

論文審査の要旨

報告番号	㊦・乙 第 2981 号	氏名	吉田 寛
論文審査担当者	主査 教授 美島 健二 副査 教授 代田 達夫 副査 教授 馬場 一美		
(論文審査の要旨)			
<p>学位申請論文「Bone regeneration using neural crest-derived cells in the nasal conchae」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>未分化な状態で体内各所に潜伏する神経堤由来細胞（以下 NCDCs）は、再生医療の細胞ソースとして期待されており、鼻甲介に高密度に局在することが報告されている。本研究では、鼻甲介由来の NCDCs の骨欠損修復能について解析がなされた。P0-Cre/CAG-CAT-EGFP 成体マウス（以下 P0 マウス）の鼻甲介から GFP 陽性細胞として採取された NCDCs は、各種分化誘導培地により骨芽細胞様細胞、軟骨細胞様細胞および脂肪細胞様細胞への分化が確認された。また、NCDCs をアテロコラーゲンと共にマウスの頭頂部に作製した骨欠損部位に移入すると、μCT 上では不透過像が確認され、骨による修復が認められるものの、アテロコラーゲンのみの移入群と比較して修復量に有意な差を認めなかった。組織学的解析では、骨組織の形成が担体内に認められたが、明らかに NCDCs 数に減少がみられた。ラマン分光法では、NCDCs を含む担体は既存の骨に近いリン酸基/アミド III 基のピーク比を示し、担体のみと比較して高い石灰化度を示した。鼻甲介由来の NCDCs は移植後 12 週間によって既存の骨に近い石灰化度を有することから、顎顔面領域より低侵襲に採取できる細胞ソースとして硬組織再生療法に応用できることが示唆された。</p> <p>本論文の審査において、副査の代田委員および馬場委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p>代田委員の質問とそれらに対する回答：</p> <p>1. 神経堤由来細胞の骨形成能を評価する際に、対照として大腿骨骨髓由来細胞など他の細胞を用いなかった理由について述べよ。</p> <p>（神経堤由来細胞の骨形成能を評価するにあたり、担体のみによる影響について解析する必要があると考え、担体及び神経堤由来細胞による評価を行った。担体のみだけであっても欠損部の骨再生が認められ骨再生量に有意な差を認めなかったことから、組織再生量は担体に依存し、骨質についての解析が重要であると考えた。これは、幹細胞が存在することによってパラクリン因子が関与しているとの考えである。今回ラマン分光法によって骨質に変化を認めたため、今後骨髓由来幹細胞や線維芽細胞のセルラインとの比較も必要ではないかと考えている。）</p> <p>2. 未分化な神経堤由来細胞ではなく、担体と共存培養させて骨芽細胞様細胞に分化させてハイブリッド人工骨として移植する方法は考えなかったのか。</p> <p>（今回データを示さなかったが担体内での培養については検討しており、担体内に播種した神経堤由来細胞を培養すると、スポンジ内部の径が大きいため担体内部から細胞が漏出しており、また長期経</p>			

過によりスポンジ内部で細胞が壊死している可能性があった。効率的な骨再生を目的とする場合には、ゲルの濃度、培地の組成など、培養方法を検討する必要があると考えた。）

3. 担体にコラーゲンを選択した理由を説明せよ。

（本実験に用いたコラーゲンスポンジは細胞の播種性、操作性に優れており、コラーゲン培地とともに填入することでスポンジ内に均一に細胞を播種することができ、また骨欠損部に適した形状に加工が容易であることが挙げられる。加えてマトリゲルや凍結コラーゲンゲルでは細胞の流出が起きてしまうと考えた。文献的考察によれば、I型コラーゲンスポンジ内に細胞を填入することにより、石灰化を誘導したと報告もある[5]。また、コラーゲンスポンジ自体はX線の透過性を持つため、CTを用いた評価を行う際に、細胞による影響をより判断しやすいと考えた。）

馬場委員の質問とそれらに対する回答：

1. 採取するマウスを成体ではなく幼若期にした場合、増殖能や分化能に変化がみられるか。みられる場合はどのような変化が予想されるか。

（過去の報告によるとヒト骨髄幹細胞において、細胞分化能はドナー年齢に依存せず、細胞増殖能はドナー年齢に依存し増強されるとの報告があり、アカゲザルにおいても血液幹細胞において同様な結果を示す報告がある。よってNCDCsにおいても同様に増殖能は幼若期で増強され、分化能に変化がないと考える。）

2. 細胞移植群で再生された骨の由来は、NCDCsと宿主由来どちらと考えるか。またその説明を述べよ。

（多くの文献的考察から、再生骨は欠損部周囲から内部へ向かって再生する様子が観察され、幹細胞が分泌するパラクリン因子によって再生修復に影響を及ぼすとの報告も見られる。また今回のNCDCsをマーキングしたPKH26抗体の結果から、NCDCsは担体内で貪食されている可能性が高く、宿主由来の細胞が骨再生修復の多くに携わっていると考えられる。）

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 美島委員の質問とそれらに対する回答：

1. マウスの甲介とヒトの甲介の解剖学的な違いについて述べよ

（著書によると、ヒト下鼻甲介は明確に上鼻甲介、中鼻甲介、下鼻甲介の3つに分かれているが、マウスの場合は腹側鼻甲介、背側鼻甲介の2つに分かれており、また外側内包、正中内包、内側内包を作るように3つに分かれている。構造はほぼ同じといえる。）

2. Scaffoldとしてアテロコラーゲン以外に何が考えられるか述べよ

（過去の報告によるとフィブリンシーラントやポリL乳酸、OCP、ハイドロゲルなどが挙げられる。）

3. 今回の実験では、骨芽細胞に誘導しないで移植に用いているが、その意義は何かあるか述べよ。

（今回神経堤由来細胞を骨芽細胞へ誘導を確認した際、20日程度の期間を有し、過去の報告から骨髄幹細胞を用いて3週間の誘導が必要であったことが報告されている。これらのことから、臨床へ応用する際、培養状態から移植時で期間をあけることなく使用すると仮定すると、幹細胞状態のまま填入する方法が有用であると考えた。）

主査の美島委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。

（主査が記載）