

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙	第 号	論文提出者名	今西悠華
論文審査 委員氏名	主査 武部 純 副査 前田初彦 河合達志			
論文題名	歯髄幹細胞由来 extracellular vesicles の骨 組織再生における有効性について			

インターネットの利用による公表用

細胞・組織を損傷部位に移植することで機能回復を図る再生医療が注目されている。特に間葉系幹細胞 (MSCs) の移植は、歯科領域においても臨床研究が行われ、補綴歯科領域に関わる研究としては顎骨欠損部の再生を目指した研究が報告されている。さらに、MSCs に由来する細胞外小胞 (MSC-EVs) が免疫調節作用や組織再生作用に重要な役割を担うことが明らかとなっている。MSCs の一種である歯髄幹細胞 (DPSCs) は再生医療の細胞源として期待されているが、歯髄幹細胞由来細胞外小胞 (DPSC-EVs) を用いた研究は、骨髄や脂肪組織に由来する MSC-EVs の研究と比較すると報告が少なく、その特性等については不明な点が多い。そこで本研究では、DPSC-EVs が骨創傷治癒において DPSCs の持つ骨組織再生促進効果の一因であるとの仮説を立て、DPSC-EVs の有効性を解明するために DPSC-EVs を用いたラット頭蓋骨欠損モデルによる *in vivo* 実験系を構築し、骨組織形成能について検討している。

本研究では、6週齢雄性SDラットの中切歯より歯髄組織を採取してDPSCsを分離、培養、同定後、DPSCsよりDPSC-EVsを抽出している。そして、11週齢雄性SDラットの頭頂骨両側に骨欠損部を形成し、足場材料としてcollagen (Col)、 β -tricalcium phosphate (β -TCP)、hydroxyapatite (HA)を移植後、DPSC-EVsを投与またはDPSCsを移植して実験を行っている。術後4週にマイクロCTによる硬組織形成状態の形態計測と定量分析、術後16週にHE染色と酵素抗体法によるOsteocalcin免疫染色を行い、骨組織観察

を行っている。

これらの実験の結果、以下の所見を得ている。

硬組織形成の観察では、移植側において DPSC-EVs/Col と DPSCs/Col は骨欠損部辺縁および内部に不透過像が認められた。DPSC-EVs/ β -TCP、DPSC-EVs/HA、DPSCs/ β -TCP、DPSCs/HA は、骨欠損内部に顆粒状の不透過像、骨欠損部辺縁に不透過像が認められた。定量分析により、DPSC-EVs/Col、DPSCs/Col において新たに形成された不透過像体積は、対照側の生理食塩水と比較して有意に増加した。DPSC-EVs/Col は DPSCs/Col との比較において有意差を認めなかった。HE 染色像の骨組織観察により、移植側において DPSC-EVs/Col は骨欠損部辺縁および内部に新生骨の形成が認められた。DPSC-EVs/ β -TCP は骨欠損部辺縁に新生骨形成、DPSC-EVs/HA は骨欠損内部に HA 顆粒および骨欠損部辺縁に新生骨が認められた。Osteocalcin 免疫染色を行った結果、DPSC-EVs/Col では骨欠損部辺縁および内部に新生骨の形成が認められた。

MSCs 由来の EVs は、I 型 collagen や細胞外マトリックスタンパク質に直接結合すること、collagen は EVs の保持と安定性を高めることが報告されている。したがって、本研究においては、DPSC-EVs/Col 移植により骨欠損部の辺縁および内部に新生骨が確認されたことは、DPSC-EVs を collagen と併用することで DPSC-EVs の効果を持続させ、骨欠損部周囲の幹細胞の生着を促し、 β -TCP および HA には認められなかった骨欠損内部からの骨組

組織再生を促進したためと考えられる。また、DPSC-EVs の miRNA はマクロファージの極性化に影響を及ぼし、マクロファージをより抗炎症性の表現型に切り替えることが報告されている。本研究は、ラット頭頂骨欠損部へ DPSC-EVs/ 足場材料を移植し、術後 16 週において組織学的評価を行ったものであり、DPSC-EVs と collagen の併用により新生骨の形成を明らかにした内容である。さらに、本研究は DPSCs の骨組織再生促進の作用機序を解明する一助となり、DPSC-EVs を用いた骨組織再生治療への可能性を示す重要な知見を有している。

結論として、マイクロ CT および定量解析の結果から、DPSC-EVs/Col は骨欠損部位において DPSCs/Col と同等の効果が認められ、さらに、組織学的評価により DPSC-EVs/Col は collagen 単体移植と比較して新生骨の形成が認められたことから、DPSCs の骨組織形成作用の一因には DPSC-EVs が関与していることが明らかとなった。

本研究より、DPSC-EVs を応用した骨組織再生治療への有効性が示唆され、歯科補綴学、口腔病理学、歯科理工学、及び関連諸学科に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。