

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011-2012

課題番号：23792037

研究課題名（和文）脂肪由来間葉系幹細胞を用いた骨移植法の開発

研究課題名（英文） A development of the way of bone transplantation using adipose derived stem cells

研究代表者

秋田 新介 (Akita Shinsuke)

千葉大学 医学部附属病院 医員

研究者番号：00436403

研究成果の概要（和文）：

ニホンウサギ骨髄より単離した骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)、脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)を骨欠損モデルに移植し対照群と比較評価した。移植後4週間でマイクロCTで評価を行い、骨誘導培地群は対照群と比して局所の線維化を抑制したが有意差は取れなかった。対照群と比して有意な骨新生を示唆する結果は確認できなかったものの、担体内での体外培養系の樹立および欠損部位の線維化の抑制結果はヒト顎骨骨延長治療のモデルにおいて術後の延長部位の後戻りを防ぐ有用な手段の一つとなりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We planned to examine whether adipose derived stem cells (ADSC) could surpass bone marrow derived stem cells (BMSC) for donor ability. Both of them were inducted in osteoinduction medium within scaffolds, and transferred into bone defect respectively that we made on rabbits' mandible. After 4weeks, we harvested the tissues, both of defects showed less fibrosis compared with control group, but we didn't detect significant differences between them statistically. Moreover neither of ADSC nor MSC provided more bone remodeling than controls. That lead us to the investigation that we should consider the term for osteo-induction in vitro and the fact transfer groups prevented defect fibrosis means this methods could be an effective step to prevent bone regression in clinical cases after osteodestruction surgery of infants suffering midface anomaly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：脂肪由来幹細胞 ・骨髄由来幹細胞 ・骨延長術

1. 研究開始当初の背景

形成外科領域において骨欠損部に対する治療アプローチは、自家骨を移植する手法や骨延長法術を用いる方法が現在標準的に用いられる方法であるが、骨移植法ではドナーとなる部位の犠牲、骨延長法では術後経過における後戻りや長期間にわたる保定期間などの問題があるため、いずれの方法も患者の負担は大きい。骨延長法の保定期間を短縮し、患者の負担を軽減する方法として、幹細胞を用いることはこの領域の一つの解決法となりうると考えられる。

現在では間葉系幹細胞のsourceは多様化するようになり、骨髄・歯髄・脂肪・臍帯血などのさまざまな細胞が取り上げられている。骨髄由来間葉系幹細胞(Bone Marrow Mesenchymal derived Stem Cell:BMSC)は有効な幹細胞源であるが、問題点として、骨髄穿刺による患者負担、採取できない可能性、加齢に伴う幹細胞数の減少などがある。臍帯血は問題点として、間葉系幹細胞の存在頻度の低さ、分娩から細胞採取までの時間や臍帯血量により影響を受けるなどの効率性、確実性に劣ることなどがあげられる。そこでわれわれは幹細胞の存在が確認され、全身疾患に対する有用性が期待されている脂肪由来間葉系幹細胞(Adipose derived stem cell:ADSC)に注目した。

2. 研究の目的

脂肪由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の双方の分化誘導過程、再生組織品質や恒久性を骨再生能に注目して比較する。

この過程を通して、長期間にわたり安定した機能を維持する骨を創造し得る新規幹細胞培養技術を確立することが本研究の目的であ

る。本研究の成果は、顎骨の延長を要する患者の治療負担の軽減、治療成績の向上につながると思われる。

3. 研究の方法

(1) 10週齢オスニホンウサギ骨髄より単離した間葉系幹細胞を用い、対照群(control group)と誘導群(study group)に分け、in vitroにて軟骨誘導、脂肪誘導、骨誘導の3系統に付きそれぞれ21日間にわたりヒト間葉系幹細胞分化誘導培地を用いた誘導工程を行い、細胞分化の特性を評価した。ウサギ脂肪由来の間葉系幹細胞(Adipose derived stem cell:ADSC)での誘導は個体差によって不安定であったため、先行してウサギ骨髄由来MSCを用いて、in vitro実験系の確証を図った。具体的には

①軟骨分化特性については、グリコサミノグリカン/DNA量比の測定をおこなって比較した。

②脂肪分化特性はPPAR γ のmRNA発現、TG/蛋白比、オイルレッド染色を施行して比較した。

③骨分化特性はCa産生量、およびALP発現、alizarin red染色、の3種について各々比較した。

手技の確立に続いてADSCにて骨分化を図り、その骨分化特性を改めて確認した。

(2) 医療用bTCP顆粒(気孔率70%)数種を担体として細胞を播種し、ヒト接着細胞用培地にて培養し、6週間までの期間において、担体内での細胞接着および増殖能を確認した。

(3) (1)、(2)の結果(後述)より、in vivoの実験を施行した。ニホンウサギ骨髄より単離したMSCおよび背部脂肪より作成したADSC各々を担体に播種し、骨誘導培地で方向づけ

を行い、人工的に骨切りを行い作成した片側の下顎骨欠損モデルに移植し、骨延長デバイスを装着した。デバイスは2日間の待機期間の後に、通常よりも骨形成に不利な条件を想定して、通常の延長速度よりもハイペースとなる1日あたり2mm×5日間で合計10mmの延長を行い、対照群との比較評価を施行した。

移植および骨延長後4週間および8週間での移植部の骨造成の比較を行う目的でマイクロCTの撮影および病理標本の作製を行って評価をした。

4. 研究成果

(1) ①軟骨分化特性(グリコサミノグリカン/DNA量比)、②脂肪分化特性(PPAR γ のmRNA発現, TG/蛋白比, オイルレッド染色)、③骨分化特性(Ca産生量, およびALP発現, alizarin red染色)すべてにおいて各誘導群は対照群と比べて優位にそれぞれの系統分化特性を示した。

従って臨床応用において、より合理的に移植した幹細胞を個体内で骨芽細胞へ誘起するには、細胞を生体に移植する前に誘導培地によって骨分化へ特性づける必要があると考えられた。

ADSCにて骨分化の誘導を行い、骨分化特性が確認された。

(2) bTCPを担体として、ヒト接着細胞用培地にて培養し、6週間での担体内での細胞接着および増殖能を確認した。ここまでで確立した手技を用いて、in vivoにおける実験に移行した。

(3) 骨誘導培地群(骨髄由来、脂肪由来両者とも)は対照群と比して局所の組織の線維化を抑制したが、有意差まではえられなかった。

ADSCとBMSC群での線維化の程度に差異は見られなかった。また対照群と比して有意な

骨新生を示唆する結果は確認できなかった。

マイクロCTにおける骨密度については、対照群と比較していずれも有意差を認めなかったが、骨体積についてはいずれも有意に増加した。また、骨密度、骨体積いずれにおいてもBMSCとADSCの間には有意差は見られなかった。

以上の結果から、In vitroでの骨誘導結果をvivoに反映するには長期培養を行うよりも、必要最低限の誘導期間後速やかな移植により体内での骨新生過程に順応させる改良点が必要と感じられた。適切な誘導期間の設定については、マイクロCTおよび病理標本を用いた検討が今後さらに必要であると考えられる。

また、これまでのデータにおいてはADSCとBMSCに骨申請の程度に差は見られなかったが、このことについて、いずれを用いても同等の効果が得られることが示唆されるとするならば、より組織採取における侵襲の低いADSCの方が臨床上有用であると考えられるが、条件を変えることにより、より効率の良い骨新生が得られる可能性があり、その場合にも、ADSCとBMSCとの間に差がないかどうかをさらに検証する必要があると考えられる。

しかしながら本研究の結果からは、担体内での体外培養系の樹立および欠損部位の線維化の抑制結果はヒト顎骨骨延長治療のモデルにおいて、延長スピードや保定期間の短縮のための、または術後の延長部位の後戻りを防ぐための有用な手段の一つとなりうる貴重な結果を得られた。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋田 新介 (Akita Shinsuke)

千葉大学 医学部附属病院 医員

研究者番号：00436403