

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	Ahmed Mohammed Ali Hussain
論文題目	Magnesium Calcium Phosphate as a Novel Component Enhances Mechanical/Physical Properties of Gelatin Scaffold and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells （リン酸マグネシウムカルシウムは、ゼラチンスキャフォールドの機械的・物理的性質を強化し、骨髄由来間葉系幹細胞の骨分化を促進する）		
（論文内容の要旨） 外傷、腫瘍切除などによる広範な骨欠損は、臨床上、その対応に苦慮することが多い。現在までのところ、様々なスキャフォールドの開発が試みられてきたが、理想的な生体材料の開発には至っていない。本研究の目的は骨再生治療に適した新たなスキャフォールドを開発することであり、リン酸マグネシウムカルシウム（Magnesium Calcium Phosphate :MCP）を含有するゼラチンスポンジ内の骨髄由来間葉系幹細胞（Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells :BMMSCs）の生物学的挙動を評価するとともに、物理的および機械的性質についての検討を行った。 本研究では、それぞれMCP を 0、25、50、75、90%含有する等電点 9.0 のゼラチンスポンジを調製した。スポンジの内部構造を走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope: SEM）を用いて評価し、気孔率、孔径の平均値、圧縮弾性率を算出した。BMMSCsは、3週齢の雄性Fisher 344 系ラットの大腿骨から採取し、3 世代継代培養したものを使用した。5×10⁵個のBMMSCs細胞懸濁液 50 μLを攪拌播種法により円筒型のゼラチンスポンジ（8mm×1.25±0.25mm）に均等に播種し、骨分化用培地を用い培養した。6 時間培養後にゼラチンスポンジを固定・脱水・乾燥させたのちSEMで観察した。MCPを添加したゼラチンスポンジの体積変化は、基準となるスケールとともに連続写真を撮影することにより計測した。ゼラチンスポンジに付着しているBMMSCs数は、DNA量を蛍光定量することにより算定した。MSCの骨分化は、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase: ALP）活性およびオステオカルシン含有量にて評価した。 MCP の添加は、ゼラチンスポンジの気孔率、孔径、BMMSCs の形態に悪影響を及ぼすことなく、圧縮弾性率を向上させることができた。この性質は、骨などの硬組織再生治療へ適していると考えられた。BMMSCs をゼラチンスポンジで培養した場合、BMMSCs の数は、MCP 含有量の増加に伴って増加した。MCP を多く含んだゼラチンスポンジほど圧縮弾性率が高く、変形が少ないため、細胞増殖できる多くの空隙が存在した。またその空隙により、酸素と栄養分にさらされる表面積が増加し、マグネシウムとカルシウムイオンの溶解により細胞増殖が促進されたためと考えられた。BMMSCs の初期の骨分化マーカーである ALP 活性は、MCP の含有量の増加に伴って上昇した。これは、骨分化を促進する作用を有するカルシウムとリン酸マグネシウムが存在したこと、更に、MCP 含有量増加に伴うゼラチンスポンジの圧縮弾性率の向上や微小な表面性状の粗造化が骨分化を促進した可能性が考えられた。後期の骨分化マーカーであるオステオカルシンの含有量はMCP 含有が少ないほど高値を示した。これは、後期には、圧縮弾性率の低い MCP 含有が少ないゼラチンスポンジほど、大きく収縮するため細胞増殖が制限され、細胞の密集により分化が促進したためと考えられた。また、高濃度のマグネシウムは、抗石灰化作用を有するオステオポンチン、マトリックス Gla タンパクの発現を増加させることにより後期の骨分化を抑制することが知られており、MCP の含有量の上昇によるマグネシウム濃度の上昇が後期において抑制的に働いたと考えられた。 今回ゼラチンに MCP 添加した新規のスキャフォールドの開発を行った。MCP			

含有により機械的特性が改善し、適度な多孔率と細孔径、および生体適合性を示した。MCP を 50%を含有するスキャフォールドが細胞増殖および骨形成分化の面で最も優れていることが明らかとなった。
（論文審査の結果の要旨） 申請者は骨再生治療に適した新たなスキャフォールドとして、リン酸マグネシウムカルシウム（MCP）を添加した新規のスキャフォールドの開発を行った。 MCP を 0、25、50、75、90%含有するゼラチンスポンジを調製し、スポンジの内部構造を走査型電子顕微鏡を用いて評価した。さらに骨髄由来間葉系幹細胞（Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells： BMMSCs）懸濁液を、攪拌播種法により作成したゼラチンスポンジに均等に播種し、骨分化用培地を用い培養した。MCP の添加は、ゼラチンスポンジの気孔率、孔径、BMMSCs の形態に悪影響を及ぼすことなく、圧縮弾性率を向上させることができた。初期の骨分化マーカーである ALP 活性は、MCP の含有量の増加に伴って上昇し、β -TCP 含有のゼラチンスポンジを用いて培養を行ったものより、有意に高値を示した。後期の骨分化マーカーであるオステオカルシンの含有量は MCP 含有が少ないほど高値を示した。結果として、MCP を 50%含有するスキャフォールドが細胞増殖および骨分化の面で最も優れていることが明らかとなった。さらにラットの頭蓋冠に骨欠損を作成し、MCP を 0、50、90%含有するスキャフォールドを用いて移植実験を行ったところ、in vitro の結果と同様に 、MCP を 50%含有するスキャフォールド移植群において、最も優れた骨修復を認めた。 以上の研究は骨欠損修復のためのスキャフォールドへの MCP 添加の有用性を示し、今後の骨再生治療の発展に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 2 5 年 2 月 2 0 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。