

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	後藤 亮真
論文審査 委員氏名	主査 三谷 章雄 副査 河合 達志 野本 周嗣		
論文題名	Ge1MA を応用した新規骨芽細胞移植法による 骨再生療法の基礎研究		

インターネットの利用による公表用

ティッシュエンジニアリングの重要な 3 つの要素は細胞、成長因子、足場の 3 つである。その中で足場は、細胞の 3 次元環境やコロニーを形成するために重要である。本研究では足場材料として用途が高く安全性の高い光重合可能な材料である、Gelatin methacryloyl (GelMA) に着目した。一般的に GelMA ハイドロゲルは UV によって励起される光感受性物質の存在下で硬化する。しかし、UV 照射は、細胞に損傷を引き起こす可能性がある。そこで、細胞に対する為害作用を減少させるため、可視光線によって励起される光感受性物質のリボフラビン (RF) に着目した。本研究は光重合開始剤の RF を用い硬化する新しい GelMA ハイドロゲルを用い、骨芽細胞の分化誘導に与える影響を検討した。

まず、GelMA 溶液に DMEM 培地を加え、光感受性物質であるイルガキュア 2959 (IR)、RF をそれぞれ加え、37°C で 20% GelMA-RF 溶液、20% GelMA-IR 溶液を作製し、シリコンモールドに流し込み、UV 照射、可視光線照射にて光重合を行った。作製した GelMA-IR と GelMA-RF ハイドロゲルの圧縮弾性率を、インストロン万能試験機を用いて細胞の非存在下で 1 分あたり 20% の変形速度で荷重を測定した。圧縮弾性率は 5~10% の変形領域の勾配から算出した。次に、KUSA-A1 細胞を、骨分化誘導培地中で 7 日間培養し、アリザリンレッド染色を行った。GelMA-IR、GelMA-RF ハイドロゲルに内包した KUSA-A1 細胞を DMEM 培地にて培養し 1 日後、細胞生存率を調べた。

GelMA-RF 溶液に KUSA-A1 細胞を懸濁し、セルカルチャーインサート内で、可視光線照射器にて光重合後、DMEM 培地及び骨分化誘導培地にて 1 週間培養した。その後、細胞の total RNA を抽出し、cDNA を合成した。

PCR は、StepOne Real-Time PCR System を使用しデータ解析は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いた。

GelMA-RF 溶液の濃度を 20%にし、60 秒間可視光線照射することで透明かつシリコンモールドから外すことができ、GelMA ハイドロゲルの硬化条件が明らかになった。GelMA-RF ハイドロゲルと GelMA-IR ハイドロゲルの圧縮弾性率を比較したが、有意な差は見られなかった。条件設定した 20%GelMA-RF ハイドロゲルの圧縮弾性率は、約 16kPa で、過去の報告より 3 次元環境における骨芽細胞の分化に適した硬さであった。

GelMA ハイドロゲル内に KUSA-A1 細胞を内包し 1 日培養後の細胞生存率を比較した結果、GelMA-RF ハイドロゲルに内包した KUSA-A1 細胞の方が有意に高い細胞生存率を示した。RF、IR は生体に悪影響を及ぼさない物質であり、UV 照射と比較し、可視光線照射は細胞生存率が優位に高く、可視光線照射を用いた方法は骨芽細胞に対して為害性が少ないことが示唆された。

PCR 解析の結果、2 次元環境下で骨分化誘導した KUSA-A1 細胞は、Bsp の発現が著しく高かった。3 次元環境下である GelMA-RF に内包された KUSA-A1 細胞を分化誘導培地にて培養した場合、骨芽細胞分化後期に発現する Bsp、

(論文内容の要旨)

No. 3

愛知学院大学

Ocn の遺伝子発現が特に強く認められ、骨芽細胞分化初期に発現する Runx2 と Osx の発現が低かった。また、GelMA-RF ハイドロゲル内で培養された KUSA-A1 細胞は、日を追うごとに凝集しスフェロイド状を示し、骨芽細胞が分化し成熟した可能性が示唆された。

本研究では可視光線にて形成した GelMA-RF は、骨再生における新しい、より安全な足場材料として有用であることが示唆された。

以上より、本研究は歯科保存学、外科学、歯科理工学をはじめとする関連諸学科に寄与するところが大きく、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。