

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861632

研究課題名(和文)血管の早期新生によって移植細胞の生着を促進する骨増成法の開発

研究課題名(英文)Effect of growth factors on endogenous cell recruitment and angiogenesis

研究代表者

Rosales Marcelo (Rosales, Marcelo)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20727127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により細胞移植が骨芽細胞の供給源として骨再生に及ぼす影響は限定的であり、ホスト由来の細胞を如何にして動員し、前駆細胞の骨芽細胞への分化を促進させることが効果的である可能性が示唆された。更に細胞誘導因子として知られるSDF-1の添加は骨再生を促進した。今後は動員された細胞特性の解析、血管新生のより詳細な解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, transplanted osteogenic cells did not differentiated into osteoblasts and matrix-embedded osteocytes. Interestingly, addition of SDF-1, a chemoattractant, significantly accelerated the bone formation in calvarial bony defect. These results indicate that acceleration of angiogenesis and mobilization of host-derived cells will be a promising approach for bone regeneration.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：血管新生 細胞動員

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療にはインプラント体を支持する為に十分な骨の存在が必要であるが、歯の喪失に伴う顎堤の吸収や、加齢による骨密度の低下により、適用が困難な症例も多いのが現状である。骨量が不足する症例に対しては、前処置として各種骨増成法が用いられている。骨増成法は組織工学的手法の原則に従い、増殖因子やスキャフォールドと共に細胞を用いる方法が有効であるとされており、申請者の所属する新潟大学医歯学総合病院では、事前に患者より採取した骨膜組織をセルプロセッシングセンターにて細胞シートとして増殖させ、自家移植材として使用する方法が試みられており、既に50を超える症例において、良好な臨床結果を報告している(Nagata et al. 2012)。しかしながら移植細胞については移植時のストレスから、生着する細胞数は限定的である事が示唆されている

そこで申請者らはラット頭蓋骨骨膜細胞を採取し、培養にて十分な細胞数を得た後、同一ラット皮下へ移植し、移植細胞の生着率について組織学的検索を行った。移植3日後にはアポトーシスによる細胞死を示すTUNEL陽性細胞が多数観察された。さらに移植5日後には移植体中に血管構造が観察されるようになり、移植細胞における酸素や栄養の供給が回復しつつあることを示唆していた。実際にPCNA陽性細胞数は経日的に増加しており、移植細胞の増殖が観察された。つまり移植体内に血管侵入に至るまでの極初期において多くの細胞が失われていることが明らかとなった。

我々の予備実験の結果は、移植体内部の血管新生が移植細胞の生存に重要であることを強く示唆している。血管新生を制御する分子のひとつであるHypoxia-inducible factor(HIF)は低酸素状態の細胞においてその恒常性を維持するために各種因子の発現を転写レベルで制御している。HIFの活性化は血管新生初期におけるFibroblast growth factor (FGF-2)の発現を促進し、その後のVascular endothelial growth factor (VEGF)、Platelet-derived growth factor(PDGF)、Epidermal growth factor (EGF)やCXCL12/SDF1等の発現を制御し、その後の血管形成に影響を及ぼしていると考えられている。

2. 研究の目的

これまでの骨増成法の多くは間葉系幹細

胞や骨芽細胞前駆細胞の骨芽細胞への分化を誘導することを目標とした試みが成されてきた。しかしながら移植初期における細胞の生存とその生着は、細胞移植による骨増成の律速段階であり、この段階で細胞を失うことはその後の骨増成効果に大きく影響を及ぼす。血管新生は細胞が生着するための環境を整備するために極めて重要であるばかりでなく、血流の確保は血行性に幹細胞の供給を可能とすることから、骨芽細胞とその前駆細胞の増加にも寄与することが強く推察される。

本研究の目的は血管新生を誘導する因子によって、細胞の生存/遊走と生着を促し、より効果的な細胞移植による骨増成を達成するための術式を確立することである

3. 研究の方法

移植細胞の生着を解析するために、マウス頭蓋冠由来細胞株、MC3T3-E1をコラーゲンゲル中に播種した。8週齢雄性免疫不全ラット(F344/NJcl-rnu)を用いた。深麻酔下にて頭頂部表皮を切開し、頭頂骨骨膜を露出させ、可及的に骨膜を取り除いた後に両側にトレファンバーを用いて直径5mmの欠損を形成した。した。細胞を播種したコラーゲンゲルを欠損に充填し、その後経時的に動物を屠殺し、 μ -CTによる解析を行い、 μ -CTのデータをもとに解析ソフト(TRI3D/BON、ラトック社)を用いて3次元構築、骨形態計測を行った。

実験には16週齢雄性ラット(Wistar)を用いた。深麻酔下にて頭頂部表皮を切開し、頭頂骨骨膜を露出させる。可及的に骨膜を取り除いた後に両側にトレファンバーを用いて直径5mmの欠損を形成する。アテロコラーゲン・スポンジ(MIGHTY, 高研社製)に増殖因子(SDF-1 0.1 μ g/ μ l-10 μ l, PDGF 0.1 μ g/ μ l-10 μ l)を添加し、1時間静置した後に欠損部に挿入し、表皮を縫合する(Fig. 1)。

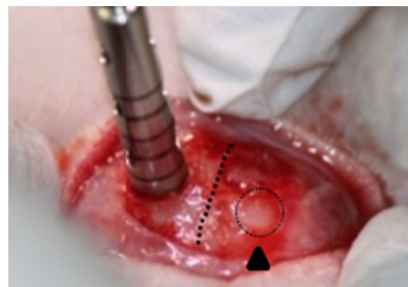


Fig. 1 ラット頭蓋骨への欠損形成

細胞移植時における血管新生能を有する増殖因子の添加がその後の骨増成に及ぼす

影響を解析するため、移植後 4,8,12 週後に動物を屠殺し、 μ -CT による解析を行い、 μ -CT のデータをもとに解析ソフト (TRI3D/BON、ラトック社)を用いて 3 次元構築、骨形態計測を行った。

移植初期における血管新生と細胞の供給を解析するために、移植後 1,3,7 日後にラットを屠殺し、パラフィン包埋組織標本の作製を行い、組織解析を行った。

4. 研究成果

頭蓋骨欠損部に移植した移植細胞は 7 日目まで経時的に増殖した。一方 2, 4 週間後には担体中の移植細胞数に変化はなかったものの、新生骨中の細胞の大部分は宿主由来のものであった (Fig. 2) (Kitami et al. 2016)。

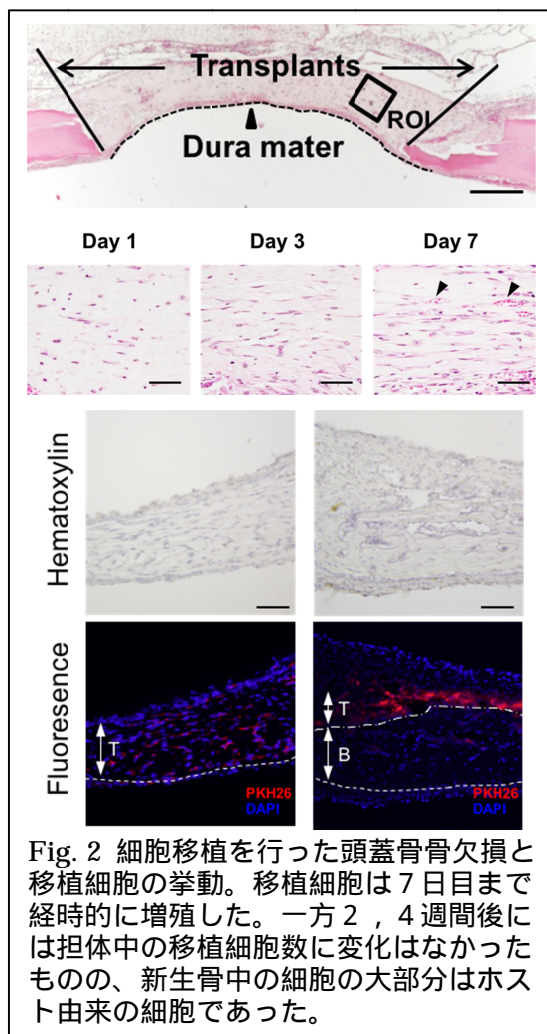


Fig. 2 細胞移植を行った頭蓋骨骨欠損と移植細胞の挙動。移植細胞は 7 日目まで経時的に増殖した。一方 2, 4 週間後には担体中の移植細胞数に変化はなかったものの、新生骨中の細胞の大部分は宿主由来の細胞であった。

PDGF または SDF-1 を含浸させた含浸させたアテロコラーゲンの移植後 4 週間で、コントロール、PDGF では骨の再生は観察されなかったが、SDF-1 では著名な骨の再生が認められた再生が認められた。一般に頭蓋骨骨欠損モデルにおける骨再生は辺縁から開始

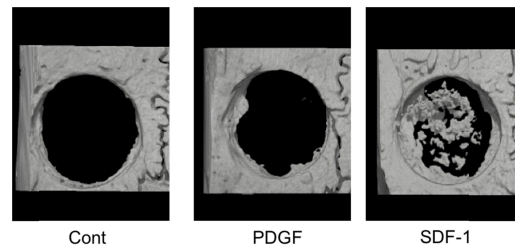


Fig. 3 PDGF, SDF-1 添加による骨再生性の評価。SDF-1 添加群では骨再生の促進が認められた

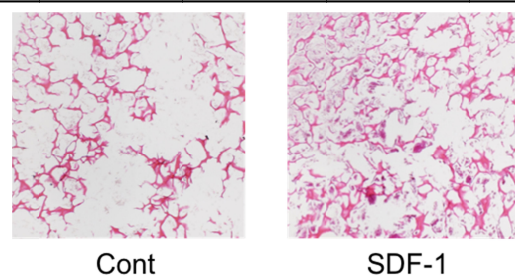


Fig. 4 SDF-1 の添加により、移植担体中の遊走細胞、血管構造の増加が認められた。

されることが多いが、SDF-1 では辺縁骨とは連続しない顆粒状の再生骨が観察された (Fig. 3)。

骨再生の促進が観察された SDF-1 は、組織標本上でも血管構造の増加、ならびに細胞数の増加が観察された (Fig. 4)。

以上の結果より、細胞移植が骨芽細胞の供給源として骨再生に及ぼす影響は限定的であり、宿主由来の細胞を如何にして動員し、前駆細胞の骨芽細胞への分化を促進させることが効果的である可能性が示唆された。

今後は動員された細胞特性の解析、血管新生のより詳細な解析が必要である。

参考文献

1. Kitami M, Kaku M, Rocabado JM, Ida T, Akiba N, Uoshima K. 2016. Prolonged survival of transplanted osteoblastic cells does not directly accelerate the healing of calvarial bone defects. *Journal of cellular physiology*.
2. Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M, Uematsu K, Ogawa S, Yamada K, Kawase T, Suzuki K, Ogose A et al. 2012. A

clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: Coordinated activation of bone formation and resorption. Bone. 50(5):1123-1129.

5 . 主な発表論文等

【雑誌論文】(計3件)

1. Kitami M, Kaku M, Rocabado JM, Ida T, Akiba N, Uoshima K. Prolonged Survival of Transplanted Osteoblastic Cells Does Not Directly Accelerate the Healing of Calvarial Bone Defects. J Cell Physiol. 2016 Jan 11 in press(査読有)
2. Kaku M, Rosales Rocabado JM, Kitami M, Ida T, Akiba Y, Yamauchi M, Uoshima K. Mechanical Loading Stimulates Expression of Collagen Cross-Linking Associated Enzymes in Periodontal Ligament. J Cell Physiol. 2015 Sep 7 in press(査読有)
3. Takano R, Nagasawa M, Kitami M, Rosales Rocabado JM, Kaku M, Stegaroiu R, Uoshima K. Correlation Between Stress Distributions and Biological Reactions in Bone Surrounding Implants That Support Cantilevers in Supraocclusal Contact in Rats. Implant Dent. 2016 Apr;25(2):204-13(査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

Rosales Marcelo
新潟大学 / 医歯学系 / 助教
研究者番号 : 20727127