The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	フィブリンゲル材料の高次機能化と骨芽細胞操作への応用
Author(s)	佐々木, 淳一
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49802
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【12】

氏　　名	佐々木　淳　一（さささき　じゅん　いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２２８３４　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**フィブリンゲル材料の高次機能化と骨芽細胞操作への応用**
論文審査委員	（主査） 教　授　荘村　泰治 （副査） 教　授　矢谷　博文　　准教授　今里　　聡　　講　師　佐藤　　淳

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

組織工学的手法を応用し生体内組織の代替や機能修復を目指す試みは，これまで多く報告され，各種生体材料のスキャフォールドとしての有効性が検討されてきた．近年，細胞，生体組織との親和性や物理化学的修飾の容易さからゲル材料の利用が注目されており，その中でも自己血から精製が可能で生体吸収性にも優れるフィブリンゲルは理想的な移植用生体材料として期待されている．また，下顎骨や大腿骨などの骨組織は皮質骨と呼ばれる強い異方性を有する組

織によって囲まれていることが知られている．すなわち，骨組織局所にかかる力に応じた基質の三次元的な一軸配向が認められる．この骨組織特異的な基質の三次元的一軸配向を移植前の細胞/スキャフォールド複合体において達成できれば，形態的にも機能的にも優れた骨組織の再生や骨組織再生期間の短縮などが期待できる．この *in vitro* における組織配向性の達成のためにはスキャフォールド内での三次元的細胞配置，配向の制御や細胞増殖，細胞分化といった細胞機能制御(細胞操作)を可能にするようなスキャフォールドの高次機能化が不可欠である．

そこで本研究では，生体高分子ゲルであるフィブリンゲルを用い機械的因子を応用し，細胞配向性を考慮した骨芽細胞操作技術の確立を目指した．

【方法】

フィブリンゲルはフィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液の混合溶液を長さ 10 mm，直径 6 mm のシリコーンモールドに流し込み，37℃で 30 分間静置して作製した．フィブリンゲルの内部トポグラフィー制御を目的に，フィブリンゲルに対してカスタムメードの伸展装置を用いて一軸方向に持続的な伸展を加え，それによるフィブリンゲル構成線維の構造変化について走査型電子顕微鏡(SEM)，原子間力顕微鏡(AFM)，光学顕微鏡を用いて観察した．この伸展フィブリンゲル内における骨芽細胞動態を観察するために，マウス由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を含有させた伸展フィブリンゲルを作製し，光学顕微鏡，SEM，ヘマトキシリン・エオジン染色，細胞核染色を行った．次に，伸展フィブリンゲル内骨芽細胞の機能制御を目的として，異なる伸展割合を与えたフィブリンゲル内の骨芽細胞における細胞増殖，細胞分化について検討した．細胞増殖は試料をトリプシン処理後，ヘモサイトメーターを用いて細胞数を計測した．細胞分化は Real time RT-PCR 法を用いて骨関連遺伝子であるオステオポンチン(OPN)，オステオカルシン(OC)の mRNA 量を定量することにより検討を行った．さらに，伸展フィブリンゲル内における骨芽細胞由来細胞外基質および無機沈着の分布を検討するために骨芽細胞含有伸展フィブリンゲルをパラフィン包埋後，薄切切片を作製し，Type I collagen の蛍光免疫染色，von Kossa 染色を行った．

【結果および考察】

SEM および AFM 観察の結果，フィブリンゲルは伸展を加えることによってフィブリン細線維が伸展方向と平行に配向，凝集し，複数の線維束を形成すること，また，その線維束も伸展方向と平行に配向することが明らかとなった．さらに，伸展割合を増加させるにしたがって，形成される線維束の幅径が減少することが明らかとなった．

フィブリンゲル内に播種された骨芽細胞の光学顕微鏡および SEM による観察の結果，伸展フィブリンゲル内において，骨芽細胞は線維束間のみに存在し，三次元的に伸展方向と平行に配向することが明らかとなった．細胞核染色の結果から，伸展フィブリンゲル内において細胞増殖は伸展方向と同一方向に制限されていることが明らかとなり，ゲル内に播種された骨芽細胞は三次元的に伸展方向と平行な一軸状の細胞群を形成することが認められた．さらに，Type I collagen の蛍光免疫染色，von Kossa 染色の結果から，伸展フィブリンゲル内における細胞外基質，無機沈着の配向が観察された．これらのことから，この伸展フィブリンゲル内での骨芽細胞の三次元的配置，配向制御を達成することで，細胞から産生される細胞外基質や無機沈着の三次元的配置の制御が可能になることがわかった．

伸展フィブリンゲル内の細胞は，ゲル伸展割合を増加させることで細胞増殖が促進し，逆に伸展割合を低下させることで細胞分化が促進することが示された．また，培養期間途中にフィブリンゲルの伸展割合を低下させると，伸展割合を維持したままのゲルと比較して，ゲル内部での石灰化を早期に誘導できた．この結果から，伸展割合を変化させることで伸展フィブリンゲル内細胞の機能制御が可能になることが示された．

以上のことから，本研究においてフィブリンゲルへの伸展負荷という物理的因子を応用することで，細胞および細胞外基質の三次元的配置，配向制御，さらには細胞機能制御を達成した．本技術は骨組織再生に向けた新しい機能性細胞/スキャフォールド複合体作製法として有効であることが示唆された．

論文審査の結果の要旨

本研究では，細胞を播種したフィブリンゲルスキャフォールドに一軸伸展を加えることで，ゲル内細胞や基質の三次元的配向および細胞の機能制御を試みた．

その結果，ゲルの内部トポグラフィーを制御することで，ゲル三次元空間内における細胞の一軸配向とコラーゲンおよび骨基質の配向を実現し，さらにゲル内細胞の増殖と分化機能を制御すること可能となった．

以上の結果は，新規骨再生技術を開発するうえで有益な示唆を与えるものであり，博士(歯学)の学位請求に値するものと認める．