

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24年3月31日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792054

研究課題名（和文）骨組織の長期凍結保存法とその臨床応用の検討

研究課題名（英文）Long term cryopreservation of bone tissue for clinical use

研究代表者 加来 真人（Masato Kaku）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10325194

研究成果の概要（和文）：磁場を利用したプログラムフリーザーにおける骨芽細胞の至適凍結条件が明らかになった。また、凍結後の骨芽細胞は、高い生存率および増殖能を有するのみならず、骨関連因子の発現量が凍結前と比較して差がないことが明らかになった。さらに、組織レベルにおいても凍結後の骨組織より骨芽細胞の遊走が認められるとともに、移植後にその生着が生じることが明確に示された。このことから、骨組織の長期凍結保存とその後の移植が可能であり、さまざまな骨欠損症例の治療における有用性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：A plunging temperature of -30°C , a hold-time at -5°C for 15 minutes and a 0.1 mT of a magnetic field led to both the greatest survival and growth rate. Moreover, there was no significant difference in ALP, OPN and BSP mRNA expression and protein concentration between cryopreserved and control groups. New bone formation and bone bridge were detected in 8, 12 and 24-week control groups. In 4- and 8-week cryopreserved and dried groups, there was no new bone formation around the intact bones. New bone formation was observed in 12-week cryopreserved group and the transplanted bone was connected to the intact bone in 24-week cryopreserved group. In 12 and 24 weeks, a large amount of bone resorption in the transplanted area was observed in the dried group.

These results suggest that bone tissue cryopreservation can be successfully used for bone grafting which may be a novel option for cranioplasty.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：再生医療、骨組織、凍結保存、磁場、プログラムフリーザ

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂患者に対する顎裂閉鎖や、デンタルインプラント埋入時に骨量が不足している場合には、新鮮自家腸骨海綿骨移植やオトガイ部からの骨移植が行われる。その際、必要量よりも多めに骨組織を採取し、手術時に移植骨が不足しないように配慮するのが一般的である。一方、移植時の余剰な骨組織は廃棄されているが、後日再移植を行う場合や、移植を2回に分けて行う場合には、これらの骨組織の長期凍結保存が有用であり、患者の負担を軽減する意味でその臨床的価値は大きいものと考えられる。一般に生体組織の凍結時には、細胞内に存在する水分子が結晶化し、クラスターを形成することにより凍害が生じるとされている。したがって、凍結時に水分子のクラスター化を抑制できれば、細胞への為害性は低下し、解冻時の細胞生存率が向上するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、凍結時の細胞に対する凍害を防止するために開発された磁場を利用したプログラムフリーザーを用いて、解冻後の細胞生存に与える影響と骨関連因子との関わりを明らかにするとともに、凍結骨組織の生体への移植の可否について検討した。

3. 研究の方法

生後0日齢マウス頭蓋骨より骨芽細胞を単離培養した後、最終到達温度、植氷時間、付与する磁場強度がマウス骨芽細胞の生存に及ぼす影響について検討を行った。細胞の凍結保存には、凍結保存液として20%トレハロース含有バンバンカーII[®]および10%ジメチルスルホキシド(DMSO)含有バンバンカーII[®]を使用し、プログラムフリーザーにてそれぞれ一次冷却を施した後、-150℃の超低温フリーザーに保存した。7日間細胞を凍結保

存した後、解冻し生存細胞数の算定を行った。また、解冻48時間後の増殖細胞数についても同様に算定した。次に、先の検討により明らかにされた至適凍結条件下で凍結保存した骨芽細胞の解冻後骨形成能を評価するため、アルカリフォスファターゼ(ALP)の遺伝子発現と活性値、オステオポンチン(OPN)および骨シアロプロテイン(BSP)の遺伝子とタンパク発現について検討を行った。さらに、骨組織に及ぼす凍結保存の影響を検討するため、ラット頭蓋骨を摘出し、4週間凍結保存を行った後、器官培養を行って骨芽細胞の遊走を確認した。次いで凍結した骨組織を再び同欠損部へ移植し、4、8、12、24週後に同部の組織学的観察を行った。なお、骨除去のみを受けたラットを対照群とした。

4. 研究成果

凍結保存液に20%トレハロースを用い、最終到達温度-30℃、植氷時間15分間、磁場強度0.01mTの条件下で磁場を利用したプログラムフリーザーにより骨芽細胞を凍結保存した結果、解冻直後の細胞生存率は約70%であった。また、解冻後48時間培養を行った細胞については有意な増殖を認めず、ほぼ死滅していた。

凍結保存液に10%DMSOを用い、最終到達温度-30℃、植氷時間15分間、磁場強度0.01mTの条件下で骨芽細胞を凍結保存した結果、解冻直後の細胞生存率は約80%であった。また、解冻後48時間培養を行った細胞については、解冻時の生存細胞数と比較して約24%の有意な増加が認められた。

以上の結果より、以下の実験には凍結保存液として10%DMSOを使用することとした。

先の実験の条件下にて凍結保存を行ったマウス骨芽細胞のALP、OPN、BSP遺伝子発現について未凍結群との比較を行った結

果、それぞれの遺伝子発現量に有意な差は認められなかった。また、凍結後の骨芽細胞のALP活性、OPNおよびBSPタンパク発現についても同様に、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

4 週間凍結保存を行ったラット頭蓋骨より、骨芽細胞の遊走と増殖が未凍結の骨組織と同様に認められた。骨移植4週後では移植骨周囲に新生骨は認められず、移植8週後にわずかに骨の新生を認めた。また、移植12週後では、移植骨と既存骨との間隙が新生骨により徐々に閉鎖されつつあったが、骨片が完全に結合するまでには至っていなかった。その後、移植24週経過時においては、その連続性が明確に認められるようになった。一方、対照群においては徐々に骨の新生を認めたものの、術後24週目においてもその量はわずかであった。

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. Abedini, S., Kaku, M., Kawata T., Koseki H., Kojima S., Sumi, H., Motokawa M., Fujita T., Ohtani J., Ohwada N., Tanne K. Effects of cryopreservation with a newly-developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues. *Cryobiology* ; 62:181-187, 2011.

査読有

2. Kaku, M., Kamada H., Kawata T., Koseki H., Abedini S., Kojima S., Motokawa M., Fujita T., Ohtani J., Tsuka N., Matsuda Y., Sunagawa H., Hernandez RA., Ohwada N., Tanne K. Cryopreservation of periodontal ligament cells

with magnetic field for tooth banking. *Cryobiology* ; 61:73-78, 2010.

[学会発表] (計3件)

1. 小跡 弘幸、加来 真人、河田 俊嗣、本川 雅英、藤田 正、大谷 淳二、Sara ABEDINI、小島 俊逸、丹根 一夫：磁場を利用した骨組織の長期凍結保存法、第69回日本矯正歯科学会、H22. 9. 27~29、横浜市
2. 小島 俊逸、加来 真人、河田 俊嗣、本川 雅英、藤田 正、大谷 淳二、小跡 弘幸、Sara ABEDINI、丹根 一夫：磁場を利用したラット骨髄由来間葉系幹細胞の長期凍結保存法、第69回日本矯正歯科学会、H22. 9. 27~29、横浜市
3. 小島俊逸、加来真人、河田俊嗣、本川雅英、藤田 正、大谷淳二、小跡弘幸、Sara Abedini、角 明美、丹根一夫：磁場を利用したラット骨髄由来間葉系幹細胞の長期凍結保存、第70回日本矯正歯科学会、H23. 10. 17~20、名古屋市

[その他]

ホームページ等

<http://teethbank.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加来 真人 (Masato Kaku)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10325194

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし