

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592573

研究課題名（和文） 幹細胞間相互作用システムを応用した骨芽細胞ゲルおよび疑似骨髄モデルによる骨再生

研究課題名（英文） Bone regeneration with osteoblast gel and artificial bone marrow which can produce interaction between stem cells

研究代表者

山近 英樹（YAMACHIKA EIKI）

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：10294422

研究成果の概要（和文）：マウス皮質骨から間葉系幹細胞(MSCs)を単離し軟骨、骨、脂肪への分化能と長期培養を確認した。さらに皮質骨は骨髄より良好な MSCs の供給源であることおよびプラスチック容器での培養により効率的に造血幹細胞(HSCs)を除去できることを証明した。また塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を添加した培地で MSCs が長期培養できることと、この細胞の移植により生体内で骨再生が可能であることを証明した。

研究成果の概要（英文）：We developed methods to isolate, purify, and expand mesenchymal stem cells (MSCs) from mouse compact bone that may be used to regenerate bone in vivo. These cells were maintained in long-term culture and were capable of differentiating along multiple lineages, including chondrocyte, osteocyte, and adipocyte trajectories. We found that compact bone of mice was a better source of MSCs than the bone marrow, that growth in plastic flasks served to purify MSCs from hematopoietic cells, and that MSCs grown in basic fibroblast growth factor (bFGF)-conditioned medium were, based on multiple criteria, superior to those grown in leukemia inhibitory factor-conditioned medium. Moreover, we found that the MSCs isolated from compact bone and grown in bFGF-conditioned medium were capable of supporting bone formation in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生、成体幹細胞

1. 研究開始当初の背景  
われわれは、骨の再生に取り組み(1)サイト

カイン、(2)細胞、(3)微小環境の整備が不可

欠と考え申請時におけるまで以下のような研究をおこなってきた。(1)サイトカイン：サイトカインの活性増強を目的に固定化サイトカインによるシグナル発現の長期化が骨再生に有効であることを確認していた。固定化 rhBMP は標的細胞のレセプターに情報を持続的に伝達すること、高い誘導活性を得ることを確認していた。(2)細胞：遺伝子導入細胞を用いることなく、ラット骨髄幹細胞から骨芽細胞誘導と動物実験で異所性の骨形成に成功していた。しかし血管の移入がきわめて乏しく、骨芽細胞塊の単独移植では生理的な環境を獲得できず大型の骨再生が望めないことがあきらかにしていた。骨髄には、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、および造血幹細胞などの前駆細胞、幹細胞が含まれ、骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化誘導される。当時の知見では、骨芽細胞と造血幹細胞の相互作用が言われ骨再生にはこれら幹細胞間のインターアクションが必要と思われた。(3)微小環境（スキヤフォールド）：骨芽細胞分化誘導には骨髄腔内で幹細胞間のインターアクションが必要とされ、このため幹細胞間のインターアクションを再現する疑似骨髄的なスキヤフォールドの開発が必要と思われた。幹細胞間インターアクションを再現するにはゲル化して基底膜の立体モデルを作り細胞分化を促進する細胞外マトリックス由来生体ゲルと、骨髄を擬して作成した直径 300  $\mu\text{m}$  の貫通孔を持つハニカムタイプ  $\beta$ -TCP 疑似骨髄が骨組織を誘導しやすいことを確認していた。これらより問題解決の着想として、骨芽細胞ゲル（誘導・培養した骨芽細胞を、骨髄幹細胞から分取した造血幹細胞、血管内皮前駆細胞と生体ゲル内で共培養し作成）や、疑似骨髄モデル（上記骨芽細胞ゲルを新規開発ハニカム  $\beta$ -TCP 疑似骨髄スキヤホールドに充填し作成）による骨再生

が有効であろうとの着想にいたった。

## 2. 研究の目的

本研究課題の申請時における当初の研究目的として(1)歯周疾患など局所の微小な骨欠損に対する骨芽細胞ゲル注入による迅速で簡便な骨再生システムの開発、および(2)腫瘍、外傷などによる大きな骨欠損に対する新規開発ハニカム  $\beta$ -TCP疑似骨髄モデルを応用した大型骨再生システムの開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)GFP マウスより間葉系幹細胞の採取

#### ①実験動物

C57-GFP マウス(C57BL/6 TgN [ACT6EGFT])より細胞を採取した。

#### ②骨髄由来細胞採取

骨髄由来細胞は5週齢 C57-GFP 雄性マウス大腿骨より採取した。大腿骨は周囲軟組織を除去したのち両端の骨頭を除去し Alpha-MEM にて骨髄細胞を洗い流し細胞を回収した。回収した細胞は 25-cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコにて 20%FBS 添加 Alpha-MEM にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> にて 3日間培養した。

#### ③皮質骨由来細胞採取

骨髄由来細胞を採取した大腿骨を約 1 mm<sup>3</sup> の大きさに粉碎し、1 mg/ml の collagenase II にて 37°C 2時間処理し遊離した細胞を回収した。さらに粉碎骨は洗浄ののち、先に回収した細胞とあわせ 25-cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコにて 20%FBS 添加 Alpha-MEM にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> にて 3日間培養した。

### (2)間葉系幹細胞の増殖および培地の検証

上記で得られた骨髄由来細胞、皮質骨由来細胞は、プラスチック非接着性細胞を取り除いた後 90%コンフレントに到達したものをトリプシンにより剥離し継代した。増殖のためのメディウムは下記①～③を用いた。

①Complete medium

20%FBS 添加 Alpha-MEM:NIH3T3 培養上清=50:50 となるように調整したメEDIUM。

②LIF-conditioned medium

Complete medium+1,000 units/ml leukemia inhibitory factor(LIF)

③bFGF-condition medium

Complete medium+ 4 ng/ml basic FGF(bFGF)

それぞれの培地にて骨髄由来細胞、皮質骨由来細胞を培養し長期(継代45回以上)にわたる増殖能を検証した。

(3)間葉系幹細胞の単離

上記により培養、増殖した細胞から間葉系幹細胞を CD34+, c-Kit+, Sca1+細胞を FACS 解析によるソーティングにより分取した。

(4)間葉系幹細胞の脂肪、軟骨、骨への分化能の検証

得られた細胞を脂肪分化培地、軟骨分化培地、骨分化培地のそれぞれで培養し分化能を確認した。

(5)異所性骨再生能の検証

マウス1匹から得られる骨髄由来間葉系幹細胞および皮質骨由来間葉系幹細胞をそれぞれ 25-cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコ内で、Osteoblast inducer Regent (タカラバイオ社製)にて3日間骨系細胞へ誘導した。50 mg  $\beta$ -TCP を担体として誘導後の細胞と混合し骨再生ペレットを作成した。作成した骨再生ペレットは SCID マウス背部皮下へ移植したのち4週後に回収。HE染色および抗 GFP 抗体による免疫組織化学的染色のち光学顕微鏡下に観察した。

4. 研究成果

(1)プラスチックフラスコによる培養の結果間葉系幹細胞が培養細胞中にしめる割合

は骨髄由来細胞では約10%未満、一方皮質骨由来細胞では約60%で有意差を認めた。

(2)細胞の形状は骨髄由来細胞では、多数の小型で類円形の細胞と、少数の線維芽細胞様細胞を認めた。一方皮質骨由来細胞は線維芽細胞様細胞、小型類円形、小型立方形細胞が混在しており、部分的に線維芽細胞様細胞へ小型類円形、小型立方形細胞が重層する部位を認めた。

(3)培地に関する検証では、培地に4 ng/ml bFGF を添加することが間葉系幹細胞の培養に有効であることが認められた。

(4)4週間の培養によりマウス1匹より得られる大腿骨骨髄由来間葉系幹細胞は平均約1万個であったが一方大腿骨皮質骨由来間葉系幹細胞は平均約40万個で有意差をみとめた。

(5)骨再生ペレットによる異所性骨形成実験では担体へマウス1匹分の大腿骨骨髄由来間葉系幹細胞約1万個を移植した実験群では骨は形成されなかった。しかし担体へマウス1匹分の大腿骨皮質骨由来間葉系幹細胞約40万個を移植した実験系では小型の骨様構造の形成を認めた。また一部で骨髄腔様の構造をもつ骨が形成された。さらに形成された骨では骨芽細胞様細胞、骨細胞様細胞いずれもGFP陽性であった。しかしながら破骨細胞様細胞はGFP陰性であった。これらの研究成果から間葉系幹細胞の採取部位として従前から言われる骨髄よりは皮質骨の方が有望であること、および効果的な間葉系幹細胞の培養にはbFGFが有効であることが示された。このことはヒト再生医療でより少ない侵襲で間葉系幹細胞が採取できる可能性と、大量培養の成功へつながると思われる。今後より大型の骨の再生へとつなげていく。

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 10 件)

① Yamachika E, Tsujigiwa H, Matsubara M, Hirata Y, Kita K, Takabatake K, Mizukawa N, Kaneda Y, Nagatsuka H, Iida S Basic fibroblast growth factor supports expansion of mouse compact bone-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and regeneration of bone from MSC in vivo. *J Mol Histol*. 査読有 2012;43(2):223-33.

② Siar CH, Nagatsuka H, Han PP, Buery RR, Tsujigiwa H, Nakano K, Ng KH, Kawakami T. Differential expression of canonical and non-canonical Wnt ligands in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 査読有 2012;41(4):332-9

③ Siar CH, Kawakami T, Buery RR, Nakano K, Tomida M, Tsujigiwa H, Han PP, Nagatsuka H, Ng KH. Notch signaling and ghost cell fate in the calcifying cystic odontogenic tumor. *Eur J Med Res*. 査読有 2011 Nov 10;16(11):501-6.

④ Fujii M, Katase N, Lefeuvre M, Gunduz M, Buery RR, Tamamura R, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. Dickkopf (Dkk)-3 and  $\beta$ -catenin expressions increased in the transition from normal oral mucosal to oral squamous cell carcinoma. *J Mol Histol*. 査読有 2011 Dec;42(6):499-504.

⑤ Inoue M, Rodriguez AP, Nagai N, Nagatsuka H, LeGeros RZ, Tsujigiwa H, Inoue M, Kishimoto E, Takagi S. Effect of fluoride-substituted apatite on in vivo bone formation. *J Biomater Appl*. 査読有 2011 May;25(8):811-24.

⑥ Siar CH, Ha KO, Aung LO, Nakano K, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Ng KH, Kawakami T. Immunolocalization of notch signaling protein molecules in a maxillary chondrosarcoma and its recurrent tumor. *Eur J Med Res*. 査読有 2010 Oct 25;15(10):456-60.

⑦ Borkosky SS, Gunduz M, Beder L, Tsujigiwa H, Tamamura R, Gunduz E, Katase N, Rodriguez AP, Sasaki A, Nagai N, Nagatsuka H. Allelic loss of the ING gene family loci is a frequent event in ameloblastoma. *Oncol Res*. 査読有

2010;18(10):509-18.

⑧ Sonoda R, Naomoto Y, Shirakawa Y, Fujiwara Y, Yamatsuji T, Noma K, Tanabe S, Takaoka M, Gunduz M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Ohara N, Yoshino T, Takubo K, Vieth M, Tanaka N. Preferential up-regulation of heparanase and cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of Barrett's oesophagus and intestinal-type gastric carcinoma. *Histopathology*. 査読有 2010 Jul;57(1):90-100.

⑨ Nishizaki K, Yoshinobu J, Tsujigiwa H, Orita Y, Yamada M. The early administration of granulocyte colony-stimulating factor increases the engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium damaged by methimazole. *Rhinology*. 査読有 2010 Jun;48(2):228-32.

⑩ Matsubara M, Yamachika E, Tsujigiwa H, Mizukawa N, Ueno T, Murakami J, Ishida N, Kaneda Y, Shirasu N, Takagi S. Suppressive effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid administration on bone resorption. *Osteoporos Int*. 査読有 2010 Aug; 21(8):1437-47

[学会発表] (計 11 件)

① 松原正和、山近英樹、喜多憲一郎、高嶋清文、藤田佑貴、高木慎、石田展久、花野響子、飯田征二、1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) を用いた骨粗鬆症に対する新規治療法の検討、第 56 回日本口腔外科学会総会、2011 年 10 月 21 日、大阪

② Eiki Yamachika, Matsubara Masakazu, Ken-ichiro Kita, Kiyofumi Takabatake, Yuki Fujita, Nobuyoshi Mizukawa, Tatsushi Matsumura, Hidetsugu Tsujigiwa, Hitoshi Nagatsuka, Seiji Iida, Anti Osteoporotic Effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid, American Society for Bone and Mineral Research 2011 annual meeting, 2011/09/17, San Diego, Ca, USA

③ Kita K, Yamachika E, Matsubara M, Fujita Y, Iida S, Asaumi J, Murakami J, Arai Y, Honda K, Ejima K, An alternative treatment for osteoporosis with DHNA-microCT analysis, 18th International Congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology, 2011/05/29, Hiroshima

④ 高嶋清文、松原正和、山近英樹、喜多憲一

郎、藤田佑貴、浅海淳一、辻極秀次、長塚仁、飯田征二、OVX マウスによる骨粗鬆症への1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)を用いた治療効果の検討、第 65 回日本口腔科学会学術集会、2011 年 04 月 21 日、東京

⑤山近英樹、松原正和、喜多憲一郎、武田斉子、池谷陽子、水川展吉、飯田征二、マウス骨由来間葉系幹細胞による骨再生の基礎的研究、第 55 回日本口腔外科学会総会、2010 年 10 月 17 日、東京

⑥喜多憲一郎、松原正和、山近英樹、香川智正、高木慎、石田展久、平田泰久、藤田佑貴、高島清文、飯田征二、OVX マウスにおける1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)の骨吸収抑制効果について、第 55 回日本口腔外科学会総会、2010 年 10 月 17 日、東京

⑦松原正和、喜多憲一郎、山近英樹、香川智正、平田泰久、藤田佑貴、飯田征二、1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)の骨吸収抑制メカニズムについての検討、第 55 回日本口腔外科学会総会、2010 年 10 月 17 日、東京

⑧山近英樹、松原正和、喜多憲一郎、武田斉子、池谷陽子、藤田佑貴、松村達志、水川展吉、辻極秀次、長塚仁、飯田征二、マウス骨髄由来間葉系細胞の培養における Lif および b-FGF の効果、第 64 回日本口腔科学会学術集会 2010 年 6 月 25 日、札幌

⑨松原正和、山近英樹、喜多憲一郎、藤田佑貴、平田泰久、松村達志、辻極秀次、長塚仁、飯田征二、1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)による骨吸収抑制効果についての検討 第 64 回日本口腔科学会学術集会 2010 年 6 月 25 日、札幌

⑩山近英樹、松原正和、喜多憲一郎、金田祥弘、武田斉子、水川展吉、マウス骨からの間葉系幹細胞の単離、第 54 回日本口腔外科学会総会、2009 年 10 月 09 日、札幌

⑪喜多憲一郎、山近英樹、松原正和、高木慎、石田展久、平田泰久、培養骨髄細胞の 3 次元構造体による骨形成能の検討、第 63 回日本口腔科学会総会、2009 年 04 月 16 日、浜松

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山近 英樹 (YAMACHIKA EIKI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：10294422

### (2) 研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA HIDETSUGU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：70335628

### (3) 連携研究者