

平成21年 6月 19日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号： 19791020
 研究課題名（和文） 大型骨組織再生を目指した骨髄間葉系細胞を用いた治療法の総合的研究
 研究課題名（英文）
 研究代表者
 早乙女 進一（SOTOME SHINICHI）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授
 研究者番号：20401391

研究成果の概要：

ヒトおよびサル骨髄由来間葉系細胞（MSC）を使用して、大型骨組織再生に関する研究を行った。MSCは細胞数を増加させるために長期間培養を継続すると、分化能が低下するばかりではなく、分化を抑制することが確認された。また、多孔質の生体吸収性人工骨をMSCの担体として使用し骨形成を確認したところ、骨組織は主に人工骨の気孔の内部に形成され、人工骨の外周部にはほとんど形成されていなかった。そのため、再生したい骨と同形状の人工骨を用いることが望ましいと考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：若手研究（B）

キーワード：骨髄間葉系細胞、大型骨再生

1. 研究開始当初の背景

- (1) 骨欠損を修復するためには、自分の健全な骨を採取して移植を行う自家骨移植という方法が一般的に用いられている。しかし合併症や使用量の限界といった問題がある。
- (2) MSCは多分化能を有しているが、細胞数を増やすために培養を継続すると分化能が低下してしまう。
- (3) 骨組織を再生するためには細胞の他

に再生の足場が必要となる。しかし大型の骨組織を再生させるための足場材量に適した条件などは不明である。

2. 研究の目的

- (1) MSCの増殖に伴う分化能低下のメカニズムの解明
- (2) 大型骨組織再生のための足場材量に関して検討すること

- (3) その他大型骨組織再生のために有用である技術を開発すること

3. 研究の方法

- (1) サルの MSC を培養し、継代を繰り返す。培養の期間、第 1 世代および第 5 世代の MSC を凍結保存し凍結保存した。これを融解し様々な比率で混合し多孔質人工骨に導入し移植を行った。
- (2) 様々な顆粒径を有する多孔質人工骨やブロック状の人工骨を用い、骨形成の進展の状態を組織学的に検討した。
- (3) 血漿を応用した MSC の担体への導入法や低圧を応用した MSC の導入法の有効性について検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 第 1 世代のサル MSC と第 5 世代の MSC の骨形成能の比較では、第 5 世代の MSC は第 1 世代に比較して骨形成量が減少していた。また、第 1 世代の MSC に第 5 世代の MSC を追加した場合、第 1 世代 MSC 単独での骨形成量に比較して骨形成量は減少しており、第 5 世代の MSC には骨形成を抑制する因子が発現していることが確認された。
- (2) 顆粒状の人工骨に MSC を導入し、一塊にして移植した場合、顆粒の内部の気孔には骨形成が認められたが、顆粒間の間隙にはほとんど骨形成を認めなかった。また、顆粒径を小さくすることで、顆粒間の間隙を小さくした場合も、顆粒の間隙への骨形成は少なく、人工骨の気孔内という環境が骨形成に適した環境であることが確認された。この結果より大型骨組織を再生するためには、再生したい骨と同形状の担体が適していると考えられた。そこで再生したい骨と同形状の大型の担体（人工骨）を用いて骨組織を再生させた。すると、人工骨の気孔内に旺盛な骨形成が認められた。しかし、骨組織に囲まれてしまった人工骨は吸収が進行せず、約 1 年間経過した後も人工骨が相当量残留しており、再生された骨組織の強度に与える影響が危惧された。
- (3) MSC を自己血漿に浮遊させ、ゲル化を誘導すると同時に人工骨内に導入して移植を行った。MSC を担体内に導入する際、一般的には培養液に MSC を

浮遊させて導入を行うが、この血漿を使用した MSC の導入法では、培養液を用いる方法に比較して、同等の骨形成を得るのに約 1/10 量の細胞数で済むことが確認された。また低圧環境を応用した細胞導入法では、効率よく MSC が担体内に導入され、また骨形成量も増加していることが確認された。

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 7 件)

- ① Bone regeneration with autologous plasma, bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate in non-human primates. Torigoe I, Sotome S, Shinomiya K. (9名中2番目) *Tissue Engineering*, in press (査読あり)
- ② Fresh bone marrow introduction into porous scaffolds using a simple low-pressure loading method for effective osteogenesis in a rabbit model. Yoshii T, Sotome S, Shinomiya K. (7名中2番目) *J Orthop Res*, 27:1-7, 2009 (査読あり)
- ③ Effects of pore size and implant volume of porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) on bone formation in a rabbit bone defect model. Tsuchiya A, Sotome S, Shinomiya K. (8名中2番目) *J Med Dent Sci*. 2008; 55:91-99 (査読あり)
- ④ Effects of cryopreservation on bone marrow derived mesenchymal cells of a nonhuman primate. Tokumoto S, Sotome S, Shinomiya K. (5名中2番目) *J Med Dent Sci*. 2008; 55:137-143 (査読あり)
- ⑤ A three-dimensional cell-loading system using autologous plasma loaded into a porous β -tricalcium-phosphate block promotes bone formation at

extraskeletal sites in rats. Tajima N, Sotome S, Shinomiya K. (5名中2番目) *Mat Sci eng:C*, 2007; 27:625-632 (査読あり)

- ⑥ Novel cell seeding system into a porous scaffold using a modified low-pressure method to enhance cell seeding efficiency and bone formation. Torigoe I, Sotome S, Shinomiya K. (7名中2番目) *Cell Transplantation*, 2007;16(7):729-39 (査読あり)
- ⑦ Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. Oshina H, Sotome S, Shinomiya K. (9名中2番目) *Bone*, 2007; 41(4): 575-583 (査読あり)

[学会発表] (計 13件)

- ① Ichiro Torigoe, Shinichi Sotome, Akio Tsuchiya, Toshitaka Yoshii, Hidetsugu Maehara, Yumi Sugata, Kenichi Shinomiya. Bone regeneration with autologous plasma, bone marrow stromal cells, and porous beta-tricalcium phosphate in non-human primates. 54th Annual meeting of the orthopaedic research society. March 2-5, 2008
- ② 菅田裕美、早乙女進一、前原秀二、川崎雄一、湯浅将人、四宮謙一、望月直美、平野昌弘 : ビスフォスフォネートが生体吸収性骨補填材の吸収と骨形成に与える影響. 第28回整形外科セラミック・インプラント研究会、2008年12月6日
- ③ 鳥越一郎、早乙女進一、土谷明男、吉井俊貴、前原秀二、川崎雄一、菅田裕美、四宮謙一 : 骨髄間質細胞/多孔質 β -TCP複合体による新生骨形成におけるフィブリンと血清の関与. 第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13-14日
- ④ 早乙女進一、土谷明男、鳥越一郎、吉井俊貴、前原秀次、望月直美、平野昌弘、四宮謙一 : 多孔質HAp/Co1大量移植時の組織学的検討および安全性の検討. 第81回日本整

形外科学会総会、2008年5月22-25日

- ⑤ 前原秀二、早乙女進一、鳥越一郎、吉井俊貴、川崎雄一、菅田祐美、平野昌弘、望月直美、四宮謙一 : 多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体(HAp/Co1)とFGF-2を用いた骨軟骨欠損の修復. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会、2008年10月23-24日
- ⑥ 早乙女進一、前原秀二、吉井俊貴、鳥越一郎、菅田祐美、新井嘉容、川端茂徳、加藤剛、大川淳、四宮謙一 : 新鮮骨髄液の多孔質 β -TCPへの低圧下導入法と臨床応用. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会、2008年10月23-24日
- ⑦ 土谷明男、早乙女進一、鳥越一郎、望月直美、平野昌弘、四宮謙一. ヤギ腸骨骨欠損モデルにおける骨置換型補填剤である多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Co1)の有効性評価. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007年10月25-26
- ⑧ 吉井俊貴、早乙女進一、鳥越一郎、土谷明男、前原秀二、四宮謙一. 新鮮骨髄液の多孔質 β -TCPへの低圧下導入法と臨床応用. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007年10月25-26
- ⑨ 吉井俊貴、早乙女進一、前原秀二、土谷明男、鳥越一郎、四宮謙一. 継代培養に伴う骨髄間葉系細胞の分化能低下とその指標について. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007年10月25-26
- ⑩ 鳥越一郎、早乙女進一、土谷明男、吉井俊貴、前原秀二、四宮謙一. ゲル化自己血漿/骨髄間葉系細胞/多孔質 β -TCP複合体による新生骨形成促進の機序. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007年10月25-26
- ⑪ 早乙女進一、土谷明男、鳥越一郎、吉井俊貴、前原秀二、望月直美、平野昌弘、四宮謙一. 多孔質HAp/Co1大量移植時の組織学的検討および安全性の検討. 第27回整形外科セラミックインプラント研究会. 2007年12月8日
- ⑫ 早乙女進一、土谷明男、鳥越一郎、吉井俊貴、前原秀二、望月直美、平野昌弘、四宮謙一. ヤギ腸骨骨欠損モデルにおける骨置換型骨補填材である多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Co1)の有効性評価. 第27回整形外科セラミ

ックインプラント研究会. 2007年12月8日

- ⑬ 川崎雄一、早乙女進一、土谷明男、吉井俊貴、鳥越一郎、前原秀二、望月直美、平野昌弘、四宮謙一. γ 線滅菌による多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Col)の機械的強度、及び生体内での骨形成、材料吸収への影響. 第27回整形外科セラミックインプラント研究会. 2007年12月8日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早乙女 進一 (Shinichi Sotome)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・脊椎・脊髄再生治療学講座・寄附講座
准教授

研究者番号：20401391

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし