALP 活性が上昇した。また Alizarin red 染色による石灰化結節の形成も、BMP2 を作用させると促進された。すなわち BMP2 は、DPCs、PDLCs に存在する間葉系細胞の硬組織形成細胞への分化を促進しているものと考えられた。同時に RT-PCR による検索で OCN、OPN、DMP-1 の遺伝子発現が上昇したことから、*in vitro* で象牙芽細胞への分化ばかりでなく骨芽細胞への分化を促進するものと思われた。また *in vivo* では、HA に DPCs、PDLCs を播種し rhBMP2 を作用させたものは多量の骨様組織が形成されていた。この結果は、rhBMP2 は DPCs、PDLCs に存在する間葉系細胞を骨芽細胞へ分化させ、骨形成を誘導していることを強く示唆するものであった。BMP2 は多様な作用があり、直接人体へ作用させることによって思わぬ為害作用が引き起こされる可能性がある。今回の我々の研究では *in vivo* で rhBMP2 を作用させた DPCs、PDLCs を用いることで為害作用なく骨組織形成誘導することが可能であることを示した。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。