

Title	エナメルマトリックスタンパク質とアテロコラーゲンスポンジの併用がマウスiPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響
Author(s)	久永, 幸乃; 鈴木, 瑛一; 青木, 栄人; 佐藤, 正敬; 齋藤, 淳; 東, 俊文
Journal	歯科学報, 117(3): 259-259
URL	http://hdl.handle.net/10130/4275
Right	
Description	

No.9 : Fluvastatin-loaded atelocollagen/gelatin sponge promotes bone regeneration in calvarial bone defects

Longqiang Yang¹⁾²⁾, Koji Tanabe²⁾³⁾, Tadashi Miura²⁾, Masao Yoshinari²⁾, Shinji Takemoto⁴⁾, Seikou Shintani¹⁾, Masataka Kasahara³⁾ (東歯大・小児歯)¹⁾ (東歯大・口科研)²⁾ (東歯大・薬理)³⁾ (岩手医大・医療工学)⁴⁾

Purpose : Atelocollagen/gelatin (ACG) sponge was successfully fabricated with lyophilization. This study aimed to investigate influences of lyophilization factors and gelatin concentration on pore structures of ACG sponge, and osteogenic effects of fluvastatin-loaded ACG sponge *in vivo*.

Materials and Methods : ACG sponges of different freezing temperatures (-30°C , -80°C and -196°C), freezing times (1 h, 2 h and 24 h), gelatin concentrations (0.6% AC + 0.15% G, 0.6% AC + 0.6% G and 0.6% AC + 2.4% G), and with 500 μM fluvastatin were fabricated. Pore structures including porosity and pore size were analyzed by scanning electron microscopy and ImageJ. The cytotoxic effects of ACG sponge were evaluated *in vitro*. ACG sponges loaded with/without 500 μM fluvastatin were transplanted into 3.8 mm-diameter calvarial bone defects of Sprague-Dawley rats to evaluate bone regeneration.

Results : Freezing temperature did not affect porosity while high freezing temperature (-30°C) increased pore size. The high gelatin concentration group (0.6% AC + 2.4% G) had decreased porosity and pore size. Freezing time and 500 μM fluvastatin did not affect pore structures. The cytotoxicity and cell proliferation assays revealed that ACG sponges had no cytotoxic effects on human mesenchymal stromal cell growth and proliferation *in vitro*. More new bone formation was observed in ACG + 500 μM fluvastatin group compared with ACG and Blank groups.

Conclusion : These results indicate that various factors affect the pore structures of ACG sponge fabricated with lyophilization. ACG sponge may also act as a good drug delivery system of fluvastatin and an ideal porous biomaterial scaffold for bone regeneration.

No.10 : エナメルマトリックスタンパク質とアテロコラーゲンスポンジの併用がマウス iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

久永幸乃¹⁾, 鈴木瑛一¹⁾, 青木栄人¹⁾, 佐藤正敬¹⁾, 齋藤 淳¹⁾²⁾, 東 俊文²⁾³⁾ (東歯大・歯周)¹⁾ (東歯大・口科研)²⁾ (東歯大・生化)³⁾

目的 : 近年, iPS 細胞はその多分化能と増殖能から, 歯周組織再生治療に対する応用が検討されている。効果的な歯周組織再生には, 細胞, スキャフォールド, 増殖因子が重要とされている。今回我々は, エナメルマトリックスタンパク質 (EMD) とアテロコラーゲンスポンジ (ACS) の併用がマウス iPS 細胞 (miPSC) の細胞増殖と骨芽細胞分化へ与える影響について検討を行った。

方法 : miPSC は胚様体形成後シングルセルとし, ACS (5 mm \times 3 mm) に対し 2×10^5 個を播種した。細胞播種24時間後, 骨芽細胞誘導培地 (OBM) に交換し, 3次元培養を行った。miPSC を OBM 単独で培養したものを対照群, 細胞に EMD を混和して培養したものを実験群とした。細胞増殖は MTT アッセイにて, 主な骨関連遺伝子の発現はリアルタイム PCR, 骨関連タンパク質発現の評価として Alkaline Phosphatase (ALP) アッセイ, スポンジ内への細胞侵入の状態を光学顕微鏡にて (H-E

染色), 細胞形態の経時的变化を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。

結果および考察 : miPSC の細胞増殖率は細胞播種後3日までは両群共に経時的な上昇を認め, 全てのタイムポイントで群間に有意差を認めなかった。リアルタイム PCR の結果, *Alp*, *Osx* mRNA は全てのタイムポイントにおいて有意な発現上昇を認めた。*Runx2* は7日で, *Opn*, *Bsp* は14日で, 実験群で有意な mRNA 発現上昇を認めた。ALP アッセイにおいても両群ともに経時的なタンパク質量の増加が認められ, 実験群において有意に高い値を示した ($P < 0.001$)。また, H-E 染色により細胞のスポンジ内への侵入が観察された。SEM による観察では, 実験群で細胞播種後7日から骨芽細胞様を呈する著明な細胞形態変化が認められた。以上のことから, ACS 内での miPSC の骨芽細胞分化が確認され, EMD 添加により, それが進められることが示唆された。