

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861492

研究課題名(和文)脂肪由来間葉系幹細胞を用いた骨移植法の臨床応用

研究課題名(英文)Clinical application of the bone graft method using the mesenchyma system stem cell derived from fat

研究代表者

吉良 智恵(小泉)(KIRA, Tomoe)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80714146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト顎骨延長症例のconsolidation periodを短縮することを目的とした治験を組むにあたり小動物をモデルとした同一実験系を作成し脂肪由来間葉系幹細胞を用いた骨再生付加効果を検証した。細胞移植後1か月での評価では肉眼的にも統計的にも骨誘導群のほうが骨再生能を促進する可能性があることがわかった。また特殊染色ではADSCの抗原であるCD90,105 それぞれの局在を認めることができたため、移植細胞の一部は代謝・吸収されることなく移植部位で骨再生に関与している可能性が大きいことが示された。

研究成果の概要(英文)：we made the experiment system that assumed a small animal a model on making the clinical trial for the purpose of shortening consolidation period of the human jawbone extension case and inspected the bone reproduction addition effect using the fat origin mesenchyma system stem cell. We understood that bone instruction group might promote a bone reproduction by the evaluation in one month after cell transplant. In addition, it was shown that the transplant cell was more likely to participate in bone reproduction in a transplant part without metabolism being absorbed because it was able to accept local existence of CD90,105 each which was an antigen of ADSC by the special stain.

研究分野：形成外科

キーワード：再生医療 脂肪由来間葉系幹細胞 顎骨延長

1. 研究開始当初の背景

当科では主に小顎症により呼吸困難・呼吸器感染症・摂食障害などのさまざまな合併症により生命の維持に危機を及ぼす症候群(クルーゾン症候群、アペール症候群など)に対して新生時期から積極的に手術加療を行っている。具体的には相当部位に当たる頭蓋骨または顔面骨の骨延長術を施行し速やかに狭小部位の体積拡張を図るものであり、学童期に上がるまで複数回の手術を要することが患者に強いられている。おおよそ 30 mm前後の骨延長術を行った場合、延長部位に新生骨が再生されるまで3か月以上の保定期間が必要であり患者にとって苦痛である。近年までこの延長部位の骨新生を短縮するために腸骨からの自家骨移植、ヒトリコンピナントBMPなどの化合物質、濃厚血小板などが試作され発表されてきたが、幼児にとってはドナーの成長障害や外来薬剤への安全性などの懸念がありいずれも長期安全性は保障されていない。しかしながら本手術では新生骨ができるまでに、常に感染や骨折とのリスクを背負っており、今後新しい方法でのより短期間での患者への治療奉仕が確立されることが望まれている。

2. 研究の目的

すでにヒト下顎の発達障害にて治療が確立されている手術法、顎骨延長法の欠点である保定期間の短縮を目的とし、下顎骨骨延長モデルを小動物にて再現した上で欠損部位に脂肪由来間葉系幹細胞の骨誘導モデルおよびコントロールモデルを移植する。移植後の延長部位での反応および両者間の統計学的、病理学的比較を行う。

3. 研究の方法

前回の研究課程において、骨欠損部の骨再生治療を行うにあたり、動物実験で脂肪由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞双方において骨分化誘導の方法論を確立できた。どちらの幹細胞でも大きな有意差なく骨分化能を有することが示された。今後この研究をヒト応用へ発展させるべく引き続きこの過程を通じて理想的な移植用細胞足場の開発および長期間にわたる安定した機能を維持する骨を創造しうる幹細胞培養技術を確立したい。

(1) in vivo モデルの確率

N=12にて日本家兎メス9-12週の下顎の骨延長モデルを作成した。下顎骨犬歯~切歯にかけて下歯槽神経を温存して骨きりを行い、内固定型骨延長器を取り付けた。Initial gapは4mmを設け、この間にコラーゲンスポンジにウサギ脂肪由来間葉系幹細胞を載せて移植し、5日間の待機時間を設けたのちに1日1mmで計5mm延



長を行った。総延長距離は9mmとなった。

(2) 細胞の調整

日本家兎メス9-12週の下顎より約5g相当の皮下脂肪を摘出し、コラーゲナーゼ処理を行った。具体的には10%牛胎仔血清、L-グルタミン酸(20mM/ml)、および抗菌薬(ペニシリン1000U/ml、ストレプトマイシン0.1mg/ml)を添加したDMEM培地(シグマアルドリッチ)にて20日間初代培養を37℃、5%CO₂条件下にて行った。継代は、トリプシン-EDTAにより処理し、直径10cmディッシュに5000個/cm²となるよう播種した。これを継代3代目まで継続し、その24時間後、上記培地に10-8Mデキサメタゾン、10mMβ-グリセロリン酸、50μg/mlアスコルビン酸2-リン酸を加え、10日間培養し、骨芽細胞へ分化誘導した。培養10日後の骨芽細胞を再び、トリプシン-EDTAにより処理し、5×10⁶個/100μlに調整した細胞をコラーゲンスポンジ(スポンゼル®)へ積載して複合体を作製したのち、移植前にその後下顎延長部位へ移植した。一方で、骨誘導をかけないコントロール群とコラーゲンスポンジのみの細胞無積載群も用意した。

(3) 脂肪由来間葉系幹細胞の骨分化能の評価

(2)で同様に得られた継代3代目の骨分化された細胞と、コントロール群をそれぞれ対象として骨分化能の確認としてアルカリフォスファターゼ染色とアリザリンレッド染色を施行した。

(4) 細胞移植後の骨再生能評価

組織形態学的評価

骨誘導群、コントロール群、細胞無積載群の3群を移植したのちに1か月、2か月、3か月での保定時間を振って組織を切片として取り出し肉眼的観察を行ったが2か月、3か月の保定期間のグループではすべての個体で骨新生が完了しており、移植細胞における保定期間の短縮効果の評価には不向きと判断して1か月後での評価を選択した。

切片はHE切片と骨新生をみるためにピラヌエバーゴールドナー染色を施行した。

骨密度計測

移植骨の新生骨を評価するため、皮質骨密度、海綿骨密度、全骨密度において延長部分、μCT(LathetaL-200, Hitachi, Japan)を用いて計測を行った。

移植細胞の局在観察

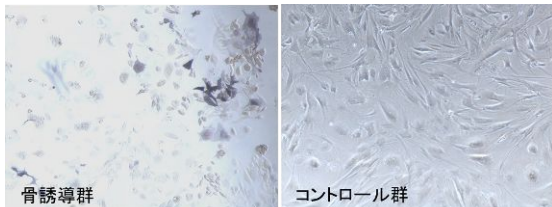
移植した間葉系幹細胞の局在を調べるためにin situ hybridization法を用いて間葉系幹細胞マーカーであるCD90, CD105をターゲットとした染色を行った。

4. 研究成果

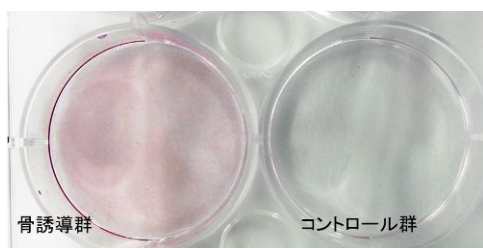
(1) in vitroでの骨誘導プロトコールの確率

3で示した誘導法に基づき、10日間の誘導期間ではほぼ確実に骨分化へ誘導できる実験系を確立した。評価法はALP染色とアリザリンレッド染色を選択した。いずれも骨誘導群は陽性反応を示し、コントロール群では骨分化能は示さなかった。

ALP染色



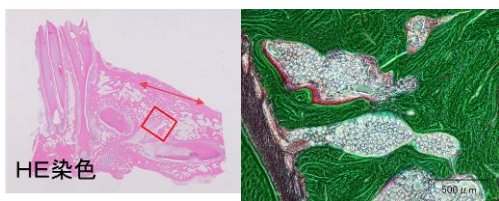
アリザリンレッド(AR)染色



(2) 組織形態学的評価

1か月後の局所観察では延長部位でのH E切片およびピラヌエバ・ゴールドナー染色では肉眼的には骨誘導群がコントロール群と比して石灰化骨が多く見受けられた。骨誘導群のほうがコントロール群に比べて石灰化骨の比率が多く見受けられた。3か月経過するとほぼ恒常状態に達するため、1か月の時点での組織評価では骨誘導群 > コントロール群で石灰化が進行していると推察される。

骨誘導群



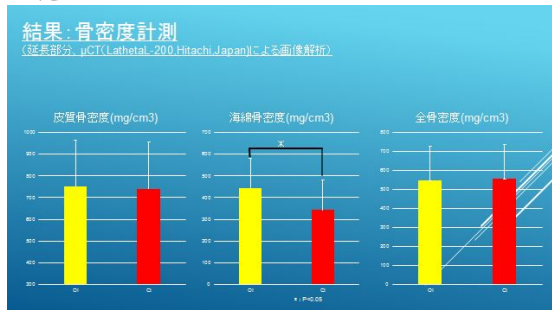
コントロール群



移植骨部位での骨密度計測：

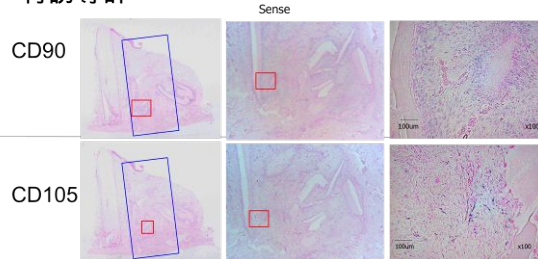
全骨密度、皮質骨密度においては有意差がなかったが海綿骨密度において骨誘導群のほうが密度が高かった。1か月での評価

ではやはり骨誘導群が骨形成能を促進していた

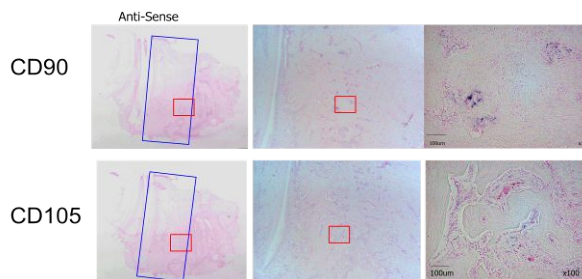


特異的骨染色による組織学的評価

骨誘導群



コントロール群



ヒト顎骨延長症例の consolidation period を短縮することを目的とした治験を組むにあたり小動物をモデルとした同一実験系を作成し脂肪由来間葉系幹細胞を用いた骨再生付加効果を検証した。細胞移植後1か月での評価では肉眼的にも統計的にも骨誘導群のほうが骨再生能を促進する可能性があることがわかった。また特殊染色では ADSC の抗原である CD90, 105 それぞれの局在を認めることができたため、移植細胞は代謝・吸収されることなく移植部位で骨再生に参与している可能性が大きいことが示された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

吉良 智恵, 笹原 資太郎, 秋田 新介, 窪田 吉孝, 三川 信之, 佐藤 兼重

ウサギ顎骨骨延長モデルにおける脂肪由来
間葉系幹細胞による骨再生付加効果の検討

第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会 シ
ンポジウム キッセイ文化ホール(長野県・
松本市) 2015 年 10 月 9 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉良 智恵 (KIRA, Tomoe)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80714146