

**-大学院歯学独立研究科-**  
**第 135 回 中間発表会プログラム**

大学院学生等が、これまでの研究成果を発表します。  
どなたでも聴講できますので、多数の参加をお待ちしております（聴講申込不要）

場 所：実習館2階 総合歯科医学研究所セミナー室  
日 時：2024年10月23日（水）17時25分 開会

—2024年10月23日（水）—

No.	発表区分・予定時間	演題名・発表者	審査委員
	17:25	開会挨拶 平岡研究科長	
1	[中間] 17:30～18:00 司会:小林 教授	「PTH による骨形成作用における骨髄間葉系細胞由来 Wnt の役割」 高橋 拓実 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織機能解析学	主査:金銅教授 副査:北川教授 :山賀教授
2	[中間] 18:00～18:30 司会:栗原 教授	「The Optimizing Bone Regeneration of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells: the Role of Spontaneous Spheroids」 魏 校通 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織疾患病態解析学	主査:小出准教授 副査:十川教授 :亀山教授
3	[中間] 18:30～19:00 司会:亀山 教授	「裏層用バルクフィル型コンポジットレジンに対する各種前処理が 4-META/MMA-TBB レジンとの接着に及ぼす影響」 高坂 恵子 健康増進口腔科学講座 口腔健康分析学	主査:増田特任教授 副査:増田教授 :川原良美教授

**発表内容の要旨(課程博士)**  
**Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)**

学籍番号 Student ID No.	ID # G 2113	入学年 Entrance Year	2021	年 Year
(ふりがな) 氏名 Name in Full	たかはしたくみ 高橋 拓実			
専攻分野 Major Field	硬組織機能解析学			
主指導教員 Chief Academic Advisor	小林 泰浩			
発表会区分 Type of Meeting	○中間発表会 · 大学院研究科発表会 · 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation /The Matsumoto Dental University Society			
演題名 / Title of Presentation	PTHによる骨形成作用における骨髄間葉系細胞由来 Wnt の役割			
発表要旨 / Abstract				
<p><b>【背景&amp;目的】</b>          超高齢化社会を迎え、骨粗鬆症患者数は増加の一途をたどっている。現在、骨粗鬆症治療薬の1つとして Parathyroid hormone(PTH)が使用されている。PTHは骨形成を促進するとともに、骨吸収も促進することが知られている。我々は骨髄間葉系細胞(BMSC)の細胞系譜解析を行い、PTHは BMSC の著しい増殖と BMSC から骨芽細胞への分化を促進し、海綿骨量を顕著に増加させることを報告した(J Bone Miner Res. 2019;19:1952-1963)。また PTH 投与は、Wnt シグナル抑制因子 Sost 発現を抑制し、Wnt シグナルを活性化することで骨量を増加させることが報告されている(Nature Commun. 2016;19:7:13176)。しかし、PTHによる骨量増加において、Wnt シグナルがどのような機構によって活性化されているかは、未だ完全には理解されていない。特に、PTHが骨芽細胞系譜の細胞に作用し、骨芽細胞分化や骨形成を直接促進するのか？あるいは、PTHによる骨量増加において、Sost の発現抑制に加えて、Wnt リガンドの産生やどの細胞が産生する Wnt が重要な点は不明である。</p>				
<p><b>【結果】</b>          Wnt リガンドの発現をシングルセルの公共データ(Nature. 2019;222:228)を再解析した結果、BMSCにおいて数種類の Wnt リガンド発現が見られた。Wnt リガンドの分泌には Wls という分子シャペロンが必須である。オステオカルシン Cre を用いた骨芽細胞特異的な Wls 欠損マウスは著しい骨量減少を呈する(PNAS. 2012;14;109(33)E2197-204)。生理学的状態における骨量に対する BMSC 由来 Wnt の役割、さらに PTHによる骨量増加作用におけるその役割について検証するため、BMSC 特異的に Wls を欠損させ、BMSC から Wnt が分泌されないマウス(LepR-Cre;Wls<sup>fl/fl</sup>; BMSC-Wls cKO)を作出した。μCT 解析の結果、コントロールと比較し、10 週齢 BMSC-Wls cKO の骨量は有意に減少した。この結果は、BMSC 由来の Wnt が定常時の骨量を調節する重要な因子であることを示唆した。</p> <p>また、10 週齢の雄性コントロールマウスに PTH を 10 日間投与し、μCT 解析を行った。その結果、骨量が有意に増加した。一方、BMSC-Wls cKO マウスでは PTH 投与による骨量の有意な増加が認められなかった。さらに、BMSCを赤色蛍光で検出できる(LepR-Tomato)マウスを用いて Osx の免疫染色を行った結果、コントロールと比較して LepR-Tomato<sup>+</sup>細胞、Osx<sup>+</sup>骨芽細胞がともに増加した。これらの結果から、PTHは BMSC に作用し、Wnt リガンドを分泌させることで、骨量を増加させることができた。また、骨における Wnt リガンドの発現を調べたところ、PTH 投与により Wnt 及び Wnt4 の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。</p>				
<p><b>【結論】</b>          BMSC 由来の Wnt は、成長過程における骨量増加及び PTH による骨量増加作用に重要である。</p>				

**発表内容の要旨(課程博士)**  
**Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)**

学籍番号 Student ID No.	ID # G 2201	入学年 Entrance Year	2022	年 Year
(ふりがな) Name in Full	ぎこうつう 魏校通			
専攻分野 Major Field	硬組織疾患制御再建病態解析学			
主指導教員 Chief Academic Advisor	栗原 祐史			
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会	・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation /The Matsumoto Dental University Society		
演題名 / Title of Presentation	The Optimizing Bone Regeneration of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells: The Role of Spontaneous Spheroids			
<b>発表要旨 / Abstract</b>				
<p><b>Objective and background:</b> Human umbilical cord mesenchymal stromal cells (hUC-MSCs), sourced from medical waste, are widely available and free from ethical issues. These cells exhibit low immunogenicity and possess the ability to differentiate in various directions and self-renew in vitro. Consequently, hUC-MSCs present a promising solution for bone regeneration. Although many researchers have used hUC-MSCs to verify their bone regeneration ability in bone defect animal models, we believe that ectopic bone regeneration and bone repair are different. Here, we used ectopic bone regeneration to investigate its osteogenic ability. Our aim was to observe the bone regeneration effect of hUC-MSCs with improved osteogenic potential through spontaneous spheroids. (This study received approval from the Matsumoto Dental University Committee on Intramural Animal Use under protocol Nos. 418.)</p>				
<p><b>Materials and methods:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. HUC-MSCs (UC701) were obtained from NIBIOHON JCRB Cell Bank (JCRB 1218, Japan) and seeded onto spheroid-forming low adhesive culture dishes (AS ONE, Osaka, Japan) to make spheroids. Spheroids formed after 24 h and were then transferred into a separate centrifuge tube through a 40 µm cell strainer to the following experiments.</li> <li>2. Analysis of pluripotency genes (OCT4, SOX2, SSEA1 and NANOG) in hUC-MSC spheroids compared with monolayer cells by RT-qPCR.</li> <li>3. HUC-MSCs were induced using Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium (D12109, Takara, Japan). ALP and Alizarin staining were performed to verify the induction effect of hUC-MSCs after osteogenic induction for 14 d. To analyze osteoblast markers, RNA was extracted from three groups. The groups included: (1) Monolayer cells (Mono), in which hUC-MSCs were cultured in D-MEM into 2D dishes. (2) Monolayer cells with osteogenic induction (Mono-OI), in which hUC-MSCs were cultured in osteogenic induction medium into 2D dishes for 14 d. (3) Spontaneous spheroids with osteogenic induction (Sph-OI), in which hUC-MSCs were initially cultured in osteogenic induction medium into 2D dishes for 14 d, followed by transfer to 3D dishes with D-MEM. Spheroids were formed after 24 h and were collected in a separate centrifuge tube using a 40 µm cell strainer. To evaluate the expression of osteogenic genes (OCN, RUNX2, ALP, OPN, VEGFa, SP7 and COL1A1) in</li> </ol>				

Sph-OI compared with the two groups by RT-qPCR.

4. For in vivo testing, four-week-old male SCID mice (C.B-17/IcrHsd-PrkdcSCID, SLC, Japan) were used for heterotopic transplantation. Three groups were transplanted into mice using beta-tricalcium phosphate as a scaffold. Transplanted samples were harvested at 4, 8, and 12 weeks post-surgery, followed by euthanasia of the mice. Transplant samples were stained using HE staining, TRAP staining, and immunohistochemistry (OCN and SP7).

5. For data analysis, SPSS version 17.0 was utilized. Numerical data were reported as mean  $\pm$  standard deviation and analyzed using Student's t-test between two groups and One-Way analysis of variance (ANOVA) between three groups, followed by the Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. A P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

#### Results:

1. HUC-MSCs were cultured on 3D culture dishes and spontaneous spheroids formed successfully in 24 h. Morphological observations revealed that spheroids remained spherical throughout the culture period, and the diameters of the spheroids were also relatively uniform.

2. The expression of pluripotency markers OCT4 ( $P < 0.001$ ), SOX2 ( $P < 0.01$ ), SSEA1 ( $P < 0.001$ ), and NANOG ( $P < 0.01$ ) was upregulated in spontaneous spheroids compared with monolayer cells.

3. The mRNA expression of OCN, ALP, and OPN was remarkably high in the Sph-OI group compared to the two groups ( $P < 0.001$ ). Additionally, the mRNA expression levels of VEGFa and COL1a1 were significantly increased in Sph-OI group compared to the two groups ( $P < 0.01$ ). The mRNA expression levels of RUNX2 and SP7 were also higher in Sph-OI group compared to the other two groups ( $P < 0.05$ ).

4. HE staining: In the Mono group, no new bone tissue was observed at any time points (4, 8, and 12 weeks). In the Mono-OI group, less new bone tissue was observed at 4 and 8 weeks post-transplantation. At 12 weeks, a few island-shaped new bones were observed. In the Sph-OI group, a few island-shaped new bones were observed at 4 weeks, and the bone area gradually increased over the following weeks. In the Sph-OI group, the new bones formed were significantly higher than the other two groups at 4 ( $P < 0.001$ ), 8 ( $P < 0.001$ ), and 12 weeks ( $P < 0.001$ ).

5. TRAP staining: in Sph-OI, the positive areas were significantly higher than those in the other two groups at 4, 8, and 12 weeks ( $P < 0.001$ ).

6. Immunohistochemistry for OCN and SP7 indicated higher levels of osteogenetic activity in Sph-OI.

**Conclusion:** These hUC-MSCs spheroids exhibited superior pluripotency, and spheroids after osteogenic induction can improve their bone regeneration ability. The transplant samples showed new bone formation, increased bone metabolism, and bone activity-related protein expression. However, the bone structure formed was primarily osteoid tissue. This may be associated with the number of transplanted cells and the selection of human stem cell scaffolds. Different methods of harvesting hUC-MSCs directly affect their pluripotency, which in turn affects their ability to mature the bone during regeneration. Future research on hUC-MSCs spheroids should focus on elucidating the osteogenesis mechanism and signaling pathways involved in bone formation, and how to enhance bone maturity.

**発表内容の要旨(課程博士)**  
**Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)**

学籍番号 Student ID No.	ID # G 2209	入学年 Entrance Year	2022	年 Year
(ふりがな) 氏名 Name in Full	こうさか れいこ 高坂 恵子			
専攻分野 Major Field	口腔健康分析学			
主指導教員 Chief Academic Advisor	亀山 敦史 教授			
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 · 大学院研究科発表会 · 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation /The Matsumoto Dental University Society			
演題名 / Title of Presentation 裏層用バルクフィル型コンポジットレジンに対する各種前処理が4-META/MMA-TBBレジンとの接着に及ぼす影響				
発表要旨 / Abstract				
<p><b>【目的】</b>          深在性齲歎に対してインレー修復を行う場合、歯髓保護の観点から裏層用バルクフィル型コンポジットレジンを用いた裏層が必要となることがある。このような場合、窓洞形成された歯の表面は象牙質とレジンが混在しているため、どの前処理を使用すればよいのか戸惑うことが多い。近年、エナメル質や象牙質だけでなく、合金やセラミックス、コンポジットレジンなど様々な材料に適用できる接着剤が新たに開発されてきた。しかし、これらの接着剤を塗布する前のシラン処理の有効性についてはまだ明らかでない。そこで、本研究では、4-META/MMA-TBB レジンで接着した裏層用バルクフィル型コンポジットレジンブロックと PMMA ブロックとの短期微小引張接着強さに及ぼす前処理の影響を検討する。</p>				
<p><b>【材料と方法】</b>          裏層用バルクフィル型コンポジットレジン(バルクベースハードⅡ, サンメディカル)をシリコーン型に充填し、LED 光重合器を用いて 18 個のサンプルブロック(10 x 10 x 8 mm<sup>3</sup>)を作製した。すべての群は耐水研磨紙 # 600 で研磨し、無処理(Cont.)、ティースプライマー(サンメディカル; TP)、表面処理材グリーン(サンメディカル; 10-3)、M&amp;C プライマー(サンメディカル; MC)を用いて【TP+MC】、【TP】、【10-3+MC】、【10-3】、【MC】、【Cont.】の 6 群(n=3)に無作為に分けた。各処理試料を PMMA ブロックにスーパー bond EX クリア(サンメディカル)で接着し、30 分間 1kgf で加圧後、37 °C で 1 週間水中保管した。これらの試験片をビーム状に切断後、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min で微小引張接着強さ(μ TBS)を測定した。データは、ANOVA および Tukey test により統計学的に解析した。</p>				
<p><b>【結果】</b>          平均微小引張接着強さは【TP+MC】群で 40.66 MPa、【TP】群で 36.24 MPa、【10-3+MC】群で 41.97 MPa、【10-3】群で 43.02 MPa、【MC】群で 29.27 MPa、【Cont.】群で 38.76 MPa であった。【10-3】群で最大、【MC】群で最小を示した。また、【MC】群は【Cont.】群と比較して有意に低い値を示した(p &lt; 0.05)。</p>				
<p><b>【結論】</b>          現時点では、裏層用コンポジットレジンへのシラン処理は短期における微小引張接着強さにほぼ効果がないか、むしろ接着強さの低下をもたらすことから、裏層を行った窓洞には象牙質とともに 10-3 処理を行うことが望ましいと思われる。今後、SEM での破断面観察や長期群との比較を行う予定である。</p>				