

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8月26日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792361

研究課題名（和文） ホーミング分子を組み込んだ末梢血単核細胞による骨再生

研究課題名（英文） Bone regeneration by using mononuclear cells derived from peripheral blood with homing factor.

研究代表者

大場 誠悟（OHBA SEIGO）

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80363456

研究成果の概要（和文）：

- 1.末梢血由来の単核細胞には多分化能を持つものがあり、これを担体と混ぜ、マウスの頭蓋冠骨に移植することで、骨の誘導が示された。その誘導能は、骨髄由来の単核細胞と同程度であった。
- 2.マウスの大腿骨の骨髄から採取した間葉系幹細胞を培養し、これに、低濃度のレプチンとBMP-2を混和することで、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められた。また、レプチンを含んだゼラチンを担体と一緒にマウスの頭蓋冠骨に作成した欠損域に移植したところ、有意に骨新生を誘導することが示された。

研究成果の概要（英文）：Two projects provided following results.

1. There are certain cells which have multilineage potentials in the mononuclear cells of peripheral blood. These cells with the scaffold (β -TCP) were transplanted on the calvaria of mice as an onlay, resulting in synthesizing new bone formation. The amount of new bone was more than the scaffold without cells. Moreover, the bone induction potency was comparable as the bone marrow-derived mononuclear cells.
2. The mesenchymal stem cells extracted from the marrow of the femur of mice were cultured. These cells were exposed by missed of leptin and BMP-2, which dose was too low to induce more osteoblastogenesis by solely, and the alkaline phosphatase activity was calculated. Moreover, when the gelatin containing leptin and scaffold (β -TCP) was transplanted to the defect region with a clinical size, created to the calvarial bone of a mouse, induced bone regeneration.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：PRP、再生、MNC、レプチン

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来の間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)は組織再生医療の主役的存在であり、種々の臓器再生への研究がなされている。ほとんどの報告では、採取したMSCを培養した後に使用しており、良好な結果が得られている。しかしながら骨髄穿刺あるいは培養過程の必要性の点から、安全性、簡便性、治療期間に問題が生じる。一方で、採取した未分化な細胞を培養せずに局所へ注入することで神経組織の再生に成功したり、静脈内投与により肝硬変や虚血性疾患の改善に有効であったことから、培養操作を介さない治療法の可能性が報告されている。

末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; MNC)は血管新生に重要な役割を果たす細胞であり、末梢血の採取により単離が可能である。また、事前に顆粒球コロニー刺激因子であるG-CSF剤を投与しておくこと、抹消血中のMNCを容易に増員できる。これにより、培養操作を介さずに必要量のMNCを獲得することができる。

また、レプチンはエネルギー代謝に関与するペプチドホルモンとして同定されたが、その作用範囲は多岐にわたっており、組織再生への関与が報告されている。

2. 研究の目的

口腔外科領域では、腫瘍切除後などの骨欠損後のQOLの向上のために、歯槽骨・顎骨の再生は重要な課題である。再生医療が今後の医療現場において、重要な位置を占めてくることはもはや疑いようのない事実であり、骨の再生に関しても培養細胞を利用した種々の試みがなされている。しかしながら、培養細胞の利用には安全面、経済面、治療期間が問題となる。そこで我々は、骨髄由来間葉系幹細胞を利用し、培養操作を介さず、より簡単・安全且つ確実に短期間で成熟した骨の再生法の確立を目指しており、これを本案の目的とする。

3. 研究の方法

研究目的に即し、2つの実験系を行った。

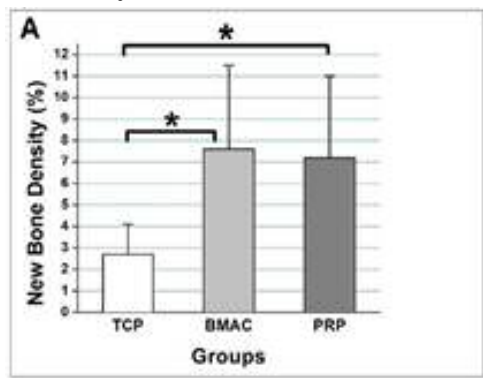
1) 腸骨から採取した骨髄および、末梢血を遠心分離し、得られた分画(buffy coat)を使用した。基本的には前処置は必要としないようにするが、採取できた細胞をカウントし、不十分であると判断された場合にはG-CSFの注射を行うこととした。実際にはG-CSFを使用することなく十分量の細胞が採取可能であった。また、この分画には高濃度の単核細胞の他に血小板を含むことを確認した。単核細胞の性質をFACSで調べた。またこの分画を、培養操作を介さず、ヌードマウスの頭蓋冠骨上に、担体(β -TCP)とともにonlayにして移植した。その後4、8週間後に屠殺し、骨新生の状態を観察した。

2) マウスの大腿骨から骨髄を採取し、そこから未分化な細胞を抽出した。これを培養し、全ての実験でP2を使用した。培養細胞にleptin、BMP-2および両者を添加し、アルカリフォスファターゼ活性を調べた。使用したBMP-2の濃度は、それ単体ではcontrolと比較してアルカリフォスファターゼを有意に上昇させない濃度とした。またleptinも同様に濃度設定を行った。これらのタンパク質を担体(β -TCP)とともにマウスの頭蓋冠骨に形成したclinical sizeの欠損部に移植した。この際の両タンパク質の濃度はin vitroで決定した。移植後、4、8週間後に屠殺し、 μ -CTで骨の状態を観察するとともに、組織標本で骨新生の状態を観察した。

4. 研究成果

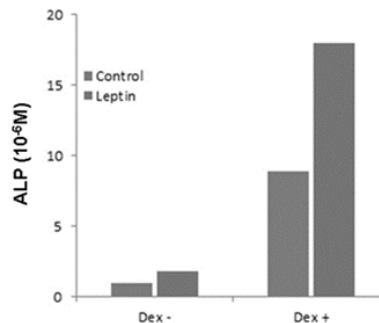
1) 採取した骨髄由来、末梢血由来の細胞はともに、間葉系幹細胞の細胞マーカーがpositiveなものが存在していた。またbuffy coatには高濃度の血小板も含まれていた。これらを担体(β -TCP)とともにヌードマウスの頭蓋冠骨上に移植したところ、いずれも骨新生能を持っており、担体のみと比較して有意な差を示し

た。しかしながら、骨髄、末梢血の間で新生された骨の量には有意差は認められなかった。また、血小板および単核細胞を含まない分画(PPP; platelet poor plasma)を移植した群は、担体のみの群とほぼ同じレベルの新生骨を誘導した。この結果は、buffy coat に存在する MNC 及び血小板が骨新生に寄与したことを示唆する。特に MNC には未分化な細胞が存在するため、この細胞が有意に働いたということが推測される。また、buffy coat の由来が末梢血と骨髄とで、骨新生能力に差が認められなかったため、現在主流である骨髄由来の細胞を用いるのではなく、容易に採取可能な末梢血を利用した骨新生法の確立であることが示唆された。



2) マウスの大腿骨から採取した細胞から、間葉系幹細胞を抽出した。Osteogenic な培地に leptin を添加したところ、アルカリフォスファターゼ活性 (ALP) が有意に上昇することがわかった。また、コントロール群と比較して、同程度の ALP 活性を示す leptin と BMP-2 を同時に添加することで、ALP 活性は有意に上昇した。このことは leptin と BMP-2 が相乗効果を示している可能性を示唆するものであった。そこで、これらをそれぞれ、あるいは両者を担体(β -TCP)とともに頭蓋冠骨に作成した欠損部に移植したところ、骨新生を誘導することが確認された。これは組織標本でも確認できたが、 μ -CT でも確認された。これらの結果は、副作用を起こさない程度の低容量の leptin および BMP-2 による骨新生

が可能であることを示唆しており、おそらくこれらの蛋白は未分化な細胞に作用し、骨新生に関与しているものと推測される。



1)、2) の研究成果より、末梢血由来の単核細胞 (未分化な細胞を含んでいる) を高濃度に含む分画を採取し、これに低容量のレプチンと BMP-2 を加え、骨欠損領域に移植することで、簡単・安全且つ早期に成熟な骨新生法の確立されるものと考えられる。

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)

Zhong, W, Sumita Y, Ohba S, Kawasaki T, Nagai K, Ma G, Asahina I. In vivo comparison of the bone regeneration capacity of human bone marrow concentrates vc. Platelet-rich plasma. PLoS One 7: e40833, 2012. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 梅林真由美、仲維剣、住田吉慶、大場誠悟、長井一浩、朝比奈泉; 骨再生における骨髄濃縮液と抹消血 PRP の有効性の比較検討: 再生医療学会 (2012 年 6 月 12 日-2012 年 6 月 14 日; パシフィコ横浜)
2. Mayumi Umebayashi, Weijian Zhong, Yoshinori Sumita, Seigo Ohba, Kazuhiro Nagai, Izumi Asahina; Bone regeneration capability of human bone marrow concentrates versus platelet rich plasma. International Society for Stem Cell Research

(2012年6月13日-2012年6月16日; パシフィコ横浜)

3. 本岡菜穂美、大場誠悟、朝比奈泉; 骨形成におけるレプチンと BMP-2 の相乗効果の検討: 口腔外科学会総会 (2012年10月19日-2012年10月21日; 横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 誠悟 (OHBA SEIGO)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80363456