

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
佐々木 朗 印	研究総括、総合的指導
松本 卓也 印	研究方針、実験、論文作製指導
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 病態制御科学専攻	身分 大学院生	氏名 角谷 宏一
論文題名 細胞由来ナノフラグメントを用いた初期海綿骨形成の再現		
論文内容の要旨 (2000字程度) 【緒言】 人間の体を支持する骨組織は、リン酸カルシウムを主体とした無機成分とコラーゲンなどの有機成分により構成される。骨組織は構造内の骨細胞をはじめとして、骨芽細胞および破骨細胞など種々の細胞によって形態および機能が維持されており、それらの相互作用により絶えず変化する複雑な組織である。骨組織はその構造から、外層を覆う皮質骨と複雑な多孔構造を呈する海綿骨に分類される。特に海綿骨はその特徴的な多孔構造から、造血幹細胞をはじめとした幹細胞ニッチェや悪性腫瘍の骨転移など、生命活動において重要な役割を担うことが知られている。これらのことから、海綿骨特有の組成や多孔構造を <i>in vitro</i> で再現することで、幹細胞ニッチェ理解のための骨髄組織モデルや悪性腫瘍転移の疾患モデルなど、生命科学に有用な様々な研究モデルシステムの構築につながると考えられる。これまでに行われた海綿骨発生過程を材料学的なアプローチから再検討した研究の結果、マウス大腿骨遠位端における二次骨化中心付近において、肥大軟骨細胞は外部からの機械的刺激により破裂を起こし、細胞膜由来リン脂質および膜タンパク質から成る微細な断片 (細胞ナノフラグメント) が形成されることが明らかになった。さらに、その後の海綿骨形成過程を観察した結果、このリン脂質を主体とする細胞ナノフラグメントが初期海綿骨形成の核となり、骨石灰化および初期海綿骨形成が始まることが明らかになった。そこで本研究では、細胞ナノフラグメントに着目し、この細胞ナノフラグメントからの石灰化物形成ならびに三次元構造体形成を行い、初期海綿骨を <i>in vitro</i> にて再現することを試みた。 【材料と方法】 1. マウス大腿骨遠位端初期海綿骨の観察 本実験ではまず、 <i>in vitro</i> における海綿骨再現の参考とするためマウス大腿骨遠位端に存在する二次骨化中心における最初期の石灰化物の観察を行った。生後8日齢マウス大腿骨遠位端を摘出し、次亜塩素酸処理により有機物を除去した後、同部に形成された石灰化物を取り出した。その石灰化物をオスミウムでコーティングし、走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。		

2. ナノフラグメント作製

先行研究より、細胞膜断片であるナノフラグメントを用いた石灰化物の形成は、マウス軟骨前駆細胞である ATDC5 を用いた研究において、*in vitro* で再現可能であることがわかっている。その為今回の研究でも同様に、超音波破碎によって ATDC5 を破碎しナノフラグメントを作製した。

3. 三次元構造体作製

作製したナノフラグメント由来石灰化小球を遠心分離を用いて回収し、3D プリンターで作製した鋳型に充填した後、凍結乾燥を用いて三次元構造体を作製した。

4. 細胞親和性試験

マウス大腿骨髄由来細胞を用いて細胞との親和性を検討した。作成した三次元構造体に、骨髄由来細胞を 1.0×10^5 個の細胞を播種し、DMEM を用いて2週間培養を行った。培養後4%パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて固定を行い、パラフィンに包埋後切片を作製した。HE 染色を用いて細胞の接着および培養後の構造体の形態評価を行った。

【結果】

マウス大腿骨遠位端に形成された初期海綿骨は多孔構造を呈しており、高倍率では石灰化小球が積層して構造を形成する様子が観察できた。獲得した細胞ナノフラグメントと塩化カルシウムを混和することで、*in vivo* で観察されたものと同様の石灰化小球の形成に成功した。この石灰化小球は本研究で観察した初期海綿骨の石灰化小球と形、サイズのほぼ同一であり、これは過去の報告と一致した。本実験において、生成した石灰化小球を回収し、プラスチック鋳型を用いて凍結乾燥を利用することで三次元化および多孔化に成功した。この多孔化材料は原料となった石灰化小球の積層物により形成されていた。細胞親和性試験では、細胞の表面および内部において細胞の接着を認めており、細胞培養可能な構造体であることが確認された。また培養後も三次元構造体は多孔構造を維持していた。

【考察】

本研究では細胞ナノフラグメントを起点材料として海綿骨と同様の石灰化小球形成さらには海綿骨と同様の三次元構造体の作製に成功した。*In vitro* での海綿骨様モデルシステムにおいて、作製した材料は細胞との親和性および分解産物に為害性がないことが必要とされる。本研究における材料は細胞を超音波によって破碎した物質を原料としており、細胞に対する為害性は少ないものと考えられる。マウス骨髄由来細胞を用いた親和性試験においても表面および内部で細胞の接着が確認できており、材料の親和性および細胞に対する為害性はないと考えられた。一方で本材料の有する細孔のサイズに関しては課題を有している。これまでに、スキャホールド材料の細孔密度およびサイズが細胞の成長に影響を与えていることが報告されている。さらにスキャホールド内部への血管新生も細孔サイズが影響を与えており、細孔サイズの増大に伴い血管の有意な新生量が認められたという報告もある。これら細孔サイズの制御は今後の検討課題である。