

Title	Effect of Osteogenic Differentiation Medium on Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Three-dimensional Culture with Radial Flow Bioreactor
Author(s)	西村, 逸郎
Journal	, (): -
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3631">http://hdl.handle.net/10130/3631</a>
Right	

氏名	西村 逸郎
学位	博士 (歯学)
学位記番号	第 2 0 9 6 号 (甲 第 1309 号)
学位授与年月日	平成 2 7 年 3 月 3 1 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
論文審査委員	主査 矢島 安朝 教授 副査 井上 孝 教授 副査 佐藤 亨 教授 副査 東 俊文 教授 副査 吉成 正雄 教授
学位論文名	Effect of Osteogenic Differentiation Medium on Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Three-dimensional Culture with Radial Flow Bioreactor

## 学位論文内容の要旨

### 1. 研究目的

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs) はドナーの骨髄から容易に採取でき、さらに骨前駆細胞への分化誘導が期待されることから骨再生における細胞として注目されている。一方、移植を目的として三次元的な多孔質の足場上で hMSCs を培養し、培養組織を構築するための研究が進められている。そこで灌流培養を行うバイオリアクターが多数開発されており、中でもラジアルフロー型バイオリアクターは比較的均一な培養環境を保つことが可能とされている。我々は、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた灌流培養により、スキャフォールドに播種した hMSCs の細胞特性を変化させないまま均一に増殖させることが可能であることを報告したが、臨床応用にとって未分化もしくはある程度分化した幹細胞のどちらを移植したほうが有利であるかは分かっていない。そこで本研究は、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて灌流培養を行った場合、骨分化培地が hMSCs の増殖と分化に与える影響について検討することを目的とした。

### 2. 研究方法

hMSCs を DMEM に 10% FBS およびペニシリン-ストレプトマイシンを添加した培地を成長培地 (GM) とし、事前培養、静置培養、灌流培養にもちいた。また GM に骨分化因子としてアスコルビン酸 0.2mM,  $\beta$ -グリセロリン酸 10mM, デキサメタゾン 50nM を添加したものを骨分化培地 (ODM) とした。事前培養として 5 継代まで培養した hMSCs を気孔径 70~110 $\mu$ m, 気孔率 80~95%, 直径 12mm, 厚さ 3mm のコラーゲンシートに播種した。このシートを 3 枚重ねてスキャフォールドとし、ラジアルフロー型バイオ

リアクターに設置し、灌流培養を行った。コントロールとしてコラーゲンシートに播種した後、ウェルプレート上で静置培養したものをを用いた。GM および ODM で 7 日間および 14 日間灌流培養を行った後回収した。評価は HE 染色による形態観察、DNA 抽出による細胞数計測、ALP 活性の計測、BMP-2 と osteopontin の免疫組織学的染色を行った。

### 3. 研究成績および結論

骨分化因子を添加することで高密度に細胞が分布した。また静置培養と比較し灌流培養で高密度に分布した。細胞数は骨分化因子を添加し 14 日間培養することで静置培養、灌流培養の両方の条件で高い値を示した。またすべての条件において灌流培養は静置培養と比較して高い値を示した。骨分化度では骨分化培地で培養することにより ALP 活性の発現がみられ、14 日間灌流培養を行うことで静置培養と比較し高い値を示した。さらに免疫組織学的染色の結果より、BMP-2 はすべての条件で発現がみられ、特に 14 日間灌流培養では発現している細胞が多く観察された。また osteopontin は 7 日間、14 日間の灌流培養のみで発現が認められた。以上より、骨分化培地にてラジアルフロー型バイオリアクターを用いて灌流培養を行なうことで、静置培養と比較して細胞増殖と骨分化を促進させることが明らかとなった。

## 最終試験の結果の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 1 3 0 9 号	氏 名	西村 逸郎
最終試験担当者	主 査	矢島 安朝	教 授
	副 査	井上 孝	教 授
		佐藤 亨	教 授
		東 俊文	教 授
		吉成 正雄	教 授
最終試験施行日	平成 2 7 年 1 月 2 0 日		
試 験 科 目	クラウンブリッジ補綴学		
試 験 方 法	口頭試問		
試 験 問 題	主題ならびに関連問題		
<p><u>結果の要旨</u></p> <p>本審査委員会は主題ならびに関連問題について最終試験を行った結果、十分な学識を有することを認め、合格と判定した。</p>			

## 学位論文審査の要旨

本研究は、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて灌流培養を行った場合、骨分化培地が hMSCs の増殖と分化に与える影響について検討することを目的とした。骨分化培地で培養することで高密度に細胞が分布した。細胞数は骨分化培地で培養することで静置培養、灌流培養の両方の条件で高い値を示し、すべての条件において灌流培養は静置培養と比較して高い値を示した。骨分化度では骨分化培地で培養することにより ALP 活性の発現がみられ、灌流培養を行うことで静置培養と比較して高い値を示した。さらに免疫組織学的染色の結果より、BMP-2 はすべての条件で発現がみられたが、osteopontin は 7 日間、14 日間の灌流培養のみで発現が認められた。

以上より、骨分化培地にてラジアルフロー型バイオリアクターを用いて灌流培養を行なうことで、静置培養と比較して細胞増殖と骨分化を促進させることが明らかとなった。

本審査委員会では、1) タイトルである **Osteogenic differentiation factor** は適切か、2) 本実験ではある程度は分化させた細胞（前骨芽細胞様細胞）を使用しているがその理由、3) 本研究で細胞が石灰化しなかった理由、4) コラーゲンスポンジ内で細胞が密でない理由、5) 分化に対する評価項目として **BMP-2** と **OP** を選んだ理由、等の質問があった。これに対して、1) **Factor** では対象としている要因が多すぎるため、より目的に適したタイトル変更した。2) 本法で完全に骨分化をさせず前骨芽細胞様細胞を使用した理由は、培養骨の状態（石灰化した状態）で移植した場合の異物認識と、石灰化によりスキャフォールド内の培地供給の阻害を軽減するためである。3) 2次元培養では cell-cell コンタクトが生ずる機会が多く、細胞分化が亢進して石灰化が起り易いと考えられるが、3次元培養では cell-cell コンタクトが生じにくく、このような現象が生じにくいためであると考えられる。4) 3次元培養では細胞が3次元方向に増殖することから、通常の2次元培養と異なる増殖挙動を示し、細胞密度が粗になったと事が考えられる。5) コラーゲンスキャフォールドを用いているためコラーゲン1などのタンパクは抽出しにくく、また **ELISA** でも評価を行ったが、説明のできる結果が得られなかったため、**BMP-2** と **OP** を選択した。

との回答があり、その他の質問に関しても概ね妥当な回答が得られた。さらに、図表の訂正、英文表現方法の誤り、考察への追加事項等が指摘され、審査後これらは早急に訂正追加された。

以上より、本研究で得られた成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。