

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	歯科学報, 117(2): 148-149
URL	http://hdl.handle.net/10130/4211
Right	
Description	

氏名(本籍)	にしむらいつろう 西村逸郎 (愛知県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第2096号(甲第1309号)
学位授与の日付	平成27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	Effect of osteogenic differentiation medium on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional culture with radial flow bioreactor
掲載雑誌名	Regenerative Therapy 第2巻 24-31頁 2015年12月
論文審査委員	(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

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、灌流培養に用いた。またGMに骨分化因子としてアスコルビン酸0.2mM、 β -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 μ 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用了。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。

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障害を軽減するためである。3) 2次元培養では cell-cell コントラ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こり易いと考えられるが、3次元培養では cell-cell コントラクトが生じにくく、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タイプ1コラーゲン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。