

## 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 22 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21792051  
 研究課題名(和文) 骨移植の成否に関与する要因から考察した造血幹細胞による骨組織再生療法に関する研究  
 研究課題名(英文) The study of regenerating bone tissue by hematopoietic stem cell from the factor of the alveolar bone grafting  
 研究代表者  
 松野 美乃 (MATSUNO MINO)  
 北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究員  
 研究者番号：80374544

研究成果の概要(和文)：口唇裂・口蓋裂における良好な矯正歯科治療の達成には、顎裂部に対して行われる骨移植術は必要不可欠かつ重要な治療である。本研究は、骨移植術に代わる治療法として、幹細胞を用いた再生医療の可能性について検討を行った。マウスを用いた実験では、間葉系幹細胞のみを移植した場合と比較し、間葉系幹細胞と造血系幹細胞を混和して移植した場合で多くの新生骨が誘導された。造血系幹細胞を併用することで成功率の高い骨組織再生が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The alveolar bone grafting is one of the most necessary and important treatments for the achievement of progress satisfactorily orthodontic treatment of the cleft lip and palate patients. The purpose of this study is to examine that the possibility of the regeneration of the alveolar bone tissue by using bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSCs) and hematopoietic stem cell (HSCs). As the result, it is considered that the using of both BMMSCs and HSCs is effective method for the 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	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：骨移植

## 1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂は頭蓋顎顔面領域において最も発生率の高い先天異常の一つである。特

に他国に比べて日本人における発生率は高く、出生児約500人に1人の割合で発症している。

口唇裂・口蓋裂患者にとって、顎裂部骨移植は単に裂隙の形態的閉鎖にとどまらず、矯正治療後戻りの防止、後続永久歯の萌出誘導、歯槽堤の形成、顔面形態の改善など多くの利点を有しており、唇顎裂や唇顎口蓋裂患者のより良好な矯正歯科治療の結果の達成には顎裂部骨移植は必要不可欠かつ重要な治療である。現在、顎裂部骨移植の移植骨は腸骨等から採取する自家骨移植が大部分であるが、自家骨は採取部位が限定される上、骨の形態や採取量に制限がある。また腸骨からの骨移植は全身麻酔での処置が不可欠であり、骨移植骨の生着率は100%ではなく、症例によっては高度の骨吸収を招き再移植が必要になる場合があるなど、種々の問題がある。

骨組織再生療法について、歯科領域ではこれまでインプラント治療や歯周疾患治療に応用するため研究が進められてきた。しかし、唇顎裂や唇顎口蓋裂患者の顎裂のように、大きな骨欠損を伴うだけではなく足場となる骨が全くないことや同部における骨膜の欠損により粘膜側からの骨再生は極めて困難とされている。

## 2. 研究の目的

近年、iPS細胞に代表されるような幹細胞を用いた再生医療の臨床応用が現実になりつつある。

そこで、本研究では、顎裂を有する口蓋裂患者に対して幹細胞を用いた再生療法の可能性を模索するため、間葉系幹細胞と造血系幹細胞の併用による骨組織再生療法について検討を行ない、顎裂部の十分な骨形成を目的としている。

## 3. 研究の方法

(1)骨髄由来間葉系細胞(MSC)と骨髄由来造血系幹細胞(HSC)の採取

①MSCの採取および細胞培養

C3H/He Slc マウス(4週齢♀)大腿骨および脛骨の骨髄から通法に従い骨髄細胞を採取した。骨髄細胞を4週間20%FBS含有 $\alpha$ -Minimum Essential Mediumにて培養し、骨髄細胞由来MSCを得た。また、培養3週間後に骨髄細胞を固定、0.05%Toluidine Blueで染色を行い、形成されたコロニー数および形態の観察を行った(colony forming unit fibroblast(CFU-F) assay)。

②HSCの採取

C3H/He Slc マウス(4週齢♀)の大腿骨および脛骨の骨髄細胞より Milteny Biotec 社 MACS MicroBeads (magnetic cell sorting CD105<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>+LTR-HSCs)を用いてHSCを分離した。

(2) *in vitro*における分化能の検討

6 well plateにMSC群、MSC+HSC群、MSC+10倍量HSC(MSC+10HSC)群の組み合わせで細胞を播種し、分化培地に交換し多分化能について検討を行った。分化培地にはOsteoblast Differentiation Medium および Adipocyte Differentiation Medium (DS Pharma Biomedical)を使用した。分化培地交換3週間後に、骨芽細胞はAlizarin Red染色およびvon Kossa染色を行い、Gregory CAらの方法に従い各群の石灰化量を比較した。脂肪細胞はOil Red O染色を行い、well中の任意の5か所の脂肪細胞数を各々カウントし、比較した。さらに骨形成の指標となる各種遺伝子の発現を比較するため、realtime-PCRを行いmRNAの発現量を比較した。

(3) *in vivo*における分化能の検討

MSC、HSCおよびHydroxyapatite(HA)(セラタイト®)を、①HA群 ②MSC+HA群 ③HSC+HA群 ④MSC+HSC+HA群の4種類の組み合わせで混和し、ヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu)背部に移植した。移植8週間後にマウスを屠殺し、移植体をEDTAにて脱灰。脱灰後、通法

に従い切片を作成、HE染色を行い形成された新生骨を顕微鏡下にて観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *in vitro*における分化能の検討

C3H/He S1c マウス大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞由来 MSC の CFU-F assay の結果を図 1 に示す。

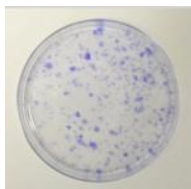


図 1. CFU-F assay

また骨芽細胞分化培地にて MSC を 3 週間培養し、Alizarin Red 染色の結果を図 2a に、von Kossa 染色の結果を図 2b に示す。脂肪細胞分化培地にて MSC を 3 週間培養した組織像を図 2c に示す。



図 2a Alizarin Red



図 2b von Kossa

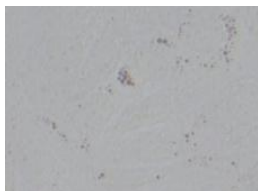


図 2c Oil red O 染色

分化培地により、骨髄由来 MSC の骨芽細胞分化能および脂肪細胞分化能が確認された。

以上より C3H/He S1c マウスより採取した骨髄細胞由来 MSC は自己増殖能および細胞多分化能をもつ細胞であることが示された。

*In vitro*における骨芽細胞分化培地による MSC および HSC 培養後の Alizarin Red 染色の結果を図 3a、von Kossa 染色の結果を図 3b、石灰化量比較の結果を図 3c に示す。

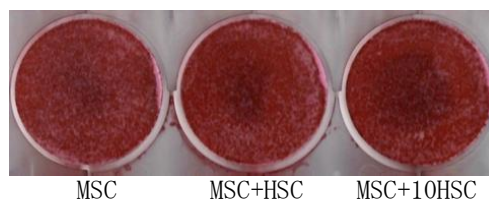


図 3a Alizarin Red 染色



図 3b von Kossa 染色

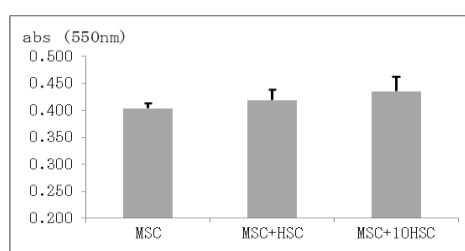


図 3c 石灰化量の比較

MSC 群、MSC+HSC 群、MSC+10HSC 群の 3 群で肉眼的には染色に差が認められなかった。また石灰化量の比較を行った結果、MSC 群、MSC+HSC 群、MSC+10HSC 群の順に吸光度は大きくなっていった。

*In vitro*における脂肪細胞分化培地による MSC および HSC の Oil Red O 染色組織像を図 4a に、脂肪細胞数を図 4b に示す。

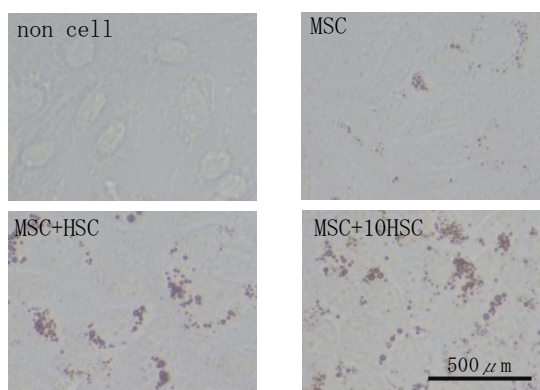


図 4a Oil Red O 染色像

MSC 群と MSC+HSC 群、MSC 群と MSC+10HSC 群を比較すると MSC 群の脂肪細胞数は、2 群に比較して有意に少なかった。これにより、

HSC を MSC と同時に培養することにより脂肪細胞数が増加し、細胞分化能が高まることが示唆された。

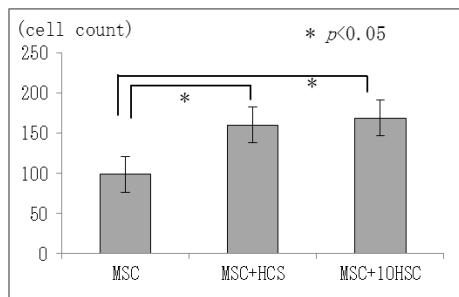


図 4b 脂肪細胞数の比較

細胞を播種し、24 時間後に回収したものをコントロールとし、MSC 群、MSC+HSC 群、MSC+10HSC 群の 3 群の細胞にて各々脂肪細胞分化培地および骨芽細胞分化培地に交換し 24 時間後に細胞を回収した。回収後の realtime-PCR の結果を図 4c に示す。

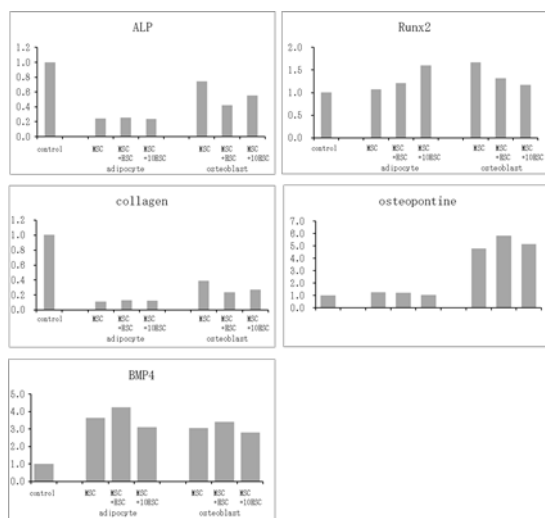


図 4c realtime-PCR

ALP および type I collagen の mRNA は各群ともにコントロールよりも低い値であった。一方、BMP-4、Runx2 の mRNA は各群ともにコントロールよりも高い値を示し、特に osteopontin の mRNA は骨芽細胞分化させたサンプルに多く認められた。なお、osteonectin と BSP の mRNA は検出限界以下であった。

(2) *in vivo* における分化能の検討

ヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) 背部に移

植した MSC および HSC の HE 染色像を図 5a~d に示す。

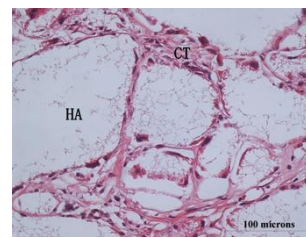


図 5a HA

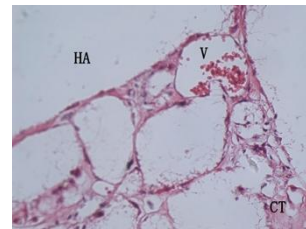


図 5b HA+HSC

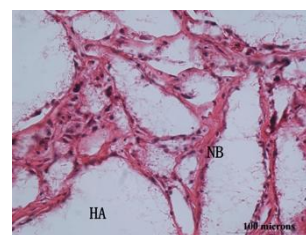


図 5c HA+MSC

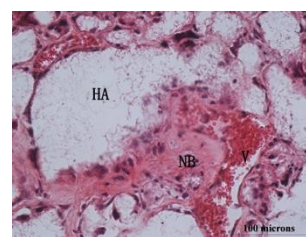


図 5d HA+MSC+HSC

HA 群および HA+HSC 群の移植体では新生骨は認められなかったが、HA+MSC 群および HA+MSC+HSC 群の移植体では新生骨が認められた。さらに HA+MSC+HSC 群では新生血管も認められ、骨の新生がより盛んであることが示唆された。

以上の結果より間葉系幹細胞と造血系幹細胞の併用により、骨組織の再生が盛んにな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)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

①Takashi S. Kajii, Mohammad Khursheed Alam, Tadashi Mikoya, Akihiko Oyama, Mino

Koshikawa-Matsuno, Yuki Sugawara-Kato,  
Yoshiaki Sato, and Junichiro Iida:  
Congenital and Postnatal Factors Inducing  
Malocclusions in Japanese Unilateral  
Cleft Lip and Palate Patients  
-Determination Using Logistic Regression  
Analysis, The Cleft Palate-Craniofacial  
Journal. 2012: accept(査読有)

〔学会発表〕(計1件)

①松野美乃, 菊入崇, 佐藤嘉晃, 飯田順一郎,  
鈴木邦明: 間葉系幹細胞と造血系幹細胞の併  
用による骨組織再生の試み, 日本矯正歯科学  
会, 2011年10月17日~20日, 名古屋国際  
会議場(名古屋市)

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松野 美乃 (MINO MASTUNO)

北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究  
員

研究者番号: 80374544

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし