

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463060

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の移植後動態と骨再生能の解析 骨髄と脂肪組織の比較

研究課題名(英文) Histological examination of bone regeneration and cell kinetics induced by mesenchymal stem cells: comparison of bone marrow cells with adipose tissue cells

研究代表者

小島 拓 (Kojima, Taku)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：90515777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨再生向上のために培養技術が有用ではないかと考え、骨髄または脂肪組織由来間葉系幹細胞・多孔性β-TCPブロック複合体を用いた骨再生について組織学的に検討を行った。4週齢GFPラットの大腿骨と脂肪組織から間葉系幹細胞を分離培養後、多孔性β-TCPブロックに播種して骨芽細胞様細胞へと分化誘導した。この複合体を10週齢のヌードラット頭蓋骨に移植し、移植部位を組織化学的に解析した。その結果、分化誘導された骨髄細胞と脂肪組織由来細胞は高い骨再生能を有することが明らかとなった。これらの結果から骨髄細胞だけでなく脂肪組織由来の幹細胞も骨再生における有用な細胞源になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To aim for efficient bone regeneration, we employed tissue engineering which composed of mesenchymal stem cells and biomaterials. Therefore, we examined bone regeneration with bone marrow cells or adipose tissue cells/porous beta-TCP block composites by means of histological analysis. Bone marrow cells and adipose tissue cells obtained from 4-week-old GFP rat were induced into osteoblast-like cell, and then, seeded on a porous beta-TCP block. 10-week-old nude rats were implanted with the blocks in the calvariae, and then the blocks were extracted and examined histochemically. The differentiated bone marrow cells and adipose tissue cells have high osteogenic potential. Therefore, these results suggest that not only bone marrow cells but also adipose tissue cells have possibilities to be effective cell sources for bone regeneration.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨再生 間葉系幹細胞 バイオマテリアル 骨髄 脂肪

1. 研究開始当初の背景

広範囲な顎骨欠損に対しては腸骨、腓骨といった自家骨移植が現在のゴールドスタンダードであるが、骨採取手術や採取量の問題がある。そのため、近年では人工の骨補填材が骨再生治療に多く用いられている。人工材料にはハイドロキシアパタイト、 β -TCP、 β -TCP などが存在し、申請者はそれら種々の補填材に対する細胞動態と再生骨の骨質について報告してきた(Kojima T, et al. JBMM 2007, Kojima T, et al. Biomed. Res. 2007)。これまでの研究成果から、骨芽細胞と破骨細胞のカップリング様式により形成される骨基質の状態が全く異なること、カップリングは骨再生バイオマテリアルに影響されることが示唆されており、骨再生を評価する際にはカップリング現象を理解することが重要である。特に β -TCP については、破骨細胞による吸収が先行してから骨芽細胞による骨形成が生じることで緻密な新生骨が誘導されることを確認している。さらに骨髄由来間葉系幹細胞を骨芽細胞様細胞に分化させ β -TCP に播種したところ β -TCP 単独よりも効率的に骨再生が生じ、また β -TCP ブロックを用いることで三次元的骨再生法の可能性が示唆された(小島拓、他：日歯医会誌 2012)。こうした培養技術の応用により骨再生の向上が示されたが、移植後の培養細胞がどのような動態を示すかは不明である。移植後の培養細胞の動態を検索できれば、培養細胞の骨形成における役割を組織学的に解析できるものと思われる。一方で、脂肪組織にも骨髄と同様に間葉系幹細胞が存在するとの報告があるが、脂肪組織は比較的容易に採取可能であるため、脂肪組織由来幹細胞を用いた骨再生が実現すれば、極めて有用な細胞源となる。

そこで本研究では、間葉系幹細胞を応用した骨再生における移植後の培養細胞の動態と骨形成における役割、幹細胞採取部位の違いによる骨再生能の差異について組織学的に解析し検討を行う。

2. 研究の目的

本実験は GFP ラットより採取した間葉系幹細胞をヌードラットに移植する実験モデルを用いて解析を行う。GFP ラットは組織を構成する細胞の全てが GFP 蛋白を発現しており、移植後も GFP 蛋白を有するため、培養細胞の動態を追跡することが可能である(Okabe M, et al. FEBS Letters 1997)。移植後の GFP 陽性培養細胞の動態、移植母床の各細胞イベント(骨芽細胞と破骨細胞のカップリング、骨細胞・骨細管系ネットワーク)を観察することで、移植後の培養細胞の骨形成における役割を組織学的に解析する。

一方、間葉系幹細胞の採取部位の違いによる骨再生能の差を解析するため、骨髄由来幹細胞、脂肪組織由来幹細胞のそれぞれを応用

した再生骨について、量的評価だけでなく質的(骨質)評価も行う。

3. 研究の方法

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の審査により承認を得て、同ガイドラインに従って行った。

(1) 実験動物：

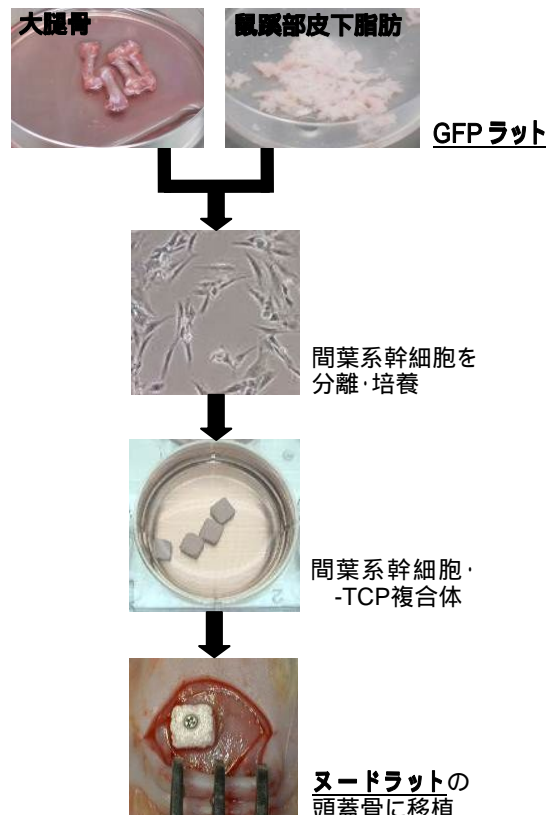
生後 4 週齢 GFP ラット(日本エルエスシー) 生後 10 週齢ヌードラット(日本クレア)

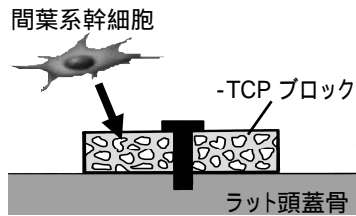
(2) 骨再生バイオマテリアル：

多孔性 β -TCP ブロック(オスフェリオン®；オリンパステルモバイオマテリアル社)；気孔率 75%、大きさ 5×5×2 mm

(3) 実験術式：

4 週齢 GFP ラットの大腿骨および鼠蹊部皮下脂肪から間葉系幹細胞を採取し、多孔性 β -TCP ブロックに播種した後、デキサメタゾン、グリセロリン酸、アスコルビン酸添加培地で骨芽細胞様細胞への分化を誘導しながら培養し、間葉系幹細胞・ β -TCP 複合体を作製した。その後、10 週齢ヌードラットの頭蓋骨に、実験群(間葉系幹細胞・ β -TCP 複合体)、対照群(β -TCP ブロック単体)に分けて移植を行った。実験群については、骨髄由来幹細胞、脂肪組織由来幹細胞のそれぞれについて解析を行った。一方で、培養細胞が骨芽細胞様細胞へ分化しているかを確認するため、アルカリフォスファターゼ、アリザリンレッドによる染色を行った。





【ヌードラット頭蓋骨前頭断像】

(4) 解析項目：

術後1日、1週、2週、4週、8週、12週、24週経過した時点で灌流固定を行い、移植した複合体を周囲組織も含めて採取し、骨新生について組織学的に検討を行った。

4. 研究成果

(1) GFP 遺伝子導入ラットからの各種組織由来の間葉系幹細胞の分離と骨分化の確認

4週齢 GFP 遺伝子導入ラットから大腿骨、鼠径部皮下脂肪を採取し、接着培養により間葉系幹細胞を分離、培養した。分離した各種組織由来の間葉系幹細胞を骨分化誘導培地で3週間培養し、アリザリンレッド染色による石灰化結節形成ならびにアルカリフォスファターゼ染色によるその活性の亢進を確認することで、骨芽細胞様細胞へと分化しているか確認した。その結果、いずれの組織由来の群においてもアリザリンレッドの陽性反応を認めた。特に、骨髄細胞由来による群では特に強い陽性反応を示した。



【骨髄由来間葉系幹細胞群】
(上段が非誘導群、下段が誘導群)



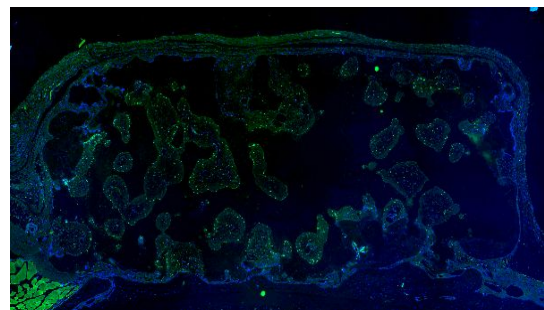
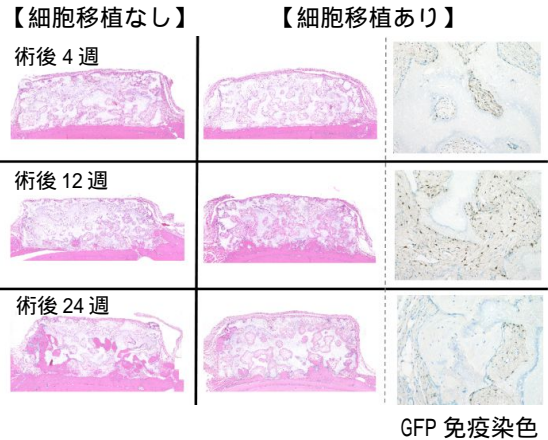
【脂肪組織由来間葉系幹細胞群】
(上段が非誘導群、下段が誘導群)

(2) 移植後の各観察ポイントにおける培養細胞動態の解析

それぞれ移植後1日、1週、2週、4週、8週、12週、24週経過した時点で試料を採材し、組織切片作製後 H-E 染色ならびに抗 GFP 抗体 (培養細胞の同定) を用いた免疫組織化学を行い、骨形成の評価ならびに移植細胞の動態を解析した。

骨形成の評価では細胞移植を行っても骨形成が亢進されないという結果となり、近交系ラットを用いた先行研究 (平成 24-26 年度若手研究 B) とは異なる結果を得た。この原因としては用いた被移植動物が免疫不全ラットであることに起因した骨代謝調節メカニズムの差や、-TCP ブロックへの細胞播種後の骨分化誘導が不十分であった可能性が考えられ、再検証および細胞トレーシング手法を変更した解析が必要であると考えられた。

GFP 陽性細胞の移植後生存期間に関しては術後 24 週と長期間経過しても生存が認められた。移植細胞は移植後長期間にわたり生体内で機能し得る可能性があり、適切な骨形成機能を付与させることにより生体内での骨形成に大きく寄与する可能性があることが示唆された。



術後 24 週 GFP 蛍光免疫染色

(3) 考察

間葉系幹細胞を応用した再生医療において、従来は幹細胞採取部位として骨髄が多く用いられてきた。しかし、骨髄採取は患者への侵襲が比較的大きく採取には術者の技術を要する。一方で近年、脂肪組織にも骨髄と同様に多分化能を有する間葉系幹細胞が存在することが報告されている。口腔領域においては、脂肪組織は頬粘膜下に存在する頬脂肪体から十分採取可能であるため、脂肪組織を用いた再生医療が実現すれば、骨髄に比較して容易に幹細胞を採取可能であるため、患者への恩恵も大きく、より低侵襲な骨再生医療の実用化および普及に寄与すると考えられる。今回、骨髄、脂肪組織由来間葉系幹細胞を骨芽細胞様細胞へと分化誘導したところ、すべての細胞で石灰化結節が形成されていることが確認できた。

GFP 陽性細胞の移植後動態については、術後 24 週経過しても GFP 陽性反応を認めたことから長期間の生存が認められた。したがって移植細胞は移植後長期間にわたり生体内で機能し得る可能性がありことが示唆された。しかし一方で、GFP 陽性反応を認めるものの、その細胞はただ残存しているのみで機能的には役割を果たしていないとの報告もある。したがって今後は各種機能マーカーを用いた評価も必要であると考えている。

骨再生研究では、新生骨の形成量をみる量的解析だけでなく、新生骨の骨質をみるための質的解析も行うことが重要である。再生骨を自家骨の代替物として臨床応用するためには、再生骨が自家骨と同等の骨質を有することを確認することが必要であり、そのためには再生骨の質的解析が必須であると思われる。近年、骨質という概念が骨粗鬆症の治療分野だけでなく、骨の修復や再生において注目されており、骨強度は石灰化度、構造、骨代謝回転、骨基質に依存するといわれている。新生骨の骨質評価には、透過型電子顕微鏡による新生骨のコラーゲン線維の構造観察や、EPMA による元素マッピングを用いた石灰化度の評価などの手法がある。さらに骨代謝回転の評価として、破骨細胞と骨芽細胞によるカップリング動態を観察するだけでなく、骨細胞・骨細管系ネットワークについて解析する方法もある。近年の骨代謝研究においては、骨細胞が骨を制御する司令塔として注目を浴びており、骨基質ミネラル維持・メカニカルストレス感知・骨代謝調節に関与することが示唆されている。そのため、破骨細胞と骨芽細胞によるカップリングだけでなく、骨細胞・骨細管系ネットワーク構築についても評価を行うことが大切であると思われる。

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1件)

小島 拓、芳澤享子、齋藤 力、小林正治：熱可塑性吸収性プレートと -TCP による骨再生の評価、日口外誌 61、642-649 頁、2015. 査読あり

[学会発表](計1件)

小島 拓、芳澤享子、小野由起子、坂上直子、齋藤直朗、長谷川智香、網塚憲生、前田健康、小林正治：バイオマテリアルと間葉系幹細胞による顎骨再生を目指した三次元的骨再生法の開発 - その骨質と機能の評価 -. 第 30 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い、東京千代田区、2014 年 8 月 30 日 .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 拓 (KOJIMA, Taku)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：90515777

(2) 研究分担者

小林 正治 (KOBAYASHI, Tadaharu)
新潟大学・歯学部・教授
研究者番号：80195792

芳澤 享子 (YOSHIZAWA, Michiko)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：60303137

(3) 連携研究者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)
北海道大学・大学院歯学総合研究科・教授
研究者番号：30242431