

Title	Dynamic cultivation with radial flow bioreactor enhances proliferation or differentiation of rat bone marrow cells by fibroblast growth factor or osteogenic differentiation factor
Author(s)	神田, 雄平
Journal	歯科学報, 118(1): 54-55
URL	http://hdl.handle.net/10130/4445
Right	
Description	

氏名(本籍)	かん だ ゆう へい (広島県) 神 田 雄 平
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2142 号(甲第 1347 号)
学位授与の日付	平成28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	Dynamic cultivation with radial flow bioreactor enhances proliferation or differentiation of rat bone marrow cells by fibroblast growth factor or osteogenic differentiation factor
掲載雑誌名	Regenerative Therapy 第5巻 17-24頁 2016年 doi : org/10.1016/j.reth.2016.06.001
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 村松 敬教授 東 俊文教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

広範囲骨欠損に対する治療法として Tissue Engineering を用いた骨再生療法が注目されている。広範囲骨欠損に必要とされるスキャフォールドは体積が大きくなるほど培地供給が困難となる。我々は、ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用いた灌流培養により、マウス骨芽細胞様細胞およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)がスキャフォールド上で均一に増殖すること、また、骨分化因子を添加することにより hMSC の増殖と骨芽細胞への分化が促進することを報告した。一方で、骨欠損部での骨再生を促進するためには、生体より抽出した Primary Cell を増殖させることが必要であるが、RFB を用いて Primary Cell であるラット骨髄細胞(rBMC)を培養し、その特性を評価した報告はない。そこで本研究は、RFB を用いた灌流培養が rBMC の増殖と分化に与える影響を、塩基性線維芽細胞成長因子と骨分化因子を添加することにより明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

6週齢、雄性、SD系のラットを屠殺し細胞を大腿骨、上腕骨、脛骨より採取した。初代培養のみ細胞誘導培地(10^{-8} M デキサメタゾン, 10mMβ-グリセロリン酸, 50μg/ml アスコルビン酸を添加した D-MEM)にて培養し、2継代目まで通常培地(骨分化因子を添加していない D-MEM)にて培養した。その後タイプ1コラーゲンシート(気孔径70~110μm, 気孔率80~95%, 直径18mm, 厚さ3mm)に 5×10^5 個の細胞を播種した。このシートを6枚重ねてRFBに取り込み灌流培養を行った。コントロールとして培地灌流を行わずに培養プレートにて静置培養したものを用いた。灌流培養および静置培養に際し、培地には通常培地(GM)、および通常培地に10ng/ml 塩基性線維芽細胞成長因子を添加した成長因子培地(bFGFM)、通常培地に10mMβ-グリセロリン酸, 50μg/ml アスコルビン酸を添加した骨分化培地(ODM)培地を用いた。灌流培養の培養条件は37°C, pH 7.4, DO 値6.86ppm, 培養液交換量100ml/day, 培養液灌流速度3ml/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評価としてDNA抽出による細胞数計測, HE染色による形態観察, ALP活性の計測, およびBMP-2とOsteopontinによる免疫組織学的染色を行った。

3. 研究成績および結論

RFBを用いてラット骨髄細胞を培養した結果、全ての培地において灌流培養が静置培養より有意に高い細胞増殖を示し、HE染色により細胞が静置培養よりも灌流培養のスキュフォード上で高密度に分布し、スキュフォード上に均一に増殖することを確認した。また、灌流培養においてbFGFMが最も高い細胞増殖を示した。ALP活性値は灌流培養、静置培養とも、ODMのみで上昇し、灌流培養においてさらに促進した。また、BMP-2、OsteopontinはODMを使用した灌流培養で発現が確認された。

以上より、細胞増殖はすべての培地で灌流培養が静置培養より促進し、塩基性線維芽細胞成長因子の添加が最も促進することが、また細胞分化は骨分化因子を添加した灌流培養で促進することが明らかとなった。

論文審査の要旨

本論文では、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いてラット骨髄細胞(rBMC)を培養し、塩基性線維芽細胞成長因子と骨分化因子を添加したときの細胞増殖と骨分化について検討した。

細胞増殖はすべての培地で灌流培養が静置培養より促進し、塩基性線維芽細胞成長因子の添加が最も促進することが、また骨分化は骨分化因子を添加した灌流培地で促進することが明らかになった。

本審査委員会では、研究方法に関して①この実験系では細胞がヘテロな状態でありこのような細胞を用いるのであればラット骨髄間質細胞ではなくラット骨髄細胞ではないのか、なぜこのような細胞を用いることとしたのか、②ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた理由は何か、③12ウェルプレートでの静置培養だと培地が1mlで使用するのが一般的であるが、なぜ2mlとしたのか、また結果に関して、④免疫組織学的染色の図では、比較的丸い細胞が染まっているが、もっと仮足が伸びている細胞が染まるのではではないか、などの質問があった。

これらの質問に対し、①本実験はラット骨髄細胞を抽出し骨系細胞に分化させた細胞を用いることで骨の再生が促進すると思われるため用いた。しかし、細胞はヘテロな状態であると予想されるためラット骨髄細胞(rBMC)に変更した。②大きな骨欠損を有する臨床応用を想定した場合、骨髄から採取できる細胞数は少ないので、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて細胞数を増やすことにより、大きな骨欠損に対応できると考え採用した。③本実験では、平面培養でなくコラーゲンスキュフォードを使用した三次元培養であるので12wellプレートで1mlではスキュフォードを覆いきれないとの理由で多めの培地量にした。④三次元形態を有するコラーゲンシート内の細胞形態は、通常のプレート上での二次元形態とは異なり、細胞は三次元的に増殖し仮足も三次元的に伸びているため、丸い細胞となって観察されると考えられる。さらに、Clinical implicationsでは、臨床応用については記載されているが、より将来的な展望はどうかなどに対して、適切な回答がなされた。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、図表の改善、英文表現方法の誤り、参考文献への追加事項等が指摘され、審査後これらは訂正追加された。

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。