

Title	Radial-Flow Bioreactor Enables Uniform Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells throughout 3-D Scaffold .
Author(s)	片山, 愛子
Journal	歯科学報, 112(6): 766-767
URL	http://hdl.handle.net/10130/2990
Right	

氏名(本籍)	かたやま あいこ (東京都) 片山愛子
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1939号(甲第1185号)
学位授与の日付	平成24年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Radial-Flow Bioreactor Enables Uniform Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells throughout 3-D Scaffold.
掲載雑誌名	Tissue Engineering Part C Methods, doi : 10.1089/ten. tec. 2011. 0722.
論文審査委員	(主査) 佐藤 亨教授 (副査) 井上 孝教授 矢島 安朝教授 吉成 正雄教授 阿部 伸一教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

近年、広範囲組織欠損に対する Tissue Engineering への注目に伴い、生体外で三次元的に培養組織を構築するための装置が多数開発されている。その中でもラジアルフロー型バイオリアクターは放射状に培地を灌流することにより、比較的均一な培養環境を保つことが可能とされている。一方、間葉系幹細胞は多分化能と自己複製能を持ち、しかも自己骨髄から比較的容易に採取可能であるため、再生医療における有用な細胞源として期待されている。そこで本研究では、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いたヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC)の三次元培養を目的とした。

2. 研究方法

hMSC を1週間 DMEM で通常培養後、コラーゲンシート(気孔径70~110 μ m, 気孔率80~95%, 直径12 mm, 厚さ3 mm)のスキュフォールドに細胞を 2.3×10^5 個播種し、細胞が生着する時間を考慮してリアクター外にて12時間初期培養を行った。その後 hMSC を播種したコラーゲンシートを3枚重ねでラジアルフロー型バイオリアクターに取り込み、リアクターがスキュフォールドで満たされるようにして灌流培養した。培養条件は37 $^{\circ}$ C, pH7.4, DO 値6.86ppm, 培養液交換量100mL/day, 培養液灌流速度3 mL/min に設定し、培地交換は培養開始後3日目から毎日とした。1週間後にスキュフォールドを回収し、形態観察と細胞数(DNA抽出法により算出)を評価した。対照群には、ウェル上で静置培養したものをを用いた。また灌流培養による細胞特性の変化の有無を調べるため、細胞表面マーカーの発現について灌流培養前後で比較を行った。さらに灌流培養後のスキュフォールドを骨分化培地にてウェル上で2週間培養し、ALP活性を測定して、骨分化能の有無を評価した。

3. 研究成果および結論

灌流培養ではスキュフォールド全体で細胞増殖が観察されたが静置培養では少数の細胞が点在するだけで、DNA抽出による評価でも灌流培養では増殖が確認できたが静置培養では増殖していなかった。細胞表面マーカーの発現は、灌流培養の前後で違いがなく形質の変化はないことが確認された。またALP活性の評価により、灌流培養を行った後も、hMSCは骨分化能を維持していることがわかった。以上より、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた灌流培養ではスキュフォールドに均等に培地が供給され、分化能を維持したまま細

胞増殖が進行したことが示された。よって、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた hMSC の培養は生体外での組織構築に有用であると示唆される。

論文審査の要旨

広範囲組織欠損に対する Tissue Engineering による再生医療への注目に伴い、in vitro で三次元的に培養組織を構築するための研究が進められてきている。本研究では、多分化能と自己複製能を持つことから再生医療における有用な細胞源として期待されているヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC)を、均一な培養環境の維持が可能とされるラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用いて三次元培養することを目的とした。

hMSC を1週間通常培養後、コラーゲンシートのスキャフォールドに播種し、細胞が生着する時間を考慮してリアクター外にて12時間初期培養を行った。その後 hMSC を播種したコラーゲンシートを RFB に取り込み、灌流培養した。培養条件は37℃、pH7.4、DO 値6.86ppm、培養液交換量100mL/day、培養液灌流速度3 mL/min に設定し、培地交換は培養開始後3日目から毎日とした。1週間後にスキャフォールドを回収し、形態観察と細胞数(DNA 抽出法により算出)を評価した。対照群には、ウェル上で静置培養したものをを用いた。また灌流培養による細胞特性の変化の有無を調べるため、細胞表面マーカーの発現について灌流培養前後で比較を行った。さらに灌流培養後のスキャフォールドを骨分化培地にてウェル上で2週間培養し、ALP 活性を測定して、骨分化能の有無を評価した。

その結果、灌流培養では静置培養と比較して有意に多い細胞増殖が認められ、部位による比較においては細胞の均等な分布が確認できた。細胞表面マーカーの発現は、灌流培養の前後で違いがなく形質の変化はないことが確認された。また骨分化誘導実験により、灌流培養を行った後も、hMSC は骨分化能を維持していることがわかった。以上より、RFB を用いた灌流培養ではスキャフォールドに均等に培地が供給され、分化能を維持したまま細胞増殖が進行したことが確認できた。よって、RFB を用いた hMSC の培養は生体外での組織構築に有用であると考えられる。

本審査委員会は平成23年10月21日に行われ、まず片山愛子大学院生から論文内容の説明がなされた。その後各審査委員により、コントロール設定の妥当性、培地灌流量などについての質問があり適切な回答を行った。培養条件の設定、実験の流れについては追加記載をした。また目的に適した題名の再検討が行われた。さらにその他用語の表現、英文表記、付図の追加と修正など質問事項とともに修正すべき点が指摘され、これらに関しては後日修正を行い再確認された。

以上より、本研究で得られた結果は今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。