HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Identifying bioactive properties of graphene oxide scaffold for bone tissue engineering therapy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	西田, 絵利香
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12155号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62172
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Erika_Nishida_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　西田　絵利香

審査担当者
主査　教授　川浪　雅光
副査　教授　土門　卓文
副査　教授　網塚　憲生

学　位　論　文　題　名

Identifying bioactive properties of graphene oxide scaffold for bone tissue engineering therapy

（　骨組織再生用酸化グラフェンスキャフォールドの生体活性評価　）

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。

酸化グラフェン（GO）は，厚さ 1 ナノメートル以下の単層カーボンシートで，ユニークな理工学的特性と生物学的特性が報告され，再生医療分野への応用が期待される。そこで本研究では GO を応用した組織再生用スキャフォールドを作製し，生物学的特性を評価，さらにイヌ抜歯窩モデルにおける骨新生効果を検討した。

GO 分散液をコラーゲンスキャフォールドに浸透させて GO スキャフォールドを作製した。各種特性評価を行ったところ，GO スキャフォールドは高気孔性を維持し，圧縮強度，コラゲナーゼ耐性，カルシウム（Ca）とタンパク質吸着量も高い値を示した。また，MC3T3-E1 細胞による細胞増殖試験の結果，GO スキャフォールド上における細胞増殖性も良好であった。

ラット結合組織内へ埋植した結果，GO スキャフォールドは内部空間を維持し，活発な細胞の ingrowth と血管様管腔構造の形成が観察された。免疫染色の結果では，GO スキャフォールド内部に M1，M2 マクロファージ，線維芽細胞の良好な ingrowth と，血管新生も多く観察された。

イヌ抜歯窩における骨新生試験の結果，2 週後に GO スキャフォールドでは多くの骨新生を観察し，コントロールの約 5 倍と有意に高い値を示した。

GO スキャフォールドは高気孔性の維持と，圧縮強度の向上を認め，再生の場をスペースメイキングすることができた。また，スキャフォールド表面へのナノ構造付与による生体活性の向上と，GO 表面の多くの官能基が細胞接着・増殖タンパク等の生体分子を吸着することによって，細胞増殖や ingrowth が促進したと考えられた。GO スキャフォールドでは M2 マクロファージの出現も観察され，GO の添加によって，細胞や血管の ingrowth 等の組織修復プロセスを促進させることができ，生体埋入後の自己組織化に有効であると思われた。

また，GO スキャフォールドは高い Ca 吸着性を示し，Ca の存在は骨芽細胞の骨マーカー

の発現や ALP 活性を向上させることが報告されている。本研究のイヌ抜歯窩モデルにおいて，GO スキャフォールドは生体活性を向上させ，Ca 吸着も骨新生を促進させた可能性も考えられた。

以上より，GO スキャフォールドは良好な生物学的特性を有し，抜歯窩へ埋入すると骨新生を促進し，骨組織再生用スキャフォールドとしての有用性が示唆された。

審査者と申請者の間で，論文内容及び関連事項についてなされた主な質疑応答を以下に示す。

Q: GOの特性について。

A: グラフェンは安価で導電性がある材料で，工業的にはパソコンの基盤に応用されていた。GOは親水性で，炭素の六員環が平面状に連なった構造で，表面にはOH，COOH，COC基がついておりそれらがタンパク質などの生体分子を吸着する。また，2価のイオンもインターカレーションによってGOの層間に保持されるといわれている。放射性物質も吸着し，放射能汚染水の処理に使えるのではないかと報告されている。

Q: GOコーティングはどのように確認したのか。

A: SEMにてスキャフォールド表面観察し，コントロールではコラーゲンの横紋が観察されたが，GO群では認められず，表面改変されていたためGO付与できたと考える。

Q: GOスキャフォールドでは35日でもM1マクロファージが多く出ているがいいのか。

A: 組織再生においてはマクロファージが出ていた方が組織置換が起きやすいと考えられる。

Q: ED1陽性細胞はM1マクロファージと表現しているが，断定していいのか。

A: 他の論文でもED1陽性はM1マクロファージ，ED2陽性はM2マクロファージと記載されているため，問題ないかと思うが再度確認したい。

Q: GOスキャフォールドにFGFやBMPなどをつけて骨新生効果をみてはどうか。

A: GOはタンパク質を吸着するため，FGF等も保持できると考える。本研究では行っていないが，同研究チームでGOスキャフォールドにFGFを含浸させてラットやイヌでの評価を行っている。

Q: GOの集積はどうなるのか，長期例で観察したい。

A: イヌの抜歯窩において新生骨周囲や内部にも集積が認められた。GOをもとに骨新生促進されていると考えられるが，2週の観察だったため今後この集積がどうなっていくかはまだ分からない。ラットの背部皮下では5週群でGOの集積がスキャフォールドよりも外の組織内にとどまっているものも観察された。他の論文でも生体内では分解されず，組織内にとどまり影響を及ぼさないとの報告もあるが，GOの生体動態については今後の課題点である。

これらの質問に対して，申請者は適切な説明によって回答し，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学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。