

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592196

研究課題名（和文） 末梢血単核細胞を用いた再生治療の可能性

研究課題名（英文） Capability of Regeneration Therapy with Peripheral Mononuclear Blood Cells (PBMCs)

研究代表者

月村 直樹 (TSUKIMURA NAOKI)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10301558

研究成果の概要（和文）：*in vitro*で骨形成原細胞と末梢血単核細胞（Peripheral Blood Mononuclear Cells）細胞を共培養すると細胞増殖能が有意に上昇すること、分化能においても、有意になることを確認した。*in vivo*では、ラットの大腿骨に骨欠損モデルを作製し、そこにPBMCをアテノコラーゲンに浸漬し、 μ CTと切片標本にてその骨造成を確認したところ、PBMCを浸漬したアテノコラーゲンの実験群において、骨造成が認められた。このことより、免疫細胞が骨形成原細胞の表現型と機能を調節する能力を持つ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*In vitro* study, the number of cultured bone marrow cells cultured at day 3 increased in the PBMC concentration-dependently showed greater number of cells. Cell metabolic activity also increased with an increase of PBMC concentration up to by 40%. Likewise, ALP activity increased at day 5 and 10 with PBMC.

In radiological study, cancellous bone formation was observed from early time point and cortical bone formation was inhibited in the transplantation group. In histological study, similar results were observed. Increase of cancellous bone formation was observed in transplantation group.

An addition of the PBMCs, elevated functional phenotypes of osteoprogenitor cells *in vitro* and *in vivo*. These findings warrants further in-vitro and in-vivo exploration of PBMCs as a novel source of cell therapy for bone regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学

1. 研究開始当初の背景

歯科医療における再生療法の重要性、必要

性は年々、増しつつある。年率15%強の増加

傾向にあるインプラント治療の前処置としての骨造成、そして歯周疾患時の歯槽骨の再生がそれにあたる。しかしながら、手術時の技術上の困難性、ホスト側の生物学的許容の限界、用いる生体材料の生体活性の限界などの問題から、骨組織の再生には骨量、骨質の限界があり、おのずから次に施される有効な歯科治療の適応にも限界が生じている。

一方、骨免疫学は骨破壊を扱う整形外科学の骨代謝学と自己免疫を扱う免疫学の学際的な研究領域である。骨と免疫系の細胞の多くは、制御因子を共有している上に、共通の微小環境で分化増殖するため、免疫細胞はサイトカイン産生や細胞膜上の分子を介して骨格系細胞の分化や機能制御に深く関与している。リウマチや歯周病のように炎症性の骨疾患において骨吸収が起こること、すなわち、破骨細胞は、造血幹細胞から分化した単球マクロファージ系の前駆細胞に由来するが、この分化過程が滑膜において異常に活性化するメカニズムの解明について様々な方向から研究が行なわれている。

しかしながら、破骨細胞関連の研究が多く行なわれているのとは対照的に、骨形成原細胞と免疫細胞の生物学的反応については、驚いたことにほとんど報告されていない。免疫細胞と破骨細胞の関連を鑑みても、骨芽細胞に何にも影響を与えていないとは思えず、体内の骨再生において免疫細胞は重要な役割を担っているものと考えられる。そこで、我々は免疫細胞が骨形成原細胞の表現型と機能を調節する能力も併せ持つとの仮説を立て研究を行った。

2. 研究の目的

この研究の目的は、骨形成原細胞と末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells) を共培養し、骨形成原細胞の増殖、分化そして石灰化能を見ることで、免疫細胞の

骨形成原細胞への影響を確認することである。

最終的に得られたデータは、未だ不明な点が多い骨免疫学の一つである骨芽細胞と免疫細胞との関連を明らかにする糸口になると同時に、外傷による骨折部位への応用、顎変形症などの骨離断への応用、抜歯後の骨欠損の部位における補填、さらにはインプラント治療への応用など、過去にインプラントの治療法の一つとして報告された多血小板血漿を用いた方法や骨髄由来の間葉系の幹細胞を誘導することでできた培養骨を移植する方法などに代わるような、新しく安全で簡便な補綴的、外科的な再生治療法になりうると思われる。

3. 研究の方法

(1) ラット未分化間葉系幹細胞を用い培養系における免疫細胞の骨芽細胞分化能促進の評価

今回、実験に用いた細胞は、8週齢 Sprague-Dawley 系雄ラットの大腿骨から採取した骨髄細胞を、骨芽細胞誘導培地と非誘導培地を用い、100 mm 細胞培養ディッシュに播種して静置培養した。細胞採取後4日目に付着した細胞のみを分離して継代を行い、ラット骨髄由来未分化間葉系幹細胞として培養を続けた。さらに80%コンフルエントに達した7日目に再度分離回収を行い、12穴ポリスチレン培養プレートに直に 2×10^4 個/cm² の濃度で細胞を播種します。すべての実験期間を通じて細胞培養は 37 °C、5 %CO₂、95 %Air のインキュベータ中で行い、播種前と同一成分の骨芽細胞誘導培地と非誘導培地を用いて、これを3日ごとに全量交換した。

末梢血単核細胞は、同様のラットの心臓から血液を採取し、Nycoprep1.077A を用いて分画し、buffy layer に溜まった細胞をパステールピペットで注意深くとり、RPMI1640 に

て保存した。ラットの間葉系幹細胞を2日間培養後、末梢血単核細胞と共培養した。それぞれの細胞の濃度については、最適化をまず行なった。

評価方法であるが、まず細胞増殖能は、細胞播種後4日と6日目に細胞を2回PBSでwashした後、37°Cで15分間、0.1%コラゲナーゼを加えた0.25%トリプシン-1mM-EDTA-4Naにて細胞を回収し、ヘマトサイトメータを使用し細胞数を数えた。

次に、細胞骨関連mRNAの発現解析は、各サンプル上に細胞を播種してから4、7、14日目に各群の細胞を回収し、RT-PCR法を用いて骨関連遺伝子であるI型コラーゲン、オステオポンチンおよびオステオカルシンmRNAの検出を行った。PCR産物はエチジウムブロマイド染色を行い、1.5%アガロース・ゲルで電気泳動を行う。紫外線光下で取り込んだバンドの画像を解析ソフトで数値化し、ハウスキーピング遺伝子であるglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現量を基準として遺伝子発現を半定量化した。

さらに、細胞増殖能および骨産生や石灰化物の有無を見るためのALP染色を行い、視覚的にその違いを把握すると同時にコンピュータ・ソフトを用いて定量化した。

(2)ラット生体系を用いた免疫細胞含有生体材料の骨再生能・造成能の評価

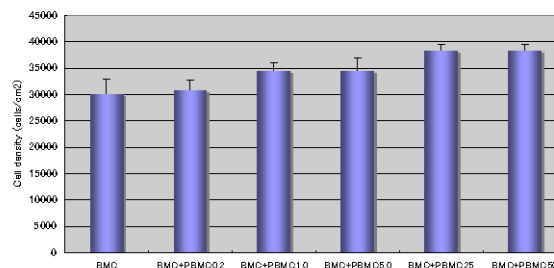
実験に用いたラットは、8~12週齢系F344/jclである。欠損骨の再生モデルは、大腿骨上に直径1.8mmの大きさのトレファインバーを用いて骨欠損を作製した。そして、欠損部分に免疫細胞含有ならびに非含有のアテノコラゲンスポンジを挿入し縫合した。骨再生の解析は、治癒1,2,3,4週にて組織学、マイクロCTによって行った。

3年間において、1年目において培養系におけるデータを蓄積し、2、3年目に生体系におけるデータを蓄積し完了した。

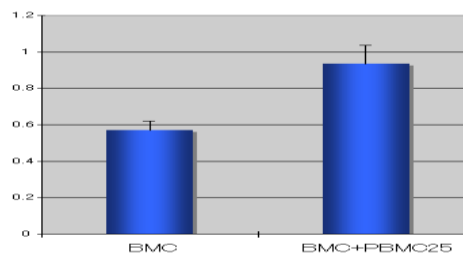
4. 研究成果

初年度に、*in vitro*で細胞を共培養すると細胞増殖能が有意に上昇すること、分化能においても、ALP染色を行い、視覚的にその違いを把握すると同時にコンピュータ・ソフトを用いて定量化したところ、有意に上昇することが確認された。さらに、細胞骨関連mRNAの発現解析をRT-PCR法を用いて骨関連遺伝子の発現が有意になることを確認した。

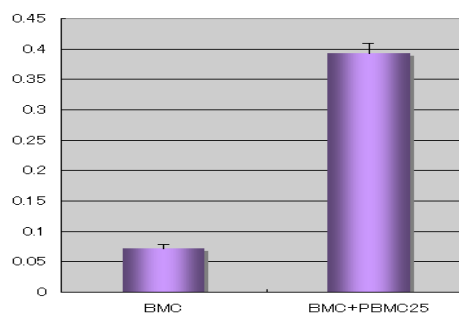
Cellular metabolism



Cell proliferation



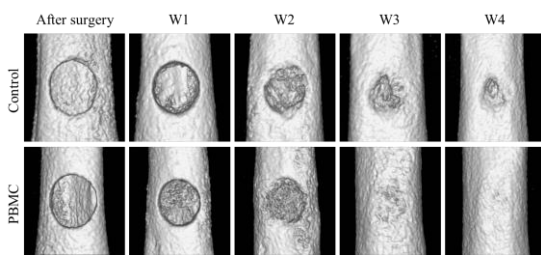
Alkaline phosphatase (ALP) activity



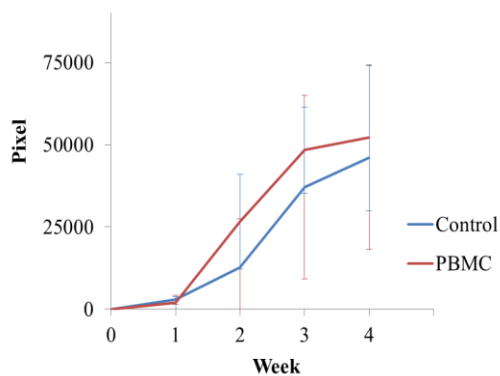
2年目以降は、免疫細胞(末梢血単核細胞)が、骨芽細胞の生物学的能力の亢進の一役を担っていることが *in vitro* で確認できたことの検証として *in vivo* で実施した。すなわち、ラットの大腿骨に骨欠損モデルを作製し、そこに 1×10^7 のPBMCをアテノコラーゲンに浸漬し、骨欠損モデルにデリバリーして1, 2, 4週間後の切片標本と1, 2, 3, 4週間後の μ CTにて骨造成を確認した。

その結果、アテノコラーゲンのみを骨欠損に入れたコントロール群に比べ、PBMCを浸漬したアテノコラーゲンの実験群において、骨造成が認められた。

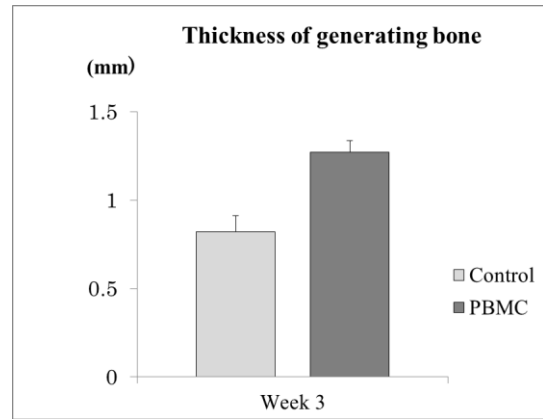
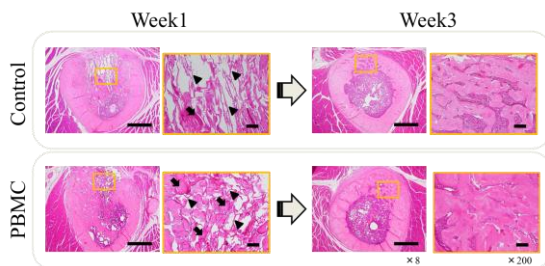
Micro CT analysis



Hard tissue formation



Histological evaluation



このことより、免疫細胞が骨形成原細胞の表現型と機能を調節する能力を持つ可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計3件)

① Naoki Tsukimura, et al, Effect of Local Transplantation with Peripheral Blood Mononuclear Cells for Bony Defect, 91th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, March 21th 2013, Seattle, WA, USA

② 月村直樹ほか, 骨再生のための末梢血単核球細胞治療, 口腔先端応用医科学研究会第3回学術会議, 平成23年1月22日, 東京医科歯科大学(東京都)

③ Naoki Tsukimura, et al, Peripheral Blood Mononuclear Cell Therapy for Pre-Prosthetic Bone Generation, 89th General Session & Exhibition of the IADR, March 16th, 2011, San Diego, Ca, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

月村 直樹 (TSUKIMURA NAOKI)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10301558

(2) 研究分担者

本田 雅規 (HONDA MASAKI)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：70361623

磯川 桂太郎 (ISOKAWA KEITARO)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：50168283

本田 和也 (HONDA KAZUYA)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：30199567