



Title	Fabrication and characterization of osteoconductive scaffold of recombinant peptide based on human collagen type I and β -tri calcium phosphate nanoparticles. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	降旗, 友和
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第13486号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74057
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Tomokazu_Furihata_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 降籬 友和

審査担当者 主査 教授 田村 正人
副査 教授 網塚 憲生
副査 准教授 菅谷 勉

学位論文題名

Fabrication and characterization of osteoconductive scaffold of recombinant peptide based on human collagen type I and β -tri calcium phosphate nanoparticles.

（ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチドと β -リン酸三カルシウムナノ粒子からなる骨形成スキャフォールドの作製および特性評価）

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。

ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチド（RCP）は、ヒト I 型コラーゲンを基に設計されたポリペプチドであり、高い細胞接着性や生体吸収性、加工性を有するとされている。また、 β 三リン酸カルシウム（ β -TCP）のナノ粒子は、細胞増殖性の向上や組織再生の促進に効果があると報告されている。そこで本研究では、RCP に β -TCPのナノ粒子を付着させた骨補填材（RCP-TCP）を作製し、*in vitro*で特性評価を行うとともに、ラット頭蓋骨に作製した骨欠損に移植して骨新生効果を検討した。

0.01, 0.1, 1, 10 wt%の β -TCPナノ粒子分散液を顆粒状のRCPに滴下して、それぞれRCP-0.01, 0.1, 1, 10TCPとし、PBSを滴下したものをRCPとした。各試料をSEM-EDXで分析した結果、 β -TCPナノ粒子分散液の濃度が高くなるにしたがって、 β -TCPナノ粒子の付着量が増加し、Ca, PのX線強度が高くなった。また、RCP, RCP-0.01TCP, RCP-0.1TCP, RCP-1TCP にMC3T3-E1細胞を播種してWST-8 activityによる細胞増殖性およびLDH activityによる細胞毒性を評価した結果、7日後の細胞増殖性はRCP-1TCPが他に比べて有意に高い値を示し、細胞毒性はRCP-1TCPがRCPに比較して有意に低い値となった。また、各試料上でMC3T3-E1細胞を24時間培養したところ、いずれの試料でもLIVE/DEAD染色で死細胞はほとんどみられず、F-Actin染色では良好な細胞付着が観察された。これらの結果から、RCPに β -TCPナノ粒子を付着させることは、細胞増殖を促進し細胞適合性を向上させる可能性が示唆された。また、リアルタイムPCR定量解析によるRunx2, ALP, BSPのmRNA発現は、RCPおよびRCP-1TCPで対照（plate）に比べ有意に高い値となった。このことから、RCPおよびRCP-1TCPには骨芽細胞の分化促進効果があると考えられた。

次に、ラット頭蓋骨に直径4.5mmの骨欠損を作製してRCPおよびRCP-1TCPを埋植、2, 4週後にマイクロCT画像の透過像面積を計測した。その結果、2週後はRCP-1TCPが対照（非移植）およびRCPに比較して有意に小さく、4週後はRCPおよびRCP-1TCPが対照に比較して有意に小さい値を示した。組織学的観察では、2週後、対照は欠損の大部分が結合組織で満たされていたのに対し、RCP及び

RCP-1TCP周囲には多核巨細胞様細胞が認められ、一部には新生骨様組織もみられた。4週後、対照では2週後と同様に欠損の大部分が結合組織で満たされていたが、RCPおよびRCP-1TCPでは新生骨様組織が増加しており、とくにRCP-1TCPでは骨欠損の大部分を新生骨様組織が満たしている標本もあった。骨形成率を計測した結果、RCP-1TCPは2, 4週において対照およびRCPと比較して有意に高く、RCPも4週後は対照と比較して有意に高い値を示した。

以上の結果から、RCP-1TCPは新たな骨補填材になる可能性が示唆された。

審査者から以下のような質問がなされた。

1. RCPの構造や特性はコラーゲンと比べてどのような違いがあるのか。
2. β -TCPナノ粒子分散液の濃度は10 wt%以上の濃度で行わなかったのはなぜか。
3. WST-8 activityおよびLDH activityでRCP-10TCPを除外したのはなぜか。
4. LIVE/DEAD染色, F-Actin染色における細胞形態の違いからどのようなことがわかるのか。
5. リアルタイムRT-PCRでRCPとRCP-1TCPの間に有意差がないので、 β -TCPナノ粒子は細胞分化に効果がないということか。
6. Image JによるマイクロCT画像の構築条件はどのようなものであったか。
7. 材料内部への細胞侵入性が低いのはなぜか。
8. RCPの分解, 吸収はどのように行われているのか。
9. 形成された新生骨は疎に見えるので強度が低いのではないか。

これらの質問に対して、申請者は適切に、かつ論理的に回答したことから、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は学位申請者が博士(歯学)の学位を授与されるに値するものと認めた。