

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659942

研究課題名(和文)細胞破壊と細胞組み込みによる新たな悪性腫瘍治療法の開発

研究課題名(英文)Cell destruction and reloading treatment for bone graft in oral cancer surgery

研究代表者

日比 英晴(Hibi, Hideharu)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90345885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の外科的対処として、切除した骨に液体窒素凍結などにより細胞破壊処理を加え、これを再植する方法がある。この生着率改善のため培養細胞利用の有用性について検討した。実験にはラットを用い、手術部位は下顎骨の顎角部に設定した。骨片をリン酸緩衝液(対照群)、骨髄間質細胞懸濁液(実験群1)、細胞培養上清液(実験群2)の各に浸漬処理し再植した。再植骨内の生細胞数の比率は術後2、4週とも対照群と比べ実験群2では有意に高かった。再植骨は術後2、4週で経時的に周囲から吸収が進み、実験群2ではさらに骨形成が認められた。細胞培養上清は細胞破壊処理骨の生着率を改善するうえで有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to improve graft survival rate of the bone fragment freeze-treated with liquid nitrogen for oral cancer surgery. Bone marrow stromal cells, their conditioned media and phosphate buffered saline were applied to the freeze-treated bone fragments of the rat mandibles. The bone fragments were reimplanted and then observed histologically 2 and 4 weeks after surgery. Histologic specimens showed the number of the live cells within the bone unit areas in the bone fragments applied with the media was larger than those with phosphate buffered saline or the cells. The media were effective to improve the graft survival rate of the freeze-treated bone.

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：再生医学 細胞・組織 移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍などで上下顎の部分切除術がされると、その再建術がきわめて重要になり、自家骨移植が頻用されるが、供給側に加わる侵襲が常に問題になる。われわれは骨移植にかわるものとして創内型装置による骨延長法に取り組み 10cm 以上にもおよぶ区域欠損を再建するなどの成果をあげた。(Hibi H, et al. Br J Oral Maxillofac Surg 2006) しながらこれには延長や骨化に要する治療期間が長いという欠点があった。また骨髄間質細胞と多血小板血漿を組み合わせた組織工学的骨再生法にも取り組み成果を得た (Hibi H, et al. Int J Oral Maxillofac Surg 2006)。さらにこれを骨延長部に注入することにより骨化を促進して治療期間を短縮化するなどの成果をあげた (Kinoshita K, Hibi H, et al. J Craniofac Surg 2008)。このように移植なしで骨を形成する試みを多面的にしてきたが、効率的に区域欠損が再建できるまでには至っていない。

一方、従来から悪性腫瘍の外科的対処のひとつとして、切除した骨に細胞破壊処理を加え、これを再植する方法がある。細胞破壊処理には煮沸、オートクレーブ、パストリゼーションなどの加温のほか液体窒素での凍結があり、口腔外科領域でも Marciani RD, et al. J Oral Surg 1975 をはじめ、いくつかの報告がある。この細胞破壊の原理は細胞が一定の解凍過程を経ると内部に氷晶形成が起きて細胞膜が破裂するというものである。これは確実に細胞破壊ができるにもかかわらず、タンパク変性が少なく基質や細胞増殖因子などが温存されやすい点で加温よりも有利であるとされる。それでも処理した骨は血行がなく完全に失活した状態であるためその生着の予知性は十分ではない。そこでこの細胞破壊処理骨に骨髄間質細胞を組み込むことにより生着を確実化して適応限界を拡大することを着想するに至った。骨髄間質細胞は骨形成能だけでなく中枢神経や心筋での梗塞巣における再血管化能がある点で注目されていた (Omori Y, et al. Brain Res 2008)。

この液体窒素による細胞破壊処理骨に骨髄間質細胞を組み合わせ再植した場合に、その生着の過程と組み込んだ細胞の動態を調べることとした。細胞の体内動態を調べることにより、それらと周囲から入って来る細胞が生着にどのように関与するかが骨、血管について明らかになることを目論んだ。予想結果は細胞組み込みが再植骨片の血行改善と生着率向上に有効であり、広範な区域切除により生じた骨片が生着することであった。意義は他部位に侵襲を加えることなく腫瘍に対する治療と再建が同時に可能になること、その対象領域は顎顔面にとどまらないことであり、腫瘍の外科的治療に新たな途を切り開くと期待した。

2. 研究の目的

本研究はそのおもな対象として区域切除を必要とする下顎悪性腫瘍を想定していた。研究の全体構想は区域切除した骨片に A: 液体窒素による細胞破壊処理と B: 自己骨髄細胞を組み込む処理を施した [A B] 処理骨片を再植することにより、悪性腫瘍の除去から下顎再建までを 1 期的に可能にすることであった。研究目的は再植後の骨片が生着する様相を観察し、組み込んだ細胞の動態を明らかにして、骨片の生着率向上と本法の適応拡大を図ることであった。

3. 研究の方法

- (1) 実験動物: ラットを用いた。
- (2) 細胞培養: 大腿骨から骨髄を採取し、骨髄間質細胞を分離、培養し増殖させた。
- (3) 手術および骨片等処理: 術中に以下のから まで進めた。

骨片切除: 下顎片側だけ顎下部から到達し骨膜を含めて顎角部を骨切りし、骨片を採取した。

骨片の液体窒素凍結処理: 骨片をヘパリン加生食水で洗浄し液体窒素中に 10 分間浸漬した後に 5 分間の室温放置、5 分間の生食水中浸漬をした。

組み込み処理とその条件設定: 骨片をリン酸緩衝液 (対照群)、骨髄間質細胞懸濁液 (実験群 1)、細胞培養上清液 (実験群 2) のそれぞれに 60 分間浸漬した。

再植: 骨片を復位し固定したのちに顎下部を閉創した。

- (4) 評価: 術後 2, 4 週で組織学的に再植骨片とその周囲を観察した。組織観察像上で骨単位面積当たりの生細胞数を計測し比較した。

4. 研究成果

再植骨片内の生細胞数の比率は術後 2, 4 週とも対照群と比べて実験群 2 では有意に高かった (図 1)。

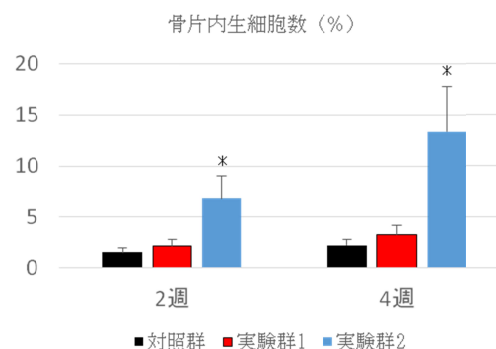


図 1 骨片内生細胞数

再植骨は術後 2, 4 週で経時的に周囲から吸収が進んだ。実験群 2 ではさらに顕著な骨形成が認められた (図 2)。

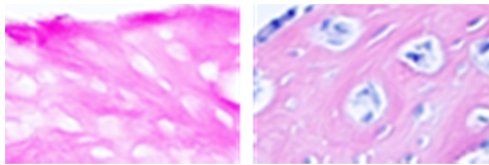


図2 術後4週の組織像(HE染色)
左図: 対照群, 右図: 実験群2

当初は凍結処理をすることで切除組織内の細胞を失活させたのちに, 骨髄細胞を何らかの形で組み込めば再び早期に生活状態となって再植骨が生着すると考えていた. 条件設定をかえて試行錯誤したが, 予想に反して奏功しなかった. 一度血行が途絶えたものはある程度以上の大きさであるとその中心部ほど虚血状態が長く続く. そこに細胞を組み込んでライフラインが途絶えていれば細胞は生活できない. そこで周囲から血行を回復しながら, 内在性の幹・前駆細胞を動員する必要があろうと考えられた.

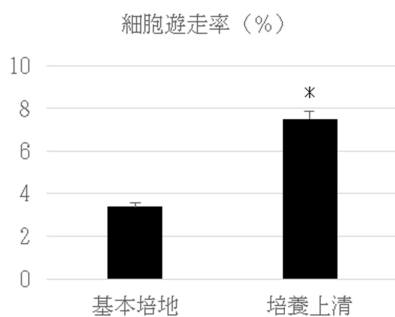


図3 培養上清の細胞遊走能

細胞培養上清中には細胞が放出するサイトカインや細胞外基質が含まれる. これらが内在性の細胞の増殖, 遊走, 分化を促進すること, さらにそれにより血管新生を促進して骨再生が得られることを最近明らかにしている(図3). そこで培養上清を実験群に加え, それらの作用を期待したところ, その効果が想像以上にあることが示唆された. 今後この至適な設定条件を求め, さらに細胞動態について検討する必要があると考えられる.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Ikeno, M., Hibi, H., Kinoshita, K., Hattori, H., Ueda, M.: Effects of permeability of shields with autologous bone grafts on bone augmentation. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 査読有, 28(6): e386-e392, 2013. doi: 10.11607/jomi.te19

Tsuchiya, S., Hara, K., Ikeno, M., Okamoto, Y., Hibi, H., Ueda, M.: Rat bone marrow stromal cell-conditioned

medium promotes early osseointegration of titanium implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 査読有, 28(5): 1360-1369, 2013. doi: 10.11607/jomi.2799

Tateishi, H., Okamoto, Y., Kinoshita, K., Hibi, H., Ueda, M.: Effects of implant surface on bone healing around titanium screw implants in ovariectomized rats. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 査読有, 28(5): e252-e259, 2013. doi: 10.11607/jomi.te05

Ikeno, M., Hibi, H., Kinoshita, K., Hattori, H., Ueda, M.: Effects of self-assembling peptide hydrogel scaffold on bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 査読有, 28(5): e283-e289, 2013. doi: 10.11607/jomi.te09

Inukai, T., Katagiri, W., Yoshimi, R., Osugi, M., Kawai, T., Hibi, H., Ueda, M.: Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 430(2): 763-768, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.074

Shohara, R., Yamamoto, A., Takikawa, S., Iwase, A., Hibi, H., Kikkawa, F., Ueda, M.: Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. *Cytherapy*, 査読有, 14(10): 1171-1181, 2012. doi: 10.3109/14653249.2012.706705

Osugi, M., Katagiri, W., Yoshimi, R., Inukai, T., Hibi, H., Ueda, M.: Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Engineering Part A*, 査読有, 18(13-14): 1479-1489, 2012. Doi: 10.1089/ten.tea.2011.0325

〔学会発表〕(計24件)

片桐渉, 日比英晴, 上田実, 他: 複数のサイトカイン群による血管新生を伴う新たな骨再生法. 第58回日本口腔外科学会, 2013.10.11, 福岡.

大杉将嗣, 日比英晴, 上田実, 他: 骨髄由来間葉系幹細胞由来液性因子による骨再生における血管新生. 第58回日本口腔外科学会, 2013.10.11, 福岡.

片桐渉, 日比英晴, 上田実, 他: 幹細胞培養上清由来液性因子による内在性細胞の遊走および血管新生を先行させる

新たな骨再生法．第 43 回日本口腔インプラント学会，2013.9.14，福岡．

Fujio, M., Yamamoto, A., Hibi, H., Ueda, M., et al.: Using hDPCs culture environments affect regenerative potential of conditioned media. 46th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research with the Scandinavian Division, 2013.9.5, Florence, Italy.

河合孝真, 日比英晴, 上田実, 他: 幹細胞培養上清由来成長因子による骨再生における血管新生．第 34 回日本炎症・再生医学会，2013.7.2，京都．

Omori, M., Hibi, H., Ueda, M., et al.: The application of atmospheric pressure plasma pretreatment for attaching conditioned medium to dental implant. 28th Annual Meeting, Academy of Osseointegration, 2013.3.7-9, Tampa, USA.

原憲史, 日比英晴, 上田実, 他: 骨再生誘導法への細胞培養上清の応用．第 42 回日本創傷治癒学会，2012.12.4，札幌．

梶村有紀子, 日比英晴, 上田実, 他: 種々の幹細胞培養上清由来の成長因子を用いた骨再生医療の開発．第 57 回日本口腔外科学会，2012.10.20-21，横浜．

大杉将嗣, 日比英晴, 上田実, 他: sFRP-3 は骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨再生において骨再生能を上昇させる．第 57 回日本口腔外科学会，2012.10.19-20，横浜．

安藤友二, 山本朗仁, 日比英晴, 上田実, 他: 培養上清による組織再生 / 骨延長部の骨形成促進効果の検討．第 57 回日本口腔外科学会，2012.10.19-20，横浜．

Osugi, M., Hibi, H., Ueda, M., et al.: Conditioned media from bone marrow derived mesenchymal stem cells and adipose derived stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. 3rd TERMIS World Congress 2012, 2012.9.6, Vienna, Austria.

Kawai, T., Hibi, H., Ueda, M., et al.: Periodontal tissue regeneration with the stem cells cultured conditioned media. 3rd TERMIS World Congress 2012, 2012.9.6, Vienna, Austria.

Katagiri, W., Hibi, H., Ueda, M., et al.: Preliminary and first-in-human clinical study of novel bone regenerative medicine using the conditioned media from bone marrow derived mesenchymal stem cells. 3rd TERMIS World Congress 2012, 2012.9.6, Vienna, Austria.

安藤友二, 山本朗仁, 日比英晴, 上田実, 他: 培養上清による骨延長部の骨形成促

進効果の検討．第 33 回日本炎症・再生医学会，2012.7.5，福岡．

原憲史, 日比英晴, 上田実, 他: 骨髄間質細胞由来の培養上清由来成長因子を付着させた骨再生誘導膜有用性の検討．第 11 回日本再生医療学会，2012.6.13，横浜．

河合孝真, 日比英晴, 上田実, 他: sFRP-3 は骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨再生において骨形成能を上昇させる．第 11 回日本再生医療学会，2012.6.13，横浜．

大杉将嗣, 日比英晴, 上田実, 他: 幹細胞培養上清由来成長因子による骨再生能の検討．第 11 回日本再生医療学会，2012.6.12，横浜．

大杉将嗣, 日比英晴, 上田実, 他: ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおける幹細胞培養上清由来成長因子による骨再生能の検討．第 56 回日本口腔外科学会，2011.10.21-23，大阪．

木下一彦, 日比英晴, 上田実, 他: 幹細胞培養上清由来成長因子を用いたウサギ上顎洞底拳上術モデルにおける骨形成性の検討．第 56 回日本口腔外科学会，2011.10.21-23，大阪．

片桐涉, 日比英晴, 上田実, 他: 幹細胞培養上清由来成長因子による細胞移植をともなわない新規骨再生医療の開発．第 56 回日本口腔外科学会，2011.10.21，大阪．

〔図書〕(計 2 件)

Hibi, H., Ueda, M.: InTech, Tissue engineering and regenerative medicine for bone regeneration; Micro-Nano Mechatronics - New Trends in Material, Measurement, Control, Manufacturing and Their Applications in Biomedical Engineering. 2013, 364 (321-329).

日比英晴: 朝倉書店, 顎骨の再生医療; 再生医療叢書第 8 巻歯学系, 2012, 188 (110-122).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 英晴 (Hibi, Hideharu)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 9 0 3 4 5 8 8 5

(2) 研究分担者

上田 実 (Ueda, Minoru)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 0 0 1 5 1 8 0 3

山本 朗仁 (Yamamoto, Akihito)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 5 0 2 4 4 0 8 3