

氏名(本籍) : 岩間張良

学位の種類 : 博士 (歯学) 学位記番号 : 歯博第589号

学位授与年月日 : 平成24年3月27日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : ハニカム状多孔質膜を用いた機能的スキャフォールドの歯周組織再生への応用

論文審査委員 : (主査) 教授 島内英俊

教授 鈴木 治 教授 笹野泰之

論文内容要旨

再生医療の基本概念であるティッシュエンジニアリングの概念では、細胞、サイトカインなどの成長因子、および細胞接着の足場であるスキャフォールドの3つの因子が相互に作用することで、失われた組織を再生するとされている。近年、細胞がスキャフォールドの形状・空間配置・硬さを認識して自らの機能を変化させることが明らかになり、スキャフォールド自体の細胞機能制御作用に注目が集まっている。

これまでの研究では、リソグラフィーなどの手法によって作製された微細形状や、不規則な多孔質形状を持つスキャフォールドを用いて細胞培養が行われてきた。しかしながら、生体内でスキャフォールドの役割を果たす細胞外マトリクスは3次的に細胞を包み込む形で各細胞を支えている。このことから、スキャフォールドによる細胞機能制御を達成するには、細胞サイズのマイクロメートル単位で、かつ3次的に形状を制御されたスキャフォールドが必要であると考えられるが、未だ実用的な研究がなされていない。

東北大学の下村らは、自己組織化によって作製されるハニカム状多孔質膜(ハニカムフィルム)を報告している。ハニカムフィルムには、3次的なピラー構造をもつ均一な多孔構造を有するという特徴がある。本研究では、このハニカムフィルムをスキャフォールドとして用いることで、3次的な生体内の環境を模倣する機能的スキャフォールドの可能性につき検討した。

抜去歯から剥離し3~5代継代して得たヒト歯根膜由来細胞を、poly(ϵ -caprolactone)(PCL)、polystyrene(PS)製ハニカムフィルム(孔径5 μ mおよび10 μ m)、同素材(PCL, PS)製フラットフィルム、およびガラス基板上に播種し、培養後における細胞の挙動や機能を観察した。

その結果、フラットフィルム上では長期間の培養により細胞がスキャフォールドより剥がれた。しかしながら、ハニカムフィルム上では細胞が各形状によって挙動を変え、孔径10 μ mのハニカムフィ

フィルム上では細胞が重層化した組織を形成した。培養4週間後では、孔径10 μ mのPSt製ハニカムフィルム上の細胞群からガラス上と比べて多量のオステオカルシン(OCN)とオステオポンチン(OPN)の発現が見られ、カルシウムの産生も観察された。

本研究により、ハニカムフィルム上で培養された歯根膜由来細胞は、フィルムの孔径、材質によって細胞挙動を変化させることが明らかとなり、特に孔径10 μ m、PSt製ハニカムフィルム上で培養した場合には、細胞増殖因子を添加することなく歯根膜由来細胞を硬組織形成細胞へと分化を誘導する可能性が示され、ハニカムフィルムは細胞の機能を制御する機能的スキャフォールドとなり得ることが示された。

審 査 結 果 要 旨

再生医療の基本となるティッシュエンジニアリングにおいては、細胞、サイトカイン(成長因子)、そして細胞の足場となるスキャフォールドの3大要素が必要とされる。歯周組織再生においては、サイトカイン療法および細胞治療に関する研究が進んでいるが、細胞の付着・増殖を促進し、かつ再生組織の形態誘導が可能なスキャフォールドは未開発である。近年、トポグラフィーの概念が導入されるようになり、形状、空間配置、硬さをコントロールすることで細胞機能を制御できるようなスキャフォールドの開発が行われるようになった。本研究は、三次元的な生体内環境を模倣可能な材料として期待されているハニカム状多孔質膜(ハニカムフィルム)を応用した新規歯周組織再生法の開発を目指して、*in vitro*において同フィルムを用いてヒト歯根膜細胞を培養し、細胞の増殖・分化に及ぼす影響を検討したものである。

実験には、下村らの方法によりpoly(ϵ -caprolactone)(PCL)あるいはpolystyren(Pst)を用いて作製したハニカムフィルム(孔径5および10 μ m)、同じ素材(PCLあるいはPst)で作られたフラットフィルムおよびガラス基板を供試した。各試料上にヒト歯根膜細胞を播種し、所定時間培養を行った細胞の挙動を多面的に検討した。その結果、フラットフィルム上で長期間培養を行った場合には、歯根膜細胞が剥離したのに対し、同じ素材で作られたハニカムフィルムではピラーに仮足を伸ばして接着し、時間とともにハニカム構造の内腔に侵入し始める様子がFE-SEMおよび共焦点レーザー顕微鏡で観察され、孔径10 μ mのフィルムでは内腔と表面の細胞が一体となって重層化した組織を形成した。またPst製(孔径10 μ m)ハニカムフィルム上で培養した細胞は、分化マーカーであるオステオポンチン(OPN)およびオステオカルシン(OCN)mRNAを強発現しており、タンパクレベルでOPN産生が確認されるとともに、培養4週間後には石灰化組織をvon Kossa染色で検出した。これらの知見から、ハニカムフィルム上で培養された歯根膜細胞はフィルムの孔径・材質によって細胞の挙動を変化させて、細胞の自己組織化のみならず硬組織形成細胞への分化を誘導できることが明らかとなった。

以上示してきた通り、本研究は、細胞増殖因子を添加することなく、細胞の増殖・分化の誘導が可能な機能性スキャフォールドとしてのハニカムフィルムの可能性を示したものであり、同フィルムを用いた新規歯周組織再生治療開発の端緒となるものである。よって本審査委員会は岩間張良君の提出した論文を博士(歯学)の学位に相応しいものと判断する。