

Scaffold-free bone-like 3D structure established through osteogenic differentiation from human gingiva-derived stem cells

豊田, 真顕

<https://hdl.handle.net/2324/7329441>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 : Creative Commons Attribution 4.0 International



氏 名	豊田 真顕			
論 文 名	Scaffold-free bone-like 3D structure established through osteogenic differentiation from human gingiva-derived stem cells (ヒト由来歯肉幹細胞を用いた、骨分化誘導による足場不要三次元骨様立方構造物の作製)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	山座 孝義
	副 査	九州大学	教授	重村 憲徳
	副 査	九州大学	教授	前田 英史

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

歯周炎による歯槽骨吸収の自然治癒は困難である。そのため、失われた歯槽骨の回復には骨造成法による歯周組織再生療法が施されている。最適な移植材は自家骨と言われているが、口腔内からの自家骨採取量が限られるため、適応となる症例は少ない。本研究では、口腔内より容易に採取が可能であり、骨芽細胞分化能を示すヒト歯肉由来幹細胞に着目し、バイオ 3D プリンターを用いた三次元石灰化立体構造物の作製を試み、自家骨の代替材料としての可能性を探った。

まず、ヒト歯肉由来幹細胞を細胞低吸着処理 96 プレートに 1 ウェル当たり 4.0×10^4 細胞を播種し、直径約 $569.5 \mu\text{m}$ のスフェロイドを作製した。作製したスフェロイドを用いて凍結切片を作製し、免疫蛍光染色を行なった。間葉系幹細胞のマーカーである CD73 に陽性を示し、CD34 には陰性を示した。また上皮間葉転換マーカーであるビメンチン、細胞外基質成分であるファイブロネクチンに陽性反応を示した。これらスフェロイドを骨形成誘導し、石灰化組織形成能を解析した。マイクロ CT 解析により、このスフェロイドが海綿骨と同等の石灰化物であることが確認された。アリザリンレッド染色によりカルシウムの沈着が、フォン・コッサ染色によりリン酸の蓄積が認められた。したがって、ヒト歯肉由来幹細胞のスフェロイド体が石灰化することを確認した。

次に、バイオ 3D プリンターにて三次元細胞構造物の作製を行なった。このバイオ 3D プリンターの使用によって、ヒト歯肉由来幹細胞より作製されたスフェロイドをステンレス針からなる装置（剣山メソッド）にリング状に積層した。その後、剣山上でこの積層したスフェロイド同士が結合し、生体外材料を一切用いることなく三次元細胞構造物の作製に成功した。この三次元細胞構造物を用いて骨形成誘導を行なった。マイクロ CT 解析、アリザリンレッド染色、フォン・コッサ染色により、三次元細胞構造物の内部に均一な石灰化組織が形成されていた。さらに、免疫蛍光染色でこの三次元細胞構造物における後期骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシンの発現を解析した。三次元細胞構造物の内部の石灰化組織においてオステオカルシンが発現していた。

本研究では、ヒト歯肉由来幹細胞のスフェロイドからバイオ 3D プリンターを使用して作製した石灰化立方構造物が歯周組織再生療法における自家骨の代替材料となる可能性を示し、今後、動物への移植実験などでの検証を経ることで、歯肉由来幹細胞を用いた歯周組織再生療法の臨床応用への糸口となる可能性を示唆した。したがって、本研究は、ヒト歯肉由来幹細胞より作製したスフェロイドを用いて石灰化立体構造物の作製に成功した点に関する有意義な知見を得られた点に新規性があり、博士（歯学）の学位論文に値すると認める。