

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592296

研究課題名（和文） 骨髄幹細胞の固定化サイトカインによる誘導および骨再生

研究課題名（英文） Bone regeneration with bone marrow stem cell and immobilized cytokine.

研究代表者

山近 英樹（YAMACHIKA EIKI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10294422

研究成果の概要：

本研究では、bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) を I 型コラーゲンに固定化し、骨誘導能が高まることを確認した。さらに骨髄幹細胞を固定化 BMP-2 にて骨芽細胞へ誘導したのちマウス背部皮下へ移植実験をおこなった。これにより固定化 BMP-2 が骨髄幹細胞を骨芽細胞へ効率的に分化誘導し、誘導された細胞の移植実験より同細胞が骨芽細胞として骨形成に寄与することを確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：固定化、BMP-2、成体幹細胞、骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでの研究のなかで骨再生治療を視野にいたした「遺伝子導入」や「固定化

サイトカイン」の局所的応用実験を行ってきた。その結果申請者らは、固定化サイトカインを用いて微細な骨再生に成功した。しかし

問題点として(1)「遺伝子導入」には腫瘍化をはじめとする安全性に関する問題点が多く、また臨床試験の必要性など患者に治療法として反映するのに時間がかかること。(2)「固定化サイトカイン」による人工マトクリン機構は、従前までの方法に比べ効果的な骨誘導がはかれ、形を与えるのには適する。しかし標的細胞の数を限定してしまい短時間で大量な骨再生が行えないことがわかった。

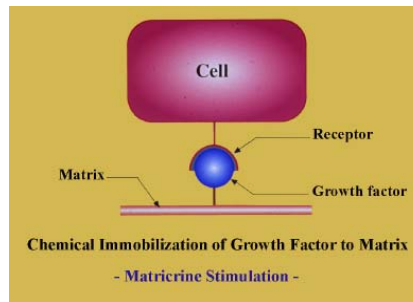
## 2. 研究の目的

固定化サイトカインと骨髄幹細胞移植療法を応用した骨再生方法を系統だて、短時間で大量の骨再生の一方法として確立するのが本研究の目的である。このため本研究では(1)固定化rhBMP-2の誘導シグナルの確認(2)実験動物での骨髄幹細胞系の樹立(3)樹立した骨髄幹細胞の大量培養(4)骨髄幹細胞への固定化rhBMP-2の投与およびその骨誘導能、分化度解析(5)培養骨髄幹細胞からの高純度な骨系前駆細胞の回収(6)高純度骨系前駆細胞の実験動物への移植、骨再生能の解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1)培養細胞ST2(mouse stromal cell), MC3T3-E1(mouse osteoblast cell), C2C12(mouse myoblastic cell)を用いてこれに固定化BMP-2で骨系細胞への分化誘導を行い、骨系細胞への誘導シグナルをリン酸化Smadの発現で確認した。固定化BMP-2は、rhBMP-2をWSCにてI型アテロコラーゲンに共有結合させたのち過剰なWSCを透析により取り除き作成した。固定化されたrhBMP-2では、図に示すように標的細胞のレセプターに Scaffoldともども結合し、情報が持続的に伝達され高い誘導活性を得、細胞内情報伝達に関わる遺伝子発現に変化が現れるが、これをBMPシグナルの下流域に存在するリン酸化Smadシグナル発現をWestern blotting法に

よって確認した。

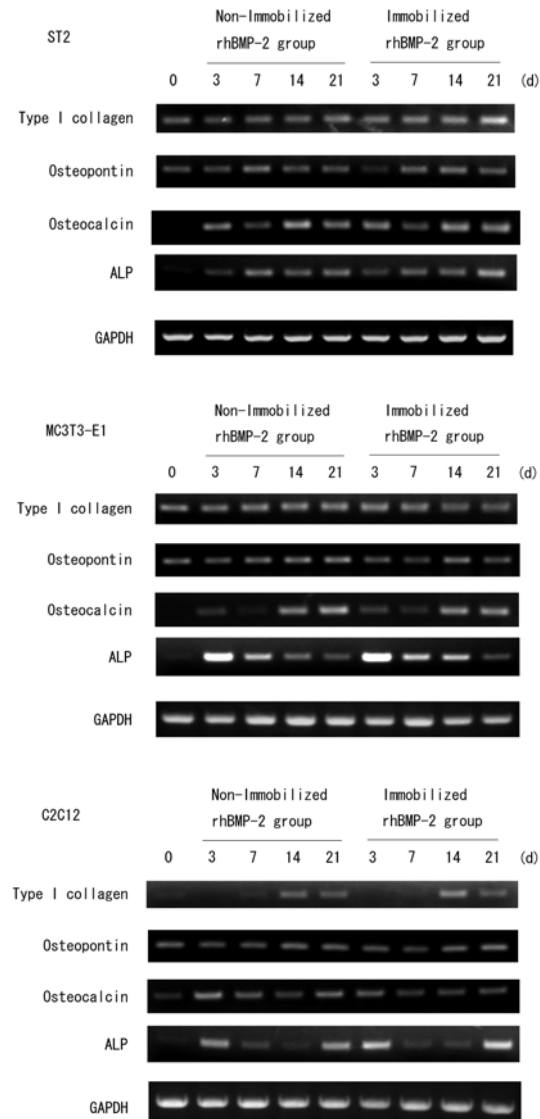


誘導を受けた細胞での骨系細胞への分化誘導はType I collagen, Osteopontin, Osteocalcin, Alkaline phosphataseをRT-PCRによりmRNAレベルで確認した。(2)骨髄幹細胞(MSCs)は、6週齢のGFP(Green fluorescent protein)ラット脛骨と大腿骨より採取した。4代継代し、Sub-confluentになった細胞をMSCsとして使用し樹立したMSCsの大量培養をおこなった。(3)固定化rhBMP-2によるMSCsの骨誘導能の解析は①ALP活性の測定、②Western blotting法によりBMP-2, BMP-4, BMPレセプター、Smad 1/5/8のタンパクの発現を測定、③MSCsの骨への分化を培養プレート上で直接フォンコッサ法により染色することにより石灰化を確認した。また免疫組織学的検討にて骨基質タンパクのオステオカルシンの発現を確認した。(4)CD34(+), CD117(+), Sca-1(+), lineage(-)を指標として幹細胞に特異的な膜抗原を持つ細胞をセルソーター付き自動細胞解析装置にて分取した。(5)上記で分取した細胞を再度培養の後移植細胞とし、移植細胞のScaffoldには生体ゲルにベータリン酸三カルシウム(Beta-TCP)と固定化rhBMP-2を溶解したものを用いた。これをSCIDマウスの骨欠損部や皮下へ移植し同所性、異所性骨形成を確認した。

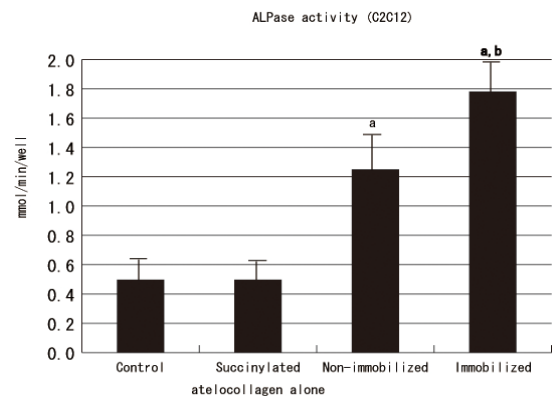
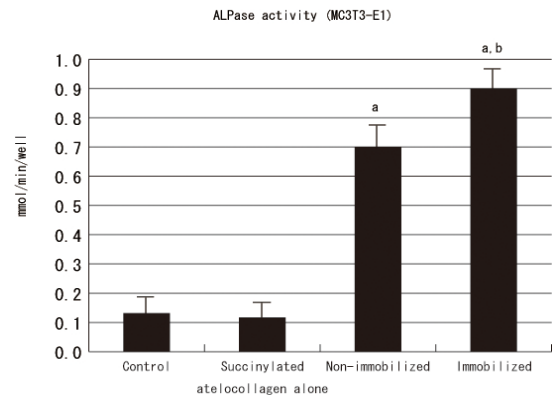
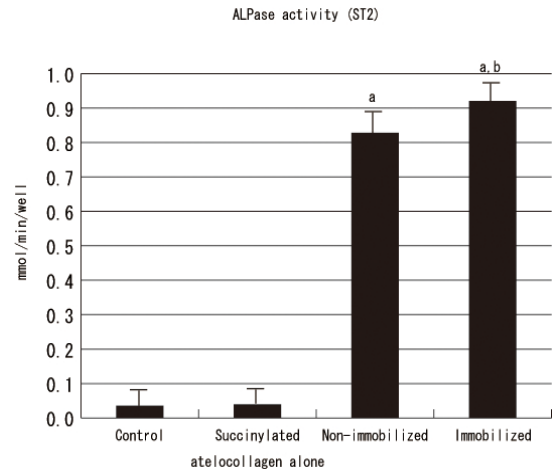
## 4. 研究成果

(1)培養細胞ST2, MC3T3-E1, C2C12を用いてこれに固定化BMP-2で骨系細胞への分化誘導

を行った実験では、誘導を受けた細胞での骨系細胞への分化誘導をType I collagen, Osteopontin, Osteocalcin, Alkaline phosphataseのmRNAレベルで確認した。この結果固定化BMP-2は、非固定のBMP-2に比較して有意に骨誘導能が高いことが確認された。

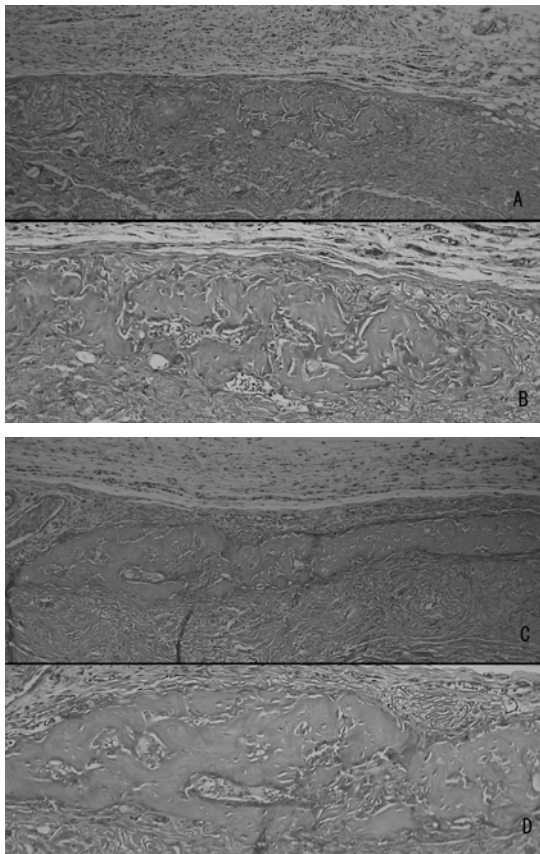


(2) 培養細胞ST2, MC3T3-E1, C2C12を用いてこれに固定化BMP-2で骨系細胞への分化誘導を行った実験では、誘導を受けた細胞のAlkaline phosphatase活性が、BMP-2により上昇し、さらにBMP-2を固定化することにより同活性が延長してすることが確認された。



(3) 分取したGFP陽性間葉系幹細胞を上記固定化BMP-2にて骨系細胞への誘導を行い、SCIDマウスへ移植し同所性、異所性の骨形成をみた。6週後取り出されたペレットには、骨形成とGFP陽性の骨芽細胞が認められた。

これらの結果から、固定化BMP-2により骨髓由来の間葉系幹細胞が骨系細胞へ効率的に分化誘導され、生体への移植により骨芽細胞として骨形成に寄与することが確認された。



A, B : 非固定 BMP-2 弱拡大、強拡大  
C, D : 固定化 BMP-2 弱拡大、強拡大

## 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 4 件)

① Takeuchi A, Tsujigiwa H, Murakami J, Kawasaki A, Takeda Y, Fukushima K, Rodriguez AP, Nagatsuka H, Yamada M, Nishizaki K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2/atelocollagen composite as a new material for ossicular reconstruction. 査読有 J Biomed Mater Res A. 2009 Apr;89(1):36-45.

② Yamachika E, Tsujigiwa H, Shirasu N, Ueno T, Sakata Y, Fukunaga J, Mizukawa N, Yamada

M, Sugahara T. Immobilized recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances the phosphorylation of receptor-activated Smads. 査読有 J Biomed Mater Res A. 2009 Mar 1;88(3):599-607.

③ Ueno T, Honda K, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Shirasu N, Sawaki M, Yamachika E, Mizukawa N, Sugahara T. Histological comparison of bone induced from autogenously grafted periosteum with bone induced from autogenously grafted bone marrow in the rat calvarial defect model. 査読有 Acta Histochem. 2008;110(3):217-23. Epub 2007 Dec 21.

④ Eiki Yamachika, Hidetsugu Tsujigiwa, Nobuyoshi Mizukawa, Masakazu Matsubara, Toshio Sugahara Activating Stimulatory G Protein alpha Mutations do not Occur in Odontogenic Myxoma and Monostotic Fibrous Dysplasia of Bone in the Jaw. 査読有 Asian J Oral Maxillofac Surg. 2007;19:133-7.

[学会発表] (計 3 件)

① 山近英樹、固定化rhBMP-2 による骨形成に関する研究、第 53 回日本口腔外科学会総会、2008 年 10 月 21 日、徳島

② 松原正和、ラット脂肪由来幹細胞による骨形成能の評価、第 53 回日本口腔外科学会総会、2008 年 10 月 20 日、徳島

③ Yamachika E, Treatment for osteosarcoma of the mandible with

chemotherapy: A case report. American Association of Oral and Maxillofacial Surgery 89th Annual Meeting Honolulu, Hawaii, October 8 - 13, 2007.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山近 英樹 (YAMACHIKA EIKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 10294422

### (2) 研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA HIDETSUGU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 70335628

### (3) 連携研究者

なし