

平成21年5月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17791454
 研究課題名（和文） 自己成分培養ゲルと自己骨トレーを併用した幹細胞移植による顎骨再生プロジェクト
 研究課題名（英文） The craniofacial bone regeneration project by the stem cell transplantation with autologous PRP gel and bone
 研究代表者 綿谷 早苗（WATATANI SANAE）
 神戸大学・医学研究科・医学研究員
 研究者番号：50343265

研究成果の概要：

ヒト脂肪組織より採取した未分化間葉系幹細胞に、ウシ血清の代用としてヒト多血小板血漿（platelet rich plasma:以下PRP）を添加し骨再生医療の研究を行った。PRPの添加により、幹細胞の増殖・骨分化能はともに促進し、培養液をゲル・膜などの形状に変化させた。PRPは再生医療において成長因子としての働くと同時に、細胞移植の際の担体（土台）としての役割を果たすことができるものと示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2005年度 | 830,615 | 0 | 830,615 |
| 2006年度 | 769,385 | 0 | 769,385 |
| 2007年度 | 1,300,000 | 0 | 1,300,000 |
| 2008年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 180,000 | 3,680,000 |

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：再生医療、培養骨、多血小板血漿（PRP）

1. 研究開始当初の背景

生体組織の再生には3要素（①細胞②成長因子③担体）が必要である。このうち①の細胞に関しては、多分化能を有し増殖能にも優れた間葉系幹細胞が注目されている。骨再生分野では骨髄由来の間葉系幹細胞を使用す

るが、2001年 Tukらは皮下脂肪から抽出した脂肪由来間葉系幹細胞に骨芽細胞への分化能があることを報告した。

②の成長因子として多血小板血漿（PRP）が注目されている。PRP中に含まれる血小板は、複数の成長因子を放出し骨芽細胞

の増殖、毛細血管の新生、骨造成および軟組織の治癒に促進的役割を果たすとの報告がある。1998年 Marx らによる骨移植における PRP の骨形成促進能についての報告以来、口腔外科領域ではインプラント治療や歯槽骨再生治療などにおける PRP 併用の有用性などの研究が盛んに行われている。

2. 研究の目的

外傷や腫瘍切除で生じた顔面骨欠損や、歯周病などの炎症性歯槽骨吸収症例へ、外科的侵襲の少ない方法による修復を実現するために、自家骨移植にかわる再生医療として、自己脂肪由来幹細胞を安全に効率よく増殖・骨分化・移植するシステムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

①細胞はヒト由来脂肪由来未分化間葉系幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ASCs)、ヒト骨芽細胞、ヒト線維芽細胞を使用した。培養添加因子としてウシ血清の代用で自己多血小板血漿 (platelet rich plasma: 以下 PRP) を使用した。通常培養に使用するウシ血清 (FCS) を添加した群と PRP 添加群について、細胞増殖・骨分化に関して比較・検討 (MTT アッセイ、ALP 染色、von Kossa 染色) を行った。

②培養後の細胞の生体内における骨分化能の有効性を確認するため、PRP ゲルに含ませたヒト由来脂肪由来未分化間葉系幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ASCs) のモデルマウスへの生体内移植を行い対照群 (FCS 添加群) と新生骨の有無について比較した。

③ PRP について

1. 自己・非自己成分
2. 新鮮・凍結保存後

3. 濃度別

によってその能力に相違が生じるか検討を加えた。

④脂肪採取法の開発

現在の皮下脂肪からの採取法の他、口腔内からの脂肪採取を目的に、頬脂肪体から ASCs を抽出する方法を開発した。頬脂肪体は手術時に露出したものを患者の同意を得た上で使用した。

4. 研究成果

PRP の幹細胞増殖促進について

FCS にかわり、PRP を基礎培地に添加すると、ASCs、ヒト骨芽細胞、ヒト線維芽細胞の増殖はいずれも著しく促進した。中でも線維芽細胞においては対照群 (FCS 添加群) と比較して明らかな有意差を認めた。位相差顕微鏡で細胞を観察すると、FCS 添加培地では、流紋状に整列して増殖する ASCs、ヒト骨芽細胞、ヒト線維芽細胞が、PRP 添加培地ではいずれも無規則な方向に重なり合い増殖していた。さらに焦点を変えることで異なる複数の細胞層が観察された。これは PRP を添加した培地がフィブリン活性化によりゲル化し、その ASCs が 3 次元的に増殖したことによるものであった。さらに PRP 添加培地の細胞個々のサイズは FCS 添加培地の細胞よりも小型で、かつ密集して増殖していた。

PRP は培養液をゲル化する

PRP に含まれるフィブリン成分の活性化により培地全体がゲル化することを明らかにした。骨分化を目的とした長期培養中にゲルは薄い膜状になりシャーレ底部に付着し、剥離は困難であった。この問題を解決するため、さらに高濃度の PRP を添加し、ASCs を播種して培養したところ、30 分後には培地全体がゲル化し、翌日には細胞を取り込み丸く収縮した PRP 膜が培養液上に浮遊した。一週

間後、膜はさらに収縮して小さな球状の凝集塊となり、蛋白分解酵素処理等を必要とせず、塊ごと細胞を容易に回収可能であった。PRPを細胞培養液に添加する際、PRPに含まれるフィブリン成分の活性化により培地全体がゲル化することを明らかにした。さらにPRPの添加量・添加時期などの違いにより培養液をゲル・膜などの形状に変化させることも可能であった。このPRPゲルを細胞の足場（担体）として安定した幹細胞の供給・移植技術を臨床応用する計画については、セルプロセッシングセンター（cell processing center: CPC）などの無菌性環境整備を必要とするため、臨床試験は実現しなかった。

PRPの幹細胞骨分化促進能について

自己PRP添加群の幹細胞（ASCs）における骨分化促進能をALP染色・von Kossa染色にてウシ血清（FCS）添加群と比較したところ、いずれもPRP添加群の骨分化能が優れていた。PRP添加群は骨分化誘導をかけずにそのまま培養し、2W後ALP染色でコラーゲンI強陽性、4W後von Kossa染色で豊富な骨基質の蓄積が確認された。高濃度PRP添加群において生じた塊の組織切片像において、細胞と骨基質を含んだ膜がヒダ状に、複数層に折りたたまれた形状を呈していた。

ASCsのヌードマウス生体内移植

PRPを添加したASCs群では、移植して4週間後に異所性の骨新生を認めた。一方対照群（FCS添加ASCs群）には明らかな骨新生は認めなかった。

PRPの条件について

次にPRPの試薬製品化を視野に入れ、非自

己PRPの幹細胞への有効性を調べた。非自己PRP添加培地はウシ血清添加培地と比較して、多数の幹細胞が層状に密集して増殖し、8週間後、旺盛な骨分化促進能を示し（ALP染色・アリザリンレッド染色ともに強染色）、その効果は自己PRPと差はなかった。

凍結保存したPRPでは、細胞増殖能は認められたものの、骨分化促進能は著しく低下した。さらに高濃度（10%－30%）PRPは、濃度依存的に、優れた細胞増殖・骨分化能を示した。

脂肪採取法の開発

口腔内は細菌数が多く、消毒が困難という悪条件が重なり、皮下脂肪と比較して細菌感染の割合が多く、抗生剤を併用しても培養成功率は低くなった。今後細菌感染を防ぐ方法の検討が望まれた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. 綿谷早苗、寺師浩人、横尾聡. PRPは凍結脂肪由来未分化間葉系幹細胞の増殖・分化を促進する. 日本形成外科会誌. 第27巻4号. 2007. 283~290. 査読有り

2. 綿谷早苗、柳田恵、鈴木泰明、横尾聡、古森孝英. 多血小板血漿の血小板凝集とTGF- β 含有量に関する解析. 日本口腔外科学会雑誌. 第52巻6号. 2006. 316~321. 査読有り

[図書] (計1件)

1. Sanae Watatani. Current experimental study for treatment of cleft lip and palate 2008. 177~181.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿谷早苗 (WATATANI SANAE)
神戸大学・医学研究科・医学研究員
研究者番号: 50343265

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし