

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791750

研究課題名(和文) 臍帯血由来と骨髄由来の間葉系幹細胞の細胞動態の比較検討

研究課題名(英文) Comparison of cell properties with bone marrow derived mesenchymal stromal cells and umbilical cord derived mesenchymal stromal cells

研究代表者

馬場 香子 (BABA KYOKO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：90327411

研究成果の概要(和文)：

臍帯由来間葉系幹細胞の骨形成能を確認した。臍帯血由来と骨髄由来の間葉系幹細胞の細胞動態には相違があり、骨髄由来間葉系細胞が臍帯由来間葉系細胞より骨形成能に優れることを確認した。

研究成果の概要(英文)：

We verified the osteogenic potential of umbilical cord derived mesenchymal stromal cells (UC-MSCs). There was a difference in osteogenic potential of bone marrow derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) and that of UC-MSCs. I confirmed that a BM-MSCs was superior to UC-MSCs in osteogenic potential.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：臍帯由来間葉系細胞・骨組織形成・自家組織・再生医療・口唇口蓋裂

1.研究開始当初の背景

唇顎裂や唇顎口蓋裂の患者にとって、顎裂部骨移植は咬合の獲得のために重要な治療となっている。顎裂部に良好な骨形成を得て歯牙の支持性を得るだけでなく歯牙の萌出や移動・誘導・顎裂の保定を可能にするこ

とがその目的である。手術時期は永久歯が萌出する混合歯列期から成人の永久歯列期までの広範囲な年齢層に及ぶ。手術回数も一度で矯正歯科治療を可能にする良好な骨形成が得られるとは限らず、海綿骨採取量が不足する症例や、移植骨が吸収される症例などでは手術が複数回に及ぶ場合もある。

現在、donor は自家腸骨海綿骨が第一選択と認識されている。採取海綿骨量や手術回数の増加に伴い、周術期の侵襲だけではなく長期的に腸骨に及ぼす未知数の影響も増大する。即ち、良好な咬合を獲得するために腸骨の侵襲が大きくならざるを得ない症例が存在する。Millard ら【Plastic and Reconstructive Surgry,1999】は、骨形成目的に口唇形成時に歯肉骨膜形成術を行うことで従来の顎裂部への骨移植の必要が減ると報告している。当教室でも歯肉骨膜形成術を行っているが、混合歯列期に顎裂部の骨組織絶対量不足により矯正歯科治療に支障が生じる症例が存在し、良好な咬合を獲得するために通常の顎裂部骨移植を施行している。

骨形成不足の原因の一つとして、歯肉骨膜形成など骨形成の環境を整備しても“骨組織に分化する細胞”が絶対的に不足している可能性が考えられる。当教室では骨を形成する細胞の補填を検討してきた。現在まで、骨組織から骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の分離・増殖・凍結保存法を確立【Shimakura Y, ら Journal of Craniofacial Surgery 14(1):108-116, 2003】し得た。また再生医療工学を用い凍結保存された骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)によるハイブリッド型人工骨の開発【Matsuo A, ら Journal of Craniofacial Surgery 2008】を行ってきた。

一方、臍帯血中に造血幹細胞以外の間葉系幹細胞が見出された【Lee O.K. et al : Blood 103:1669-167,2004】。近年、臍帯血中に造血幹細胞以外の間葉系幹細胞が見出された【Lee O.K. et al : Blood 103:1669-167,2004】。近年、胎児エコー検査の発達により出生前診断で口唇裂・口蓋裂症例の当科への胎児期患児紹介は増加している。出生時の臍帯(UC)・臍帯血(UCB)を治療に用いることができれば、donor 採取の侵襲がなく、自家組織であるため倫理面・安全面で優れており、唇顎裂や唇顎口蓋裂の患者にとって再生医療の大きな恩恵となり得る。我々は、新生児の骨組織 donor として臍帯血由来間葉系細胞(UC - MSCs)の可能性に着眼した。

2. 研究の目的

臍帯由来と骨髄由来の間葉系細胞の細胞動態の相違を検討し、より安全で効率のよい骨再生医療の可能性を検討する。

(1)臍帯血由来間葉系幹細胞の分離・培養法の確立し、多分化能を確認する。

(2)臍帯血由来の成長因子・足場の採取・保存法の確立と活性の確認する。

(3)臍帯血由来と骨髄由来の間葉系幹細胞の培養環境・増殖力・分化の相違の比較検討する。

3. 研究の方法

当研究は北里大学倫理委員会において「B倫理 07-13：ヒト臍帯血由来有核幹細胞による骨組織再生」の課題で承認(平成 19 年 5 月 25 日)のもと施行した。当院産婦人科で分娩される妊婦よりインフォームドコンセントを得て、通常分娩後破棄される臍帯血を使用した。産婦人科医により確実に新生児の安全が確保された状態で臍帯血は採取、提供された臍帯血は個人が特定できないよう番号化して取り扱った。

(1)臍帯由来間葉系幹細胞の分離・増殖の確立と多分化能の検討

臍帯は、切断後 PBS で洗浄し血液を除去した。周膜と臍帯静脈をのぞき、臍帯間質、いわゆる WhartonJelly のみを約 5mm 大に裁断した。これを、10%臍帯血由来血清添加 DMEM 培地で培養し臍帯由来間葉系細胞を得た。

Sarugaser R et. al【Stem Cells:2005】と Matsuo A et al.【J. Craniofac. Surg. (2008)】を参考に、得られた細胞を 10%臍帯血由来血清添加 DMEM 培地で培養した。

これらの初代細胞を、一方は培地を NH OsteoDiff Medium に変え骨芽細胞へ、他方は NH AdipoDiff Medium(Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Germany)に変え脂肪細胞へ分化誘導し、それぞれアリザリン R 染色及びオイルレッド染色を行いその多分化能を確認した。

(2)臍帯血由来の成長因子・足場の採取・保存法の確立と活性の検討

臍帯血は、胎盤娩出後に臍帯静脈を穿刺し採取した。抗凝固処理を行った臍帯血を 2400rpm10 分、3600rpm10 分(20℃)で遠心分離し多血小板血漿(UCB-PRP)と血漿を得た。この臍帯血由来血漿より血清を得て細胞の培養に使用した。フィブリンは足場として利用し、その構造を走査電子顕微鏡で観察した。UCB-PRP の活性は成長因子(PDGF,TGF- β , VEGF,)を評価した。

(3) 臍帯由来と骨髄由来の間葉系細胞との骨形成の比較

細胞が subconfluent になったら hydroxyapatite (HA) へ細胞を播種し、さらに 1 週間培養後、BMP を 300ng/ml 添加して培地を NH OsteoDiff Medium に変え分化誘導した。4 週間分化培地で培養した検体をヌードマウスの背部皮下へ PRP とともに移植した。in vitro・in vivo での骨芽細胞マーカー runt-related gene 2 (Runx2), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), osteocalcin (OC) の発現を、未分化細胞と分化後 5 週目の細胞・移植後 6 週目の組織の細胞で比較して評価した。

4. 研究成果

(1) 臍帯由来間葉系幹細胞の分離・増殖と多分化能。

WhartonJelly から outgrowth cell が得られた。

骨芽細胞へ分化誘導した検体は細胞外がびまん性にアリザリン R に染色され Ca の存在が確認された。また脂肪細胞へ分化誘導した細胞は細胞内にオイルレッドに染まる脂肪滴を認めた。以上から臍帯間質由来細胞は In vitro で骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を有した。

(2) 臍帯血由来の成長因子・足場の採取・保存法とその活性。

17 検体で UCB 採取量を計測し、その量は 27~74mL、平均 50mL であった。UCB から得られた血清は 11~44mL、平均 22mL であった。当研究で初代培養からマウスへの移植までに 1×10^5 個の細胞を培養するのに要した血清量は実際には 3.6~4.2mL であり、培養には十分な血清がえられた。また約 40mL の UCB あたり約 4-6 cm³ の fibrin net が形成された。使用直前に解凍した fibrin net は走査電子顕微鏡で観察すると線維が複雑に絡み合う網状構造をしており、3次元構造をもつ足場としての可能性が示唆された。

また UCB-PRP の活性は成長因子 (PDGF, TGF- β , VEGF) の活性はすべての検体で認められた。凍結後のこれらの活性は凍結前より高値を示した。

(3) 臍帯由来間葉系細胞の骨形成能と骨髄由来間葉系細胞との比較。

HA の気孔内に幼若な骨組織形成が散見された。免疫染色では、HE 染色で骨組織が確認された部分がヒト OC 抗体とヒトミトコンドリア抗体ともに陽性であった。これらより同部の細胞は OC を産生しヒト由来であることが確認された。

また、未分化 UC-MSCs と比較して in vivo の検体は Runx-2, ALP で高値を示し、Unpaired Student 's t-test (p<0.05) による統計処理で有意差を認めた。

当研究で UC-MSCs を臍帯血由来自己血清で培養し HA を足場に骨形成が確認された。しかしながら、骨髄由来間葉系細胞の比較し得られた組織像はいずれも幼若であり、分化誘導をかけても組織学的に骨様細胞が得られない検体も認められた。

再生医療材料として UC-MSCs の可能性が示唆されたが、一方で、臍帯はおよそ 10 ヶ月で脱落する組織である為、細胞の life span が他の体組織より短く、耐性も異なる可能性があると思われた。臨床応用には細胞癌化など安全性をより注意深く検討する必要があると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Kazuya Aoyagi, Akira Takeda, Eiju Uchinuma Potential of regenerative medicine of bone tissue using the autologous umbilical cord and umbilical cord blood 20th Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery; p359-363 2010
- ② Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Kyoko Baba, Eiju Uchinuma Proliferative and differential potentials of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured with autologous serum 20th Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surger; p377-382 2010

[学会発表] (計 6 件)

- ① 馬場香子、武田啓、山崎安晴、青柳和也、曾根由美子、内沼栄樹
臍帯由来間葉系幹細胞と臍帯血を用いた骨組織の再生：日本形成外科学会基礎学術集会 神奈川 2010年9月17日

- ② Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Kazuya Aoyagi, Akira Takeda, Eiju Uchinuma
Potential of regenerative medicine of bone tissue using the autologous umbilical cord and umbilical cord blood; 20th Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery Belgium 14th Sept. 2010
- ③ Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Kyoko Baba, Eiju Uchinuma
proliferative and differential potentials of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured with autologous serum; 20th Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery Belgium 14th Sept. 2010
- ④ Kyoko Baba, Akira Takeda, Yasuharu Yamazaki, Kazuya Aoyagi, Eiju Uchinuma
Potential of UCB-derived Plasma as the source of regenerative medicine ; 12th International Congress of Oriental Society of Aesthetic Plastic Surgery Tokyo 2th. Nov. 2010
- ⑤ 馬場香子、山崎安晴、武田啓、曾根由美子、内沼栄樹
臍帯血由来 fibrin の自家組織 scaffold としての可能性 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2010 年 3 月 1 日
- ⑥ 山崎安晴、武田啓、馬場香子、曾根由美子、内沼栄樹
自己血清培養下におけるヒト骨髄由来間葉系細胞の増殖能と分化能 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2010 年 3 月 1 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 香子 (BABA KYOKO)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：90327411