

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791974

研究課題名（和文） 末梢血を用いた細胞塊移植療法とその閉鎖系培養システムの開発

研究課題名（英文） The development of cell spheroid implantation therapy using the peripheral blood and the closed culture system

研究代表者

末永 英之（SUENAGA HIDEYUKI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10396731

研究成果の概要（和文）：

間葉細胞の凝集は膜性骨化の早期において重要な役割を果たし、三次元的環境・動的環境は骨分化を促進することが知られている。本研究では、人工材料を使用せずに骨再生を試みた。骨の発生を模倣するため、旋回培養によって骨髓由来間葉系細胞および末梢血単核細胞を用いて三次元細胞塊を形成し、ヌードラット頭蓋骨欠損部に移植した。組織学的解析、マイクロCT解析、ラマンスペクトル解析、力学的解析によって骨再生能を評価した。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that mesenchymal cell condensation plays an important role in the early stages of membranous osteogenesis, three-dimensional and dynamic flow can positively enhance the osteodifferentiation. In this study, we tried to conduct bone tissue engineering without any synthetic or exogenous biomaterials. To imitate bone development, we generated three-dimensional cellular spheroid using bone marrow derived stromal cells and peripheral blood mononuclear cells by rotation culture, then implanted them into the nude rat calvarial defects. We evaluated the bone regenerative capacity of the rats by histological, immunochemical, maicro CT, raman spectrum analysis and mechanical analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：口腔外科学、再生医学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：移植・再生医療、発生・分化、三次元培養、細胞塊

## 1. 研究開始当初の背景

自家骨移植が外傷、疾患や先天的欠損の再

建法のゴールドスタンダードである状況は続いているが、この方法は採取部への侵襲、また、採取できる量に限界があるという問題

がある。骨補填材として使用されているリン酸カルシウムは汚染物質や細菌類を吸着し、また、血管誘導能がなく、口腔内領域などの準清潔手術では感染のリスクが高く、短期間では骨に置換されない。したがって、新たな骨再生法の確立が求められている。その候補として、細胞と成長因子と足場を利用した再生医療が期待されている。

骨髄間葉細胞および末梢血単核細胞中には様々な組織に分化することのできる幹細胞を含んでいることが報告されており、骨への分化も可能であると報告されている。間充織の凝集は多くの組織（例えば骨、軟骨、筋肉など）の発生の段階の初期段階の1つである。また、骨の発生の初期段階において、間葉細胞の前駆細胞が将来骨になる部位に凝集し高密度に集積することが知られている。また、インテグリンなどの接着分子は幹細胞において強く発現し、細胞凝集、また、増殖や分化において重要な役割を果たしていることが報告されている。

三次元環境は、骨再生にとって重要であり、これまで骨分化に関する様々な三次元培養法を用いた報告がなされている。例えば、マイクロマス培養、ペレット培養、スフェロイドアレイなどの高密度培養を用いた三次元培養である。これらは、細胞が三次元に集合して細胞塊となるため、細胞が二次元に集合する単層培養法と比べ、細胞の特異的な機能を長期間維持することができる。これまでに、我々は旋回培養法を用い骨髄単核細胞より細胞塊が形成されるのを確認し、旋回培養法による細胞凝集および三次元動的流れの環境が骨分化を促進することを見出した。また、この足場のない培養条件で、軟骨分化の検討をすすめ、軟骨組織を構築することが可能であった。旋回培養法は、三次元培養法のひとつで、細胞懸濁液の継続的な旋回により細胞の凝集を促進して細胞塊を形成し、“三次元的かつ動的な環境”により発生過程の細胞凝集・細胞間相互作用を *in vitro* において再現しようとするものである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨髄液や血液中の単核細胞を用い“自己細胞のみ”で生体外にて細胞塊を構築し、発生過程初期における細胞凝集を再現し、生体内に細胞塊を移植し、骨再生が可能か組織学的解析、遺伝子発現解析、マイクロCT解析、ラマン分光法解析、力学的解析によって検証することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 三次元培養法による細胞塊の形成

ヒト骨髄および末梢血より、Histopaqueを使

用し、濃度勾配により、ヒト骨髄由来間葉系細胞および末梢血単核細胞を分離した。非接着性のプレートに  $1.0 \times 10^7$  個の細胞を播種し、インキュベーター内において振とう機を用い旋回培養を行った。

### (2) 形態学的検討・生死判定

旋回培養によって形成された細胞塊の形態観察および Calcein-AM, Propidium Iodide 二重染色による生死判定を行なった。

### (3) リアルタイム RT-PCR 分析

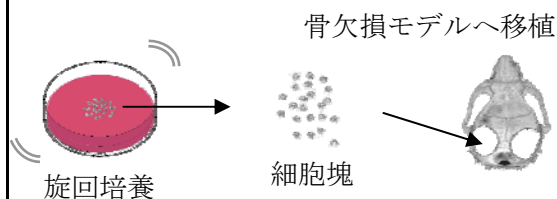
細胞塊の Collagen Type1, ALP, Cbfa1, Osteocalcin, Osteopontin の mRNA の発現量を定量的に評価するために real time RT-PCR を行なった。旋回培養と単層培養を培養3日後および7日後に比較した。

### (4) ALP 活性測定

単位 DNA 量当たりの ALP 活性値として評価した。旋回培養と単層培養を培養3日後および7日後に比較した。

### (5) 骨欠損モデルにおける細胞塊移植

8週令のヌードラットを用い、頭蓋骨に8mmの骨欠損を作製した。骨欠損部に細胞塊を移植し、8週間後に組織学的、マイクロCT、ラマン分光法解析、力学的解析によって骨再生能を評価した。移植をしていない対照側と比較した。



### (6) 組織学的評価

ヘマトキシリン・エオジン染色、オステオカルシン抗体・オステオポンチン抗体を用いた免疫染色を行なった。

### (7) マイクロCTによる三次元的解析

サンプルは約  $100 \mu\text{m}$  の厚さでスキャンし、3D 構造解析ソフトウェアにて解析した。

### (8) ラマン分光法によるスペクトル解析

レーザー波長は  $785\text{nm}$ 、スペクトルの露出時間は  $5.00\text{s}$ 、平均スペクトルは、20 のスペクトルを用いて、OMNIC spectroscopy software を用いて処理し、既存骨と比較した。

### (9) 力学的評価

3点曲げによる破壊試験により、曲げヤング率、曲げ応力を測定した。サンプルの支点間距離は  $1.5\text{mm}$  で、ロードはサンプルが破断さ

れるまで中央に 0.3mm/分の一定の変形率で行ない、ヤング率と最大破断値を求めた。 $\beta$ -TCP 顆粒を移植したもの、 $\beta$ -TCP 顆粒と細胞塊を混合したもの、および既存骨と比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 三次元培養法による細胞塊の形成

1.0の $\times 10^7$ 個のヒト骨髄由来間葉系幹細胞および末梢血単核細胞より約 $2.0 \times 10^4$ 個の細胞塊を形成した。

##### (2) 形態学的検討・生死判定

細胞塊の直径は約 $300 \mu\text{m}$ であり、Calcein-AM, Propidium Iodide 二重染色により、ほとんどの細胞は生細胞であった。

##### (3) リアルタイム RT-PCR 分析

旋回培養では、培養3日後および7日後ともに、単層培養と比べて Collagen Collagen Type1, ALP, Cbfa1, Osteocalcin, Osteopontin の mRNA の発現量の上昇を認めた。

##### (4) ALP 活性測定

ALP 活性は、培養3日後および7日後ともに、単層培養と比べて旋回培養により形成された細胞塊で上昇を認めた。

##### (5) 骨欠損モデルにおける細胞塊移植

細胞塊は骨欠損部に接着し、欠損部に充填することが可能であった。

##### (6) 組織学的評価

HE 染色では、細胞塊を移植した部分に血管を含む骨様組織を認め、移植をしていない対照側では、線維様組織を認めた。オステオカルシン抗体・オステオポンチン抗体を用いた免疫染色において、移植部分は陽性であり、移植をしていない対照側では、陰性であった。

##### (7) マイクロ CT による三次元的解析

細胞塊を移植した部分では、X 線吸収度の上昇範囲は拡大し、骨欠損部のほぼ全域におよび、既存骨と骨欠損領域の境界は不明瞭となった。移植をしていない対照側では、既存骨周囲にわずかな X 線吸収度の上昇がみられるのみであった。

##### (8) ラマン分光法によるスペクトル解析

細胞塊を移植した部分に形成された骨様組織は、 $1065\text{-}1070\text{cm}^{-1}$ 、 $945\text{-}964\text{cm}^{-1}$ 、 $919\text{cm}^{-1}$  にピークを示し、既存骨のラマンスペクトルと一致した。

##### (9) 力学的評価

細胞塊移植による新生骨は応力値と曲げヤ

ング率において、既存骨には劣るものの、 $\beta$ -TCP 顆粒を移植したもの、 $\beta$ -TCP 顆粒と細胞塊を混合したものに比べ有意に高い応力値と曲げヤング率を示した。

骨・軟骨発生の初期において細胞凝集は重要であり、間葉系細胞が凝集した後に基質を分泌する。本培養法は発生における細胞凝集ステップを生体外において再現するものである。単層培養と違い、三次元かつ動的環境における凝集塊は生体組織に形態的・機能的にも近く、生体内環境および発生過程における細胞凝集に類似し、生体外の組織構築に重要である。本研究では、人工材料や足場のない培養条件において形成された細胞塊は細胞と自ら分泌するマトリックスのみで構成された。細胞塊は直径 $300 \mu\text{m}$ 程度であり、生体内における拡散による物質交換の限界距離とほぼ一致する。浮遊培養系であるため細胞塊は回収が容易で、また、移植の際に細胞の足場となる担体がなくても、分泌されたマトリックスにより接着し欠損部への充填が容易であった。

本研究によって、旋回培養により骨への分化が促進され、ヒト骨髄細胞および末梢血由来の細胞塊の移植によって形成された新生骨は、組織学的解析、マイクロ CT 解析、ラマンスペクトル解析、力学的解析において、既存骨に近似した性質を持つことが示唆された。骨髄液や血液中の単核細胞より形成された細胞塊を移植することにより、骨再生が可能であることが示唆された。この方法は、他の組織においても、応用可能と考えられ、人工材料や足場を必要としない新たな組織再生法へ発展する可能性がある。

#### 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 Chikazu D, Fujikawa Y, Fujihara H, Suenaga H, Saijo H, Ohkubo K, Ogasawara T, Mori Y, Iino M, Takato T. Cyclooxygenase-2 Activity is Important in Craniofacial Fracture Repair. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 40(3): 322-6, 2011 (査読有)

② Ogasawara T, Ohba S, Fujihara Y, Takahashi T, Liu G, Chikazu D, Suenaga H, Chung UI, Yoda T, Mori Y, Susami T, Takato T, Hoshi K. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Combination with Fibroblast Growth Factor-2 and Insulin-like Growth Factor-I for Chondrocyte Proliferation Culture and Cartilage Regenerative Medicine.

Asian J Oral Maxillofac Surg. 21:18-26,  
2009 (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

鈴木友香子、末永英之、杉山円、前田祐二郎、  
斉藤健太郎、近津大地、小笠原徹、森良之、  
飯野光喜、高戸毅 ヒト末梢血単核細胞を用  
いた細胞塊移植による骨再生 第54回 日本  
口腔外科学会総会 2009年10月10日 札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

末永 英之 (SUENAGA HIDEYUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10396731

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし