

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 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592579

研究課題名（和文）CD34 陽性細胞を用いる骨再生促進法に対する G-CSF の併用効果

研究課題名（英文）Effect of Concomitant use of G-CSF in bone regeneration by CD34 positive cells.

研究代表者

太田 信介（OHTA SHINSUKE）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30336581

研究成果の概要（和文）：顎骨再建においてはこれまで、人工骨、自家骨などを用いてきたが、手術侵襲、異物反応、骨形成スペースの確保が問題だった。今回の研究では当初、少量の血液由来幹細胞に組織分化因子を加える事で、低侵襲の骨再生を模索したが、血液由来幹細胞は少量で、目的を達する十分な量が採取できなかった。そこで、人工骨に骨髄由来間質細胞と骨膜を合わせて用いる事で骨形成をより効率よく低侵襲に達成する事が出来た。

研究成果の概要（英文）：So far in the field of bone regeneration, we have used artificial bone and autologous bone. Therefore, there are some difficulties, such as invasiveness of the surgery, foreign-body reaction and space reservation. In this study, at the beginning, although we had tried to use CD34 positive stem cells derived from peripheral blood to inhibit invasiveness of method, the cells which we could obtained from peripheral blood were limited to accomplish this method in clinic. Consequently, we have tried to use the combination of artificial bone, stem cells obtained from bone marrow and periosteum. So we carried out effective new method of bone regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：骨再生、CD34、G-CSF、骨髄間質細胞、自家培養骨膜

1. 研究開始当初の背景

(1) Asaharaらは、末梢血液中に血管内皮前

駆細胞が存在することを世界で初めて報告

(Science 275:964-7, 1997)した。ついで彼ら

は、ラット骨折モデルに対し末梢血管から血管内皮前駆細胞へ分化するCD34陽性細胞を導入すると、骨折部位に集積して新生血管内皮細胞だけでなく骨細胞にも分化して骨性治癒を促進させる事を明らかにしていた (Matsumoto et al, Am J Pathol, 2006).

(2) この多分化能をもつ CD34 陽性細胞を骨再生へ応用することを考え、研究に着手した. 申請者らは長年骨造成に取り組み、臨床では自家骨移植に関して自家骨とチタンメッシュを併用した顎裂部骨造成法 (Matsui et al, J Oral Maxillofac Surg 64;1540-1545, 2006)、同部に埋入したインプラントの長期経過 (Matsui et al, Cleft Palate Cranio J, 2007)、顎裂部自家骨移植部の変化 (Ozawa et al, Cleft Palate Cranio J, 2007)などを報告してきた. また基礎研究では、骨原性細胞をサイトカインとともに生体外で培養・増殖・分化させた後に移植すると、効率よく骨が形成できることをいち早く報告した (Tamura et al, Bone, 2001).

(3) 現在ではヒト末梢血から得たCD34陽性細胞をヌードラットの頭蓋冠に形成した骨欠損部へ移植すると、細胞培養を行わなくても効率よく骨再生が行なえることを明らかにした. しかしこの方法を、血流の乏しい、ヒトの大きな骨欠損へ応用するためには、骨欠損部に作用させるCD34 陽性細胞の数をいかに増加させるかが鍵となる.

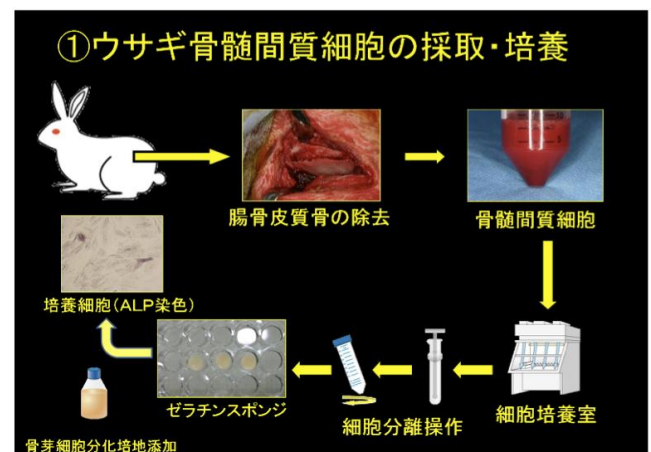
2. 研究の目的

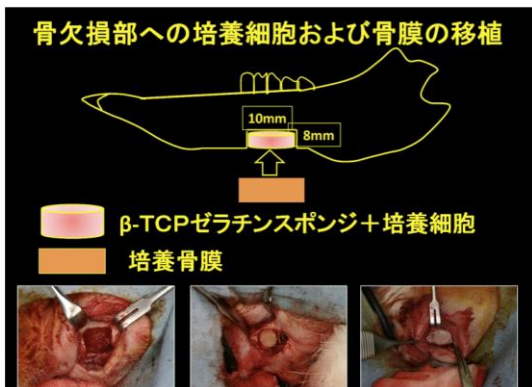
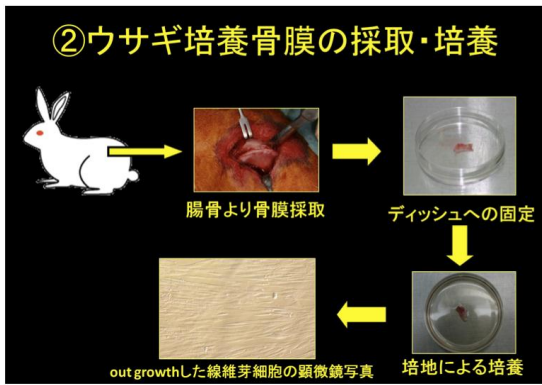
骨再生は再生医療の中で、比較的早期に臨床応用が始まったが、幹細胞の生体外培養増殖が必要である、骨再生部位への血管新生の限界から栄養供給が十分に行なわれず移植細胞が壊死するといった問題があるため、一般化していないのが現状である. われわれの行な

ってきた CD34 陽性細胞を併用する新しい骨再生促進法に G-CSFを併用することにより、現行の骨再生法がもつこれらの問題点を克服できる. と考え、研究を進めたが、大きな骨欠損腔に対して、CD34陽性細胞を用いた骨造成を行うには末梢血から採取できる細胞量にG-CSFを加えても限りがある事が判ったため、人工骨をあらかじめ用いる方法を平行して模索した.

3. 研究の方法

ウサギ腸骨より骨髓細胞および骨膜を採取した. 初代骨髓間葉系幹細胞を担体である新規ゼラチンスポンジに播種し、一定条件下で骨芽細胞へ分化誘導した. コンフルエントに達した段階で、ウサギの顎骨欠損部へ担体を移植した. 同時に自家培養骨膜で担体上を被覆した. 観察期間は、自家培養細胞移植から1~12週間とした. 骨形成評価は、免疫組織学的所見、遺伝子解析、三次元X線Micro focus CTによる画像解析により行った. なお反対側にも同様に顎骨欠損を作製し、欠損のみ・担体移植のみ・骨膜移植のみを作成し、それぞれコントロール群とした.





4. 研究成果

(1) 本法は、これまでの骨再生法にくらべて侵襲性が少なく、使用する細胞はすべて自家細胞で担体も異物反応が少ない骨組織再生手法としての有用性が示唆された。今回われわれは、細胞接着性に優れるβ-TCP

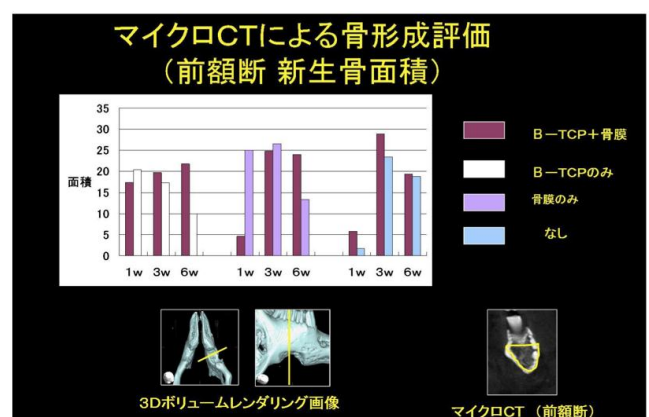
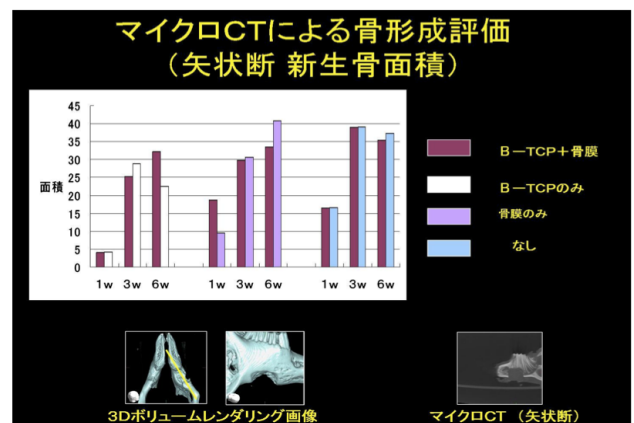
(2) 強化型ゼラチンスポンジを素材とする骨髄間質細胞培養系担体と培養骨膜を組み合わせる骨再生法の有用性について検討する一環として、両者を併用する実験群、両者をそれぞれ単独で使用した群、骨欠損のみを形成したコントロール群を比較検討し、以下の結果を得た。

①実験群では、コントロール群に比べて欠損形態に類似した骨形成が生じていた。

②マイクロCTによる評価において、実験群はコントロール群に比べて、埋入1週間後より大きな骨面積、高さ、幅を示した。

③組織学的検討において、実験群の骨欠損部には正常な骨が新生されていた。4免疫の結果から、本法により骨再生(osteogenesis)において重要とされる血管形成(vasculogenesis)の有意な促進が、CD31(血管内皮細胞接着因子)・オステオカルシンの発現様式から示唆された。

以上より、骨髄間質細胞培養系担体と培養骨膜を組み合わせた移植により、良好な骨再生が起これることが示唆された。



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)

[学会発表] (計1件)

①第 56 回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 2011 年 10 月 22 日 大阪国際会議場
和田圭之進、太田信介、松井義郎他 培養骨髄間葉系幹細胞付加担体と培養骨膜を組み合わせた骨再生法に関する基礎的研究

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 信介 (OHTA SHINSUKE)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：30336581

(2) 研究分担者

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

光藤 健司 (MITSUDO KENJI)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：70303641

松井 義郎 (MATSUI YOSHIRO)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10181687

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

足立 誠 (ADACHI MAKOTO)
横浜市立大学・附属病院・指導診療医
研究者番号：10468192

(H21→H22：研究分担者)