

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20568

研究課題名(和文) 幹細胞由来培養上清を用いた大規模骨欠損における新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for critical size bone defect using conditioned media derived from stem cells

研究代表者

原 憲史 (HARA, Kenji)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20635560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット大腿骨のcritical sizeの骨欠損部に応用する材料として多孔性のアルギン酸Naを製作した。アルギン酸Naをコーティングしたディッシュ上でのラット間葉系細胞の培養で、骨形成関連マーカーの発現に有意差が認められず、欠損部への応用には改善が必要であった。また骨欠損部におけるチタン遮蔽膜を用いた骨新生の実験では、遮蔽膜に間葉系細胞由来の培養上清成分を付着させることで、術後8週において骨欠損部における新生骨と肥大軟骨細胞が認められ、さらに欠損部断端における骨架橋が認められた。しかし、その新生骨量は骨欠損を充填するほど十分でなく、今後は骨新生を促進する因子の添加などが必要になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Porous sodium alginate was produced as a material to be applied to the critical size bone defect part of rat femur. The cells were cultured on dishes coated with sodium alginate, but the cell collect rate was a problem and the results of the expression of osteogenesis related markers could not be obtained. Next, the rat femur bone defects were covered with titanium foils, there were problems of cell adhesion on the surface of sodium alginate and metabolic degeneration of the materials, the use of sodium alginate was stopped. Then, conditioned medium derived from rat mesenchymal cells were immobilized on the titanium foils. As a result of improving by adhering the components, bone bridge at the margin of the defect was observed at 8 weeks. However, its bone volume at the defect is not sufficient, and it is necessary to consider the addition of factors promoting bone formation to ensure sufficient bone formation in the future.

研究分野：再生医学

キーワード：外科系歯学 再生医学

1. 研究開始当初の背景

骨組織に備わっている自然治癒力が及ばない大規模骨欠損に対して、今までに汎用されている方法は自家骨移植と仮骨延長法である。自家骨移植は、おもに遮蔽膜を併用した自家海綿骨移植であるが、この方法は骨採取部に侵襲が必要であり、術後の骨吸収も問題である。仮骨延長法は、患者に大きな負担と長期間の入院が必要となり、一般的な治療方法とは言い難い。その他、生体材料の移植なども術後感染の危険性、強度不足、操作性の悪さなどから大規模骨欠損への応用は、困難である。次いで、組織工学的手法による骨再生が臨床応用された。しかしながら、この治療法は歯周病の骨欠損やインプラント治療に必要な骨量では良好な結果が得られたが、より広範囲な骨欠損では十分な結果が得られなかった。さらには細胞培養に必要な設備の整備と維持に莫大な経費がかかることから、組織工学的手法は一般には普及し難い方法であることも明らかになってきた。

そこで当研究室では、骨髄由来間葉系細胞培養上清に含まれる成長因子や基質に着目し、さまざまな組織再生を試み良好な結果を得てきた。培養上清に含まれる成長因子や基質は微量ながらも、それらが組織再生過程において複合的に作用することが示唆され、細胞自体が放出する因子であり、濃度は体内の生物学的活性に基づくものだと考えられた。また、当研究室の結果から、培養上清由来因子をチタン製インプラントに付着させ骨に埋入すると、インプラント表面のみではなく、インプラントから離れた部位にも骨形成が認められることが明らかにされた⁽¹⁾。

2. 研究の目的

口腔外科領域において、悪性腫瘍などの術後に大規模顎骨欠損が生じることがしばしばある。この大規模骨欠損は、著しい QOL の低下を引き起こす。従来の治療法は、自家骨や生体材料移植、生体分子の応用がされてきたが、確実な治療方法ではない。近年、培養細胞移植が臨床応用されてきたが、設備、費用、煩雑さから、一般に普及する治療法ではない。これらの問題点を解決するために、われわれの研究室では、培養細胞が分泌した成長因子を骨欠損に応用し、良好な結果を得てきた。しかしながら、小規模な骨欠損には効果が認められたが、大規模骨欠損での効果はいまだ検討されていない。そこで本研究では以下を研究目的とした。

(1) 培養細胞由来の培養上清に含まれる成長因子や細胞外基質を用いた、より低侵襲かつ効率的な大規模骨欠損の骨再生治療を目指した。

(2) 生体親和性のあるアルギン酸ナトリウムを骨欠損部に応用することで、内在性の骨髄由来間葉系細胞の接着・分化による成長因子や生理活性物質の分泌による骨新生の有

無についても研究内容に加えた。

3. 研究の方法

ラット骨髄由来間葉系細胞の培養上清を作製し、上清成分がチタン遮蔽膜(チタンホイール, Ti ホイール)に接着することを確認した。この方法には当研究室で報告された方法を用いて実施した⁽²⁾。またラット大腿骨欠損モデルを作製し、欠損部の骨新生を確認した。なお欠損部における内在性の骨髄由来細胞の付着による骨新生を期待し、生体親和性のあるアルギン酸ナトリウムを足場とする材料の研究をした。

4. 研究成果

(1) アルギン酸ナトリウムへのラット骨髄由来間葉系細胞の接着能と骨形成マーカーの発現について。

材料の研究として、アルギン酸ナトリウムにおける細胞接着、骨形成マーカー(Runx2, OC, OP, BSP)について実験を試みた。まずアルギン酸と塩化カルシウム溶液の混和による架橋させたアルギン酸ナトリウムを凍結乾燥させ、細胞の足場となるスキャホールドを作製した。材料学的な特徴として、播種した細胞の回収率が低いことや、37°Cの細胞培養液内で7日間浸漬されても代謝はほとんどされていなかった。また接着した細胞およびコントロール(通常のディッシュで細胞培養)骨形成マーカーの発現に有意な差が認められなかったことから、アルギン酸ナトリウムの骨欠損部への *in vivo* 実験には用いなかった。

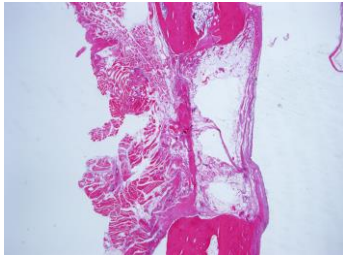
(2) 培養細胞由来の培養上清に含まれる成長因子や細胞外基質を用いた骨欠損部における骨新生について。

骨欠損部における周囲軟組織の侵入を防ぐことと、欠損部における内在性の細胞や成分を保持することを目的に Ti ホイールを欠損部の遮蔽膜として用いた。欠損部の骨新生を促進するために、ロンザ社のラット間葉系細胞を培養し、当研究室で報告された方法に従い培養上清を作製し、培養上清成分をホイールに付着させ、欠損部における骨新生への影響を比較した。欠損作製から 4, 8 週で組織学的に評価をした。欠損のみ(欠損のみ群)、欠損および Ti ホイールのみ(Ti ホイール群)、欠損および培養上清成分が付着した Ti ホイール群(Ti ホイール+CM 群)で比較した。欠損のみ群では、4, 8 週で骨欠損部に軟組織の侵入が認められ、炎症性細胞やリンパ球が認められた。また Ti ホイール群では、骨欠損部への軟組織の侵入はほとんど認められず、骨断端面から欠損方向への骨新生が認められた。新生骨には肥大軟骨細胞が認められた。Ti ホイール+CM 群でも骨断端から骨欠損部に向けた骨新生が認められ、とくに断端同士の新生骨は癒合し、bone bridge を形成した。Ti ホイール群、Ti ホイール+CM 群における肥大軟骨細胞の存

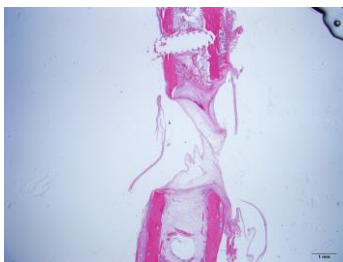
在は、軟骨性骨化を示唆するものだと考えられた(図1)。しかしながら8週目で欠損部の骨新生は認められたものの、欠損部を満たすほど十分な量ではなく、今後新生骨の量をいかに増加させるかが検討課題となる。

4週

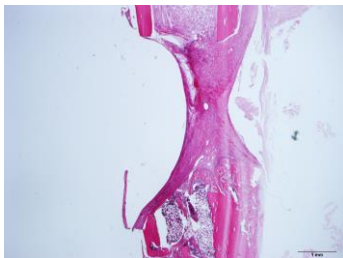
欠損のみ



Ti ホイル群

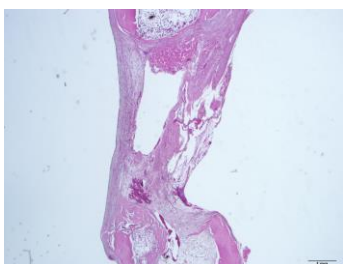


Ti ホイル+CM 群

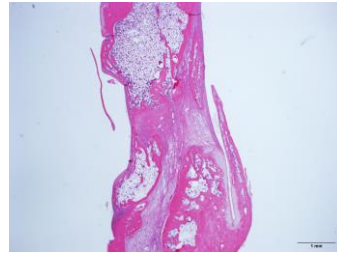


8週

欠損のみ



Ti ホイル群



Ti ホイル+CM 群

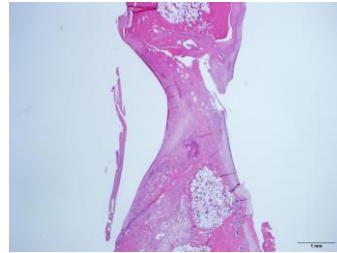


図1. ラット骨欠損部における新生骨 (H.E 染色, 100倍)

<引用文献>

1. Omori M, Tsuchiya S, Hara K, Kuroda K, Hibi H, Okido M, Ueda M. *Stem Cell Res Ther.* 19, 2015, doi: 10.1186/s13287-015-0114-1.
2. Tsuchiya S, Ohmori M, Hara K, Fujio M, Ikeno M, Hibi H, Ueda M., *Int J Oral Maxillofac Implants*, 30(5), 2015.

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)

Keisuke Sugimoto, Shuhei Tsuchiya, Kenji Hara, Yoshihiro Matsushita, Masahito Fujio, Hideharu Hibi. Osteoradionecrosis of the jaw caused by periapical periodontitis: A case report. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 査読あり, 29巻, pp. 328-333

[学会発表] (計1件)

当科の JCI 受審に向けての感染対策の取り組み, 平成 29 年度国立大学附属病院感染対策協議会, 岐阜県岐阜市, 2017
原 憲史

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 憲史 (HARA Kenji)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20635560

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし