

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（c）

研究期間：2007-2008

課題番号：19592305

研究課題名（和文） CD34 陽性細胞を併用する骨再生促進法の開発

研究課題名（英文） Development of osteogenesis promotion method with CD34+ cells

研究代表者

松井 義郎（MATSUI YOSHIRO）

横浜市立大学 医学部 准教授

研究者番号 10181687

研究成果の概要：骨再生促進法の開発のため、ヒト末梢血から採取した血管内皮前駆細胞である CD34 陽性細胞をヌードラットの頭蓋骨の骨欠損部にコラーゲンを担体として局所移植したところ、細胞移植群よりもコラーゲン単体を移植した群の方が有意に骨再生を認めた。これらには、局所移植という環境における CD34 陽性細胞の生存過程や成長因子が関係していると思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：CD34 陽性細胞 骨再生促進法

1. 研究開始当初の背景

骨再生は再生医療の中で比較的早期に臨床応用が始まった研究分野である。しかし、ヒト由来の細胞を用いた研究においては、栄養供給や培養増殖法に問題があり、一般化には至っていない。近年、人口万能細胞(iPS細胞)の出現により、再生医療に大きな変化が見られつつあるが、これも現状では腫瘍形成などの副

作用が問題とされ、臨床応用には時間がかかるかとされている。現在、口腔外科領域の骨再生にはコラーゲン、ハイドロキシアパタイトや β -TCPなどの人工物が多く利用されているが、われわれはヒト由来の細胞を用いた早期に臨床応用が可能な骨再生促進法の開発が必要であると考えた。

2. 研究の目的

Asahara らは骨折治癒不全ヌードラットに対し、経静脈的にヒト末梢血由来の CD34 陽性細胞を移植すると、骨原性細胞を移植せずとも、血管新生が促進されることにより骨性治癒が促進されることを報告した。本研究では、ヌードラットの頭蓋骨に形成した骨欠損に対し、ヒト末梢血から分離した CD34 陽性細胞を担体と共に局所移植し、その骨再生における有用性を検討することとした。

3. 研究の方法

ペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) にて麻酔後、ヌードラット (F344/nude rat) の頭蓋骨にトレフィンバーを用いて直径 5mm の円柱状の骨欠損を形成し、あらかじめ予備実験にて至適条件とした $1\mu\text{l}$ 当たり 3×10^3 個のヒト末梢血由来の CD34 陽性細胞をコラーゲンジェルを担体として移植した ([a] 細胞移植群)。比較するために、コラーゲンジェルのみを移植した [b] コラーゲン単体群と骨欠損のみの [c] コントロール群とを同時に作成した。移植 2 週間後に屠殺し、それぞれの骨新生について、X 線不透過像を画像解析ソフト-ImageJ-を用いて分析した【Figure1-3】。



Figure 1
矢状縫合を境に、左右に直径 5mm、深さ 1mm、容積約 $20\mu\text{l}$ の移植床を形成した。



Figure 2
移植 2 週目に屠殺し、頭蓋骨を採取した。



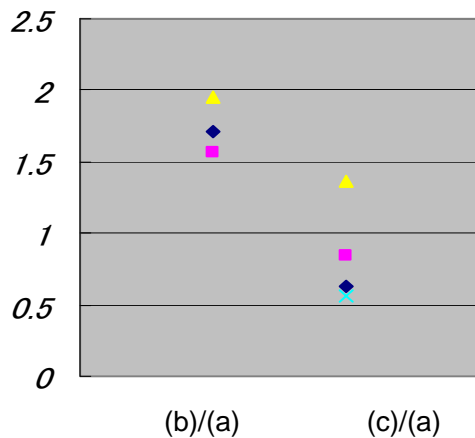
Figure 3
現像条件の誤差を補正するために、骨新生部位の透過度 (★) から、骨が写っていない部位の透過度 (◆) を引いた値を分析に用いた。

4. 研究成果

3群において、[b] コラーゲン単体群> [a] 細胞移植群> [c] コントロール群の順に骨の新生を認めた。これについて [a] を基準として [b] と [c] の骨新生を比率で計算すると次の表のようになった。

	(b)/(a)	(c)/(a)
N	3	4
Average	1.74	0.85
SD	0.197	0.367

骨形成の比率



Asahara らの報告によると骨折したラットに対して末梢血管を経路として循環内にヒト末梢血由来の CD34 陽性細胞を移植すると、2 週後には骨折部位において CD34 陽性細胞由来の血管新生と骨新生を認めたと報告されているが、今回の局所移植の場合は 2 週目の X 線分析において有意な骨新生は認められなかった。これらには、局所移植という環境における細胞の生存過程や成長因子が関係していると思われる。

また、今回の方法では仮に直径 3cm 深さ 1cm の骨欠損にこの方法を用いると、理論上約 200 以上の末梢血を必要とする。臨床応用を考える場合には、この非現実的な条件を解決するために培養や造血剤の併用が必要であると考えられた。

今後、in vitro によるコラーゲンを含めた担体内での CD34 陽性細胞の観察が必要であると考えられる。まずは細胞が生存可能な移植条件の研究が不可欠であると考えられた。

細胞の生存可能な移植条件が確立された後に in vivo による長期経過観察において移

植した CD34 陽性細胞由来の血管新生や骨新生を確認する免疫染色等を含めた分析を行い、CD34 陽性細胞の局所移植の有用性について検討したいと考える。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①松井義郎、ヒト末梢血CD34 陽性細胞を用いたヌードラット頭蓋骨における骨新生について ～CD34 陽性細胞の局所移植による骨新生の検討～、第 63 回日本口腔科学会総会、平成 21 年 4 月 16-17 日、静岡県浜松市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 義郎 (MATSUI YOSHIRO)
横浜市立大学 医学部 准教授
研究者番号 10181687

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

浅原 孝之 (ASAHARA TAKAYUKI)
東海大学 医学部 教授
研究者番号 20246200

廣田 誠 (HIROTA MAKOTO)
横浜市立大学 医学部 准教授
研究者番号 20347305

藤内 祝 (TOHNAI IWAI)
横浜市立大学 医学研究科 教授
研究者番号 50172127