

令和 元 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20534

研究課題名（和文）培養骨膜シートの新規骨再生経路の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of novel bone regeneration pathway of cultured periosteum sheet

研究代表者

上松 晃也（Uematsu, Koya）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：80758889

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では汎用培地と幹細胞用培地の二種類の培養条件の比較により、骨形成量の差や骨再生過程での細胞の集積・変化を検証した。その結果、骨膜シートは培養条件により骨膜シート局所に間葉系幹細胞を多数、動員することが可能であることが示唆された。これらの動員細胞は血管を通して集積し、石灰化周囲に限局して存在することから骨化に強く関わる細胞群である可能性が高い。今後はこれらの遺伝子発現解析のデータから間葉系幹細胞が骨化に及ぼす影響の解析を追加する必要がある。これら細胞を効率的に誘導する初期培養法を開発することで骨膜シートの有効率を高めることが出来る可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では培養骨膜シートによる歯槽骨再生現象において、骨髓中に存在している間葉系幹細胞が関与していることが示された。これまでの基礎研究においては、骨再生は骨膜中に元来存在していた骨形成細胞が培養中に維持・増幅されてこれが寄与しているという仮説をもとに、より骨形成活性の高い細胞を調整する培養方法を追求していた。しかし、本研究の結果より、局所に骨髓由来の間葉系幹細胞を遊走させるケモカインの放出が高まる細胞調整法に着目することの重要性が示唆された。このことは培養骨膜シートによる再生治療にのみ当てはまるものではなく、他の再生治療にも応用が可能であり、今後の再生治療の研究に資するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, differences in bone formation and cell accumulation and changes during bone regeneration were verified by comparing two types of culture conditions, a general-purpose medium and a medium for stem cells. As a result, it was suggested that periosteum sheet can mobilize many mesenchymal stem cells locally to the periosteum sheet depending on culture conditions. These mobilized cells accumulate through blood vessels and are localized around calcification, so they are likely to be a cell group strongly involved in ossification. It is necessary to add the analysis of the influence which mesenchymal stem cells exert on ossification from the data of these gene expression analysis from now on. There is a possibility that the efficiency of the periosteum sheet can be enhanced by developing an initial culture method to efficiently induce these cells.

研究分野：再生歯学

キーワード：歯槽骨再生 細胞治療 細胞培養

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

従来の骨再生は骨伝導能、骨誘導能、骨形成能の3つを大きな治療ストラテジーとしており、これら3つの骨再生能を複合化させることによって、より高機能な移植材を創製する研究が進められてきた。

つまり、水酸アパタイトなどの骨充填材は「骨伝導能」により骨再生を促進し、骨形成因子（BMP）などは局所の細胞に影響を与える「骨誘導能」により骨再生を促進することを目的としていた。一方、骨芽細胞の移植は、その細胞自体の「骨形成能」に期待していた（右図）。

これまで当院で臨床応用してきた「培養骨膜シート」は豊富な細胞外マトリックスとそこに重層化した細胞から構成され、上記の3つの機能をすべて兼ね備える優れた細胞加工製品であった。

一方、骨折からの治癒過程において、骨折部の骨髓細胞が関与して軟骨内骨化により修復するという機転はよく知られており、骨再生医療への応用が期待されてきたが、造血幹細胞をはじめとした骨髓幹細胞を骨膜シートに効率的に動員する研究はこれまでなかった。

骨膜シートへ骨髓幹細胞を効率的に動員し、その骨化への役割を知ることが出来れば、より画期的な骨再生医療技術として、次世代の骨膜シート作成への応用が期待出来る。

★従来の骨再生コンセプト

1. 骨伝導能
2. 骨誘導能
3. 骨形成能

新規 ➡ 4. 骨髓細胞動員能

2. 研究の目的 現在臨床応用されている培養骨膜シートの骨再生機序をこれまで焦点を当ててこなかった骨髓幹細胞に着目して解析することで、より効率的な再生を促す骨膜シートの培養方法を開発する。

3. 研究の方法

#1 人工培養骨の作成

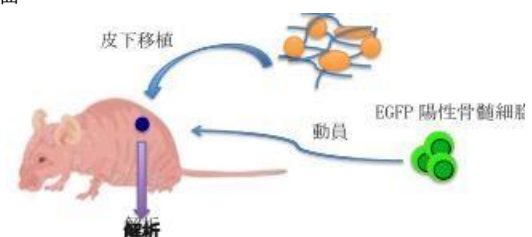
ヒト骨膜組織は新潟大学医歯学総合病院を受診する患者の内、同意の得られた患者のヒト骨膜組織を用いた。対象は①歯槽骨・顎骨の再生医療のためにセルプロセッシングセンターにて培養させていただいた骨膜の一部、あるいは②難抜歯の親不知の症例において本来、廃棄すべき骨片から採取した骨膜とした。骨膜片を採取、8週間培養し骨膜シートを作製した。培地は M199+10%FBS または MesenPRO+2%FBS を使用し、作成した骨膜シートは ALP の発現量をもとに前者を immature 群、後者を mature 群と定義した。

#2 骨髓キメラマウスの作成

C57BL/6-CAG-EGFP(H-2^b)をドナー、Balb/c nu/nu(H-2^d)をレシピエントとして骨髓移植を施行することで骨髓細胞のみを可視化可能な骨髓キメラマウスを作成した。骨髓移植法としては 6.5Gy の骨髓破壊的照射を施行したマウスに 3×10^6 cells の骨髓単核球を尾静注により移植した。

#3 人工培養骨の骨髓キメラマウスへの移植とその評価

骨髓移植後 6 週で骨髓再構築が得られた骨髓キメラマウスの背部皮下に、#1 で作成した骨膜シートを皮下移植した。その骨膜シートを皮下移植 8 週間後に摘出し、組織学的に評価した（右図）。



4. 研究成果

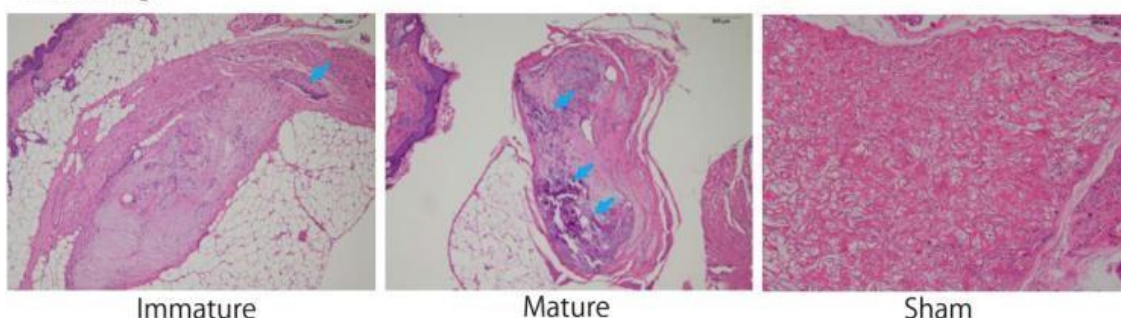
M199, MesenPRO はそれぞれ分化度の異なる骨膜シートを誘導する。

In vitro で培養した骨膜シートは **immature** 群では未分化な細胞からなる高度に重層化した骨膜シートが形成された。一方で **mature** 群では多数の ALP 陽性細胞からなる厚みを持った骨膜シートが形成された。

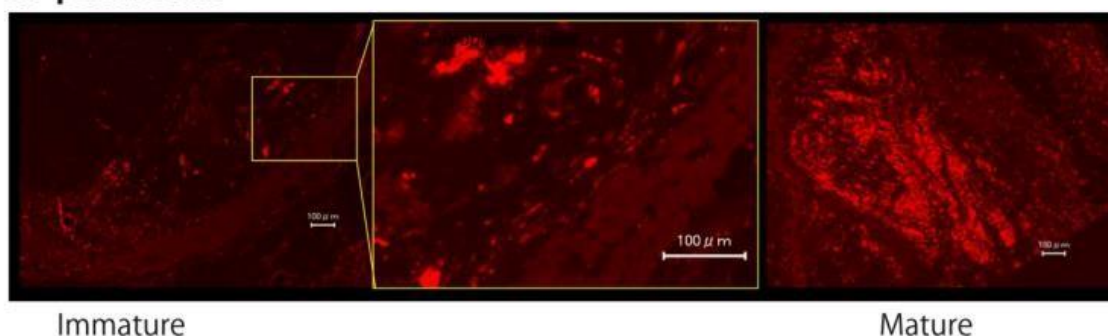
骨膜シートは移植骨髄由来の **GFP** 陽性細胞を誘導する。

骨膜シートの移植部位では骨形成が確認された（上図、矢印）。骨膜シートによる骨形成は **Mature** 群がより良好であり、**Mature** 群では **Immature** 群よりも多くの **GFP** 陽性細胞の集積が移植骨膜シート周囲に確認された（下図右）。骨膜シートは **bone marrow derived stem cell (BMSC)** の誘導能を有するとともに、同時に **BMSC** が骨化に関与していることが強く示唆される所見であった。

HE staining



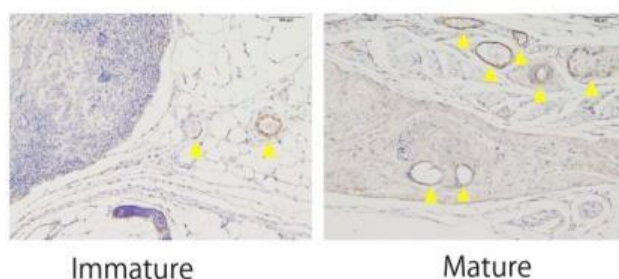
GFP positive cells



Immature 群と **mature** 群で作成される骨および、その微小環境が大きく変化する。

Mature 群において広範囲の異所性の石灰化が確認されると共により多くの **GFP** 陽性細胞が石灰化周囲に誘導されていた。また、**GFP** 陽性細胞数に比例して **mature** 群では移植骨膜シート内・周囲 α SMA 陽性細胞からなる血管様の構造が増加した。**PCNA** 陽性細胞数も増加していたこと（下図左）からこれらの部位での細胞増殖活性の上昇が示唆された（下図右）。

PCNA positive cells



Summary

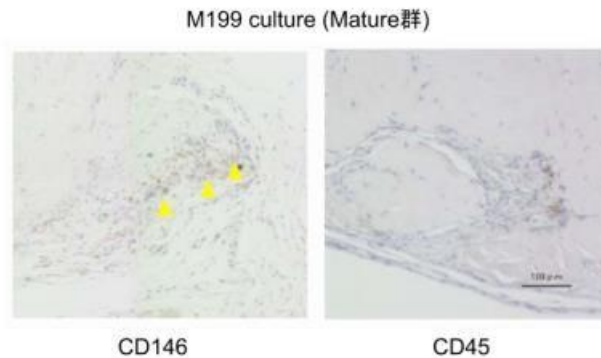
Effects	Immature TEPS	Mature TEPS
骨形成 (bone formation)	Low	High
Cell multilayer	High	Low
Cell proliferation	High	Low
Mineralized deposit formation	Low ~ Medium	High
Osteoclast formation*	Low	High
Angiogenesis	Low ~ Medium	High
Growth factors related to*	Anti-inflammation	Bone metabolism

*demonstrated in our previous studies

TEPs: 骨膜シート

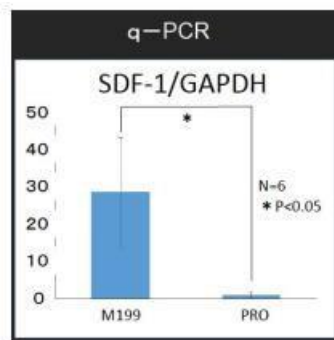
GFP 陽性細胞は CD146 陽性細胞が多く間葉系由来細胞であることが示唆される。

両群ともに移植骨膜シート周囲に骨髄由来の GFP 陽性細胞の集積が認められたが、M199 群においてより多く集積していた。集積する GFP 陽性細胞は免疫染色の結果いずれも CD146 が CD45 よりも優位で、間葉系幹由来の細胞が多く含まれていた。



培養骨膜シートは培養条件により SDF-1 の分泌量が異なる

Mature 群で GFP 陽性細胞率が異なる原因の一つとして、間葉系細胞を局所誘導可能なケモカインの発現率に違いがあるのではないかと考えた。間葉系幹細胞を誘導する SDF-1 を測定したところ、Mature 群で有意な上昇が認められた。ヒトとマウスの SDF-1 は共通であることからこれが間葉系幹細胞を誘導する一助であると考えられた。



5. 主な発表論文等〔学会発表〕 (計 3 件)

国内学会：

- (1) 上松晃也, 牛木隆志ら. 骨膜シートの骨再生機序における骨髄由来細胞の役割. 第 18 回日本再生医療学会総会. 口演(神戸, 2019.3.21-23. 神戸国際会議場)
- (2) 上松晃也, 牛木隆志ら. 骨膜シートは移植局所に骨髄由来幹細胞造血細胞を動員する. 第 17 回日本再生医療学会総会. 口演(横浜, 2018.3.21-23. パシフィコ横浜)

国際学会：

- (3) Uematsu K, Ushiki T, et al. Tissue-engineered human osteogenic periosteal sheets recruit bone marrow stem cells to their implantation sites. Academy of Osseointegration 2018 Annual meeting, Oral presentation (Los Angeles, CA, 2018.2.28-3.3. Los Angeles Convention Center)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：牛木 隆志

ローマ字氏名：Ushiki Takashi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。