

論文内容要旨

ヒト歯槽骨骨膜由来細胞を用いた新たな細胞シート作製法

神奈川歯科大学 口腔治療学講座 歯周病学分野

研究生 志田 哲也

(指導： 出口 眞二 教授)

論文内容要旨

生きた細胞を用いる組織工学が、組織や臓器移植に代わる手法として浮上してきている。近年、組織再生工学の中でも、自家の培養細胞を用いた細胞シートの研究が注目されており、多くの研究が報告されている。以前、我々は折りたたみ型のヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPC) シートを用いた移植片を作製し、移植片内の細胞が骨芽細胞へ分化した可能性を示唆した。しかし、細胞を培養皿に播種した後、細胞シートを作製するまでに4週間の期間を要するため、作製期間の短縮化が課題であった。

本研究の目的は、移植片として使用できる厚みを持つ細胞シートの作製と作製期間の短縮化、および作製後の経時的変化を組織、免疫組織化学的に検索することである。

HABPCs を24穴の温度応答性培養器材へ初日と7、11日後に同じウェル上に 3.6×10^4 cells/ml の濃度で播種した。15枚の他のウェルから回収した細胞シートを一箇所の細胞シート上に積層し、HABPC 積層細胞シートを作製した。HABPC 積層細胞シートを1、3、5日培養し(各 $n=5$)、HE染色、alkaline phosphatase (ALP) 染色、von Kossa 染色による組織学的検索、およびI型コラーゲン (Col-I)、オステオポンチン (OPN)、オステオカルシン (OC)、 runt-related transcription factor 2 (Runx2) による免疫組織化学的検索を行った。

作製された HABPC 積層細胞シートは、内部の細胞シート同士の結合が不十分な空隙が認められ、それは経時的に狭小化した。このことは、積層細胞シート内部における HABPCs の増殖や、細胞外基質の産生によるものであると考えられた。ALP、Col-I、OPN、OC、Runx2 染色像より、積層細胞シート表層から HABPCs の分化が促進され、シート内部の骨形成能が3日目から5日目にかけて上昇したことが示唆された。von Kossa 染色では3日目より石灰化様組織の形成が認められた。

本研究により、単独で移植が可能と思われる十分な厚みを持った HABPC 積層細胞シートの作製方法が確立された。また、以前の研究と比較し、半分の期間の2週間で細胞シートを作製することが可能となった。作製した HABPC 積層細胞シートは、石灰化誘導物質を添加していない通常の培地による培養において、石灰化様組織の形成が起こったことが確認された。今後はより長期間の培養を行い、その経時的変化について検索する必要がある。

本研究により、HABPC 積層細胞シートの臨床応用に向けた基礎的研究結果が示唆された。