

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792188

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を応用した骨再生における細胞動態と骨質の解析

研究課題名(英文) Histological examination of bone regeneration induced by mesenchymal stem cells: analyses of cell kinetics and bone quality

研究代表者

小島 拓 (KOJIMA, TAKU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：90515777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療において、間葉系幹細胞を生体親和性に優れたバイオマテリアルに組み込むことで高次的な組織構築を可能とするティッシュエンジニアリングが注目されている。しかし、これらの培養技術を応用した骨再生の有用性について、組織学的に詳細に報告したものは少ない。本研究では、ラット頭蓋骨実験モデルに、間葉系幹細胞・多孔性 β -TCPブロック複合体を用いた場合の新生骨について解析を行った。その結果、骨芽細胞と破骨細胞のカップリングのプロセスを経て、 β -TCPの吸収、骨基質の改変、骨細胞・骨細管系の構築が行われることで、三次元的な形態で良好な骨質を有する緻密骨が誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined bone regeneration induced by a porous β -TCP block mingled with bone marrow stromal cells, in order to clarify histological events during the bone regeneration and to assess bone quality in this model. New bone showed a histological profile of compact bone, and was composed of densely packed collagen fibrils that were orderly arranged. The mineralization of the new bone was sufficient. Thus, these results showed that β -TCP block mingled with differentiated bone marrow stromal cells had a high osteogenic potential, and therefore, the resultant bone regenerated by this technique appears to possess good bone quality.

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：骨再生 バイオマテリアル 間葉系幹細胞 骨芽細胞 破骨細胞 骨細胞 骨質

1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域では、腫瘍、嚢胞、外傷、炎症などの多様な疾患によって広範囲な顎骨欠損が生じることが多いが、その再建には顔貌の回復だけでなく、将来的な咀嚼機能の回復のための形態と強度を兼ね備えた顎骨の再建が必要となる。現在、顎骨再建材料のゴールドスタンダードは腸骨、腓骨といった自家骨であるが、骨採取手術が必要なため患者の侵襲が大きいという問題がある。一方、人工の骨補填材は骨採取手術の必要がなく使用量に制限が無いという利点があり、近年の骨再生治療に多く用いられている。人工材料にはハイドロキシアパタイト、 β -TCP、 α -TCP などが存在し、申請者はそれら種々の補填材に対する細胞動態と再生骨の骨質について報告してきた(Kojima T, et al: J Bone Miner Metab 2007, Kojima T, et al: BioMed Res. 2007)。特に α -TCP については、破骨細胞の骨吸収が先行してから骨芽細胞による骨形成が生じることで緻密な再生骨が誘導されること、また経時的に自家骨に置換されることが示された(研究代表者: 小島拓・平成 20-21 年度若手研究(スタートアップ) 現在論文投稿中)。さらに、骨髄から分離した間葉系幹細胞を α -TCP 顆粒に播種した場合、 α -TCP 顆粒単独よりも効率的に骨再生が生じることが明らかとなった(研究代表者: 小島拓・平成 22-23 年度若手研究(B) 現在論文作成中)。しかし、理想的な骨形態を回復するにあたり、 α -TCP の形態は顆粒状よりもブロック状のほうが形態を考慮した骨再生が可能になるため、臨床応用を考える上で非常に有益である。

そこで本研究では、 α -TCP ブロックに間葉幹細胞を応用した場合の骨再生について、細胞動態、骨質に着目して解析を行う。骨再生バイオマテリアルの形状を顆粒からブロックへと形態付与することで、形態を考慮した再生骨の作製が可能となるため臨床応用への架け橋となる。また、再生骨を自家骨の代替物として臨床応用を考える際、自家骨と再生骨の骨質の相違について検討することが極めて重要である。本研究を遂行し成果を得ることで、新たな再生医療の実用化および普及に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、骨再生バイオマテリアルに間葉系幹細胞を応用した技術を駆使することで骨再生の向上を図り、各細胞イベント(骨芽細胞の分化誘導、破骨細胞と骨芽細胞のカップリング、骨細胞・骨細管系ネットワーク)および再生骨の骨質を微細構造学的・細胞学的に解明する。

具体的には、 α -TCP ブロックと間葉系幹細胞の応用法が、 α -TCP ブロック単独と比較して、骨芽細胞への分化誘導・骨形成・骨質においてどれだけ向上性の高い再生骨を誘導

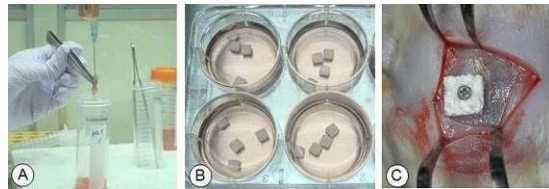
できるか組織学的に評価する。その評価方法は、組織化学に加えて電子顕微鏡観察・元素分析法にまで及ぶ。

3. 研究の方法

(1) 動物: 生後 4 週、12 週齢雄性 Fisher 系ラット

(2) 骨再生バイオマテリアル: 多孔性 β -TCP ブロック(オスフェリオン[®]: オリンパステルモバイオマテリアル社); 気孔率 75%、大きさ 5×5×2 mm

(3) 実験術式: 生後 4 週齢雄性 Fisher 系ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取して多孔性 β -TCP ブロック(オスフェリオン[®])に播種し、 β グリセロリン酸、デキサメタゾン、アスコルビン酸を添加して骨芽細胞様細胞への分化を誘導しながら 3 週間培養を行った(図 A, B)。この骨髄細胞・ β -TCP ブロック複合体を、生後 12 週齢の同系ラット頭蓋骨骨膜下に移植したものを実験群とした。また、培養液に浸漬した β -TCP ブロックのみを移植したものを対照群とした(図 C)。一方で、培養細胞が骨芽細胞様細胞へ分化しているかを確認するため、アルカリフォスファターゼ、アリザリンレッドによる染色を行った。



(4) 解析項目: 術後 2, 4, 24 週目に灌流固定を行い、移植部位の骨新生について組織化学的、微細構造学的に以下の検討を行った。

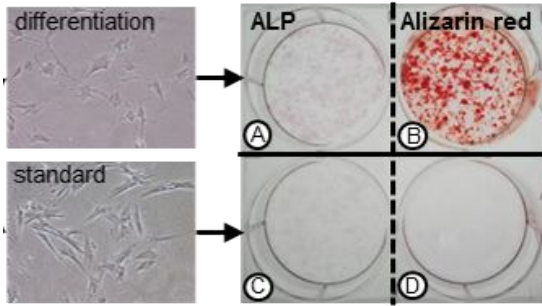
組織化学: 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP:破骨細胞の同定)、アルカリ性ホスファターゼ(ALP:骨芽細胞系細胞の同定)、鍍銀染色(骨細管の同定)

透過型電子顕微鏡解析

電子線マイクロアナライザ(EPMA)を用いた元素マッピング(カルシウム、リン解析)

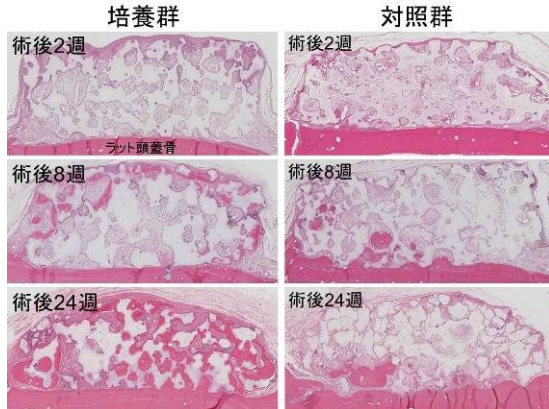
4. 研究成果

(1) 骨芽細胞様細胞への分化の評価

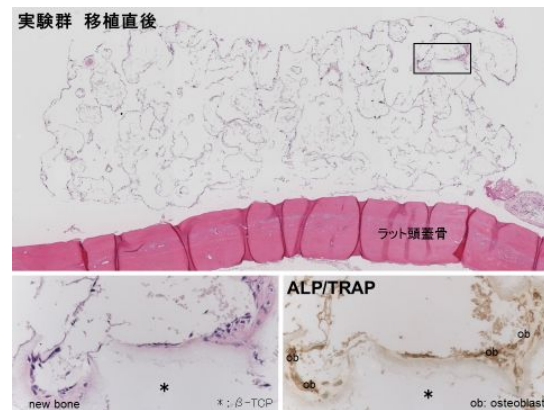


培養細胞が骨芽細胞様細胞へ分化しているかを確認するため、アルカリフォスファターゼ、アリザリンレッドによる染色を行ったところ、分化誘導した培養群ではいずれも陽性反応を認めた (A, B)。(C, D は基本培地)

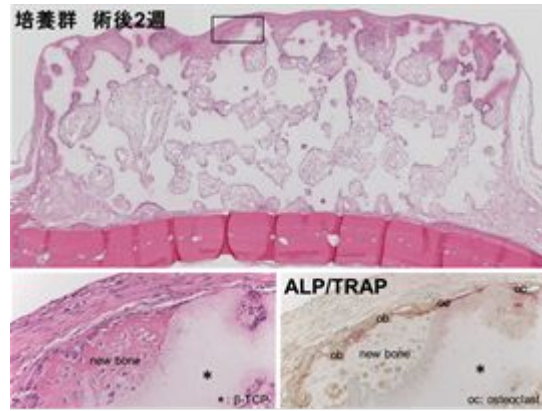
(2) 新生骨の組織化学的解析



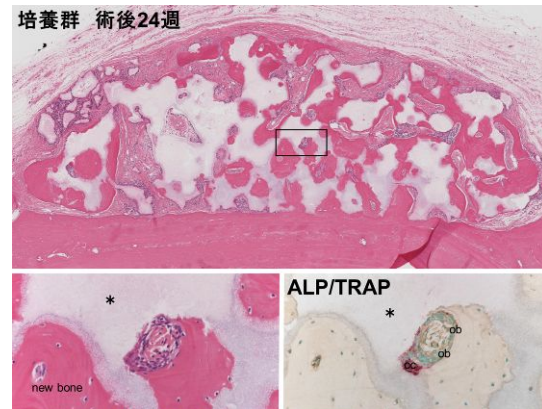
培養群では β -TCP ブロック辺縁部より中央に向かって経時的に新生骨が形成されるのに対し、対照群では β -TCP ブロック底部にわずかに新生骨が形成されるのみである。



培養群移植直後では、TCP ブロック辺縁部には新生骨の形成を認め、その表層には ALP 陽性反応を認める。一方、TRAP 陽性反応は認めない。したがって、培養細胞が骨芽細胞様細胞へと分化して新生骨を形成していることが示唆される。

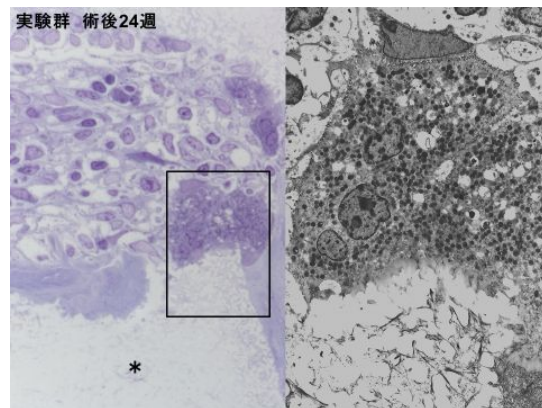


培養群術後 2 週では、複合体辺縁部に幼弱な線維性骨を認め、表層には多数の ALP 陽性骨芽細胞が配列している。一方、周囲の β -TCP 上には TRAP 陽性破骨細胞が局在している。

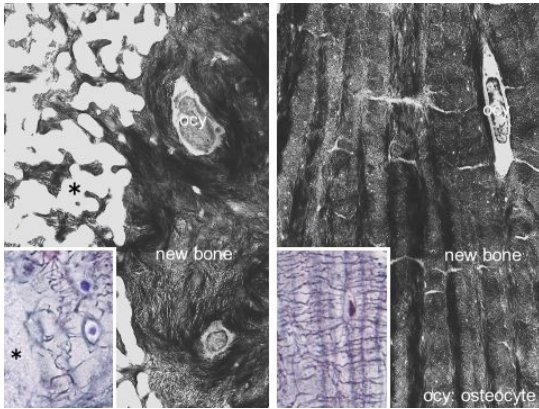
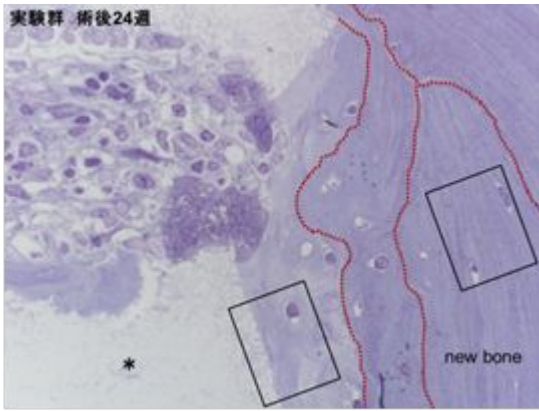


培養群術後 24 週ではブロック全域に新生骨を認め、その骨梁は太く層板様を呈する。またブロック中央部の β -TCP 上には TRAP 陽性破骨細胞が局在し、周囲に ALP 陽性骨芽細胞を認める。

(3) 新生骨の透過型電子顕微鏡観察

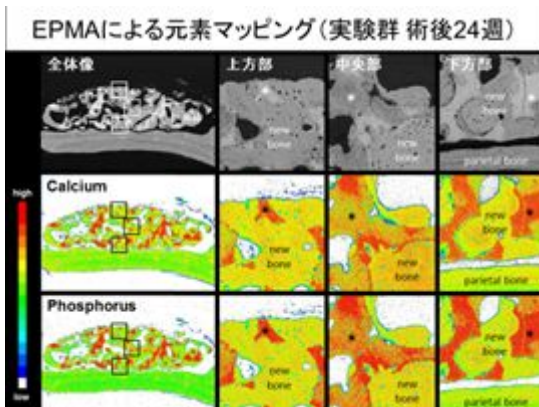


培養群術後 24 週において、多核でミトコンドリアが豊富な破骨細胞が β -TCP 上に直接接着しているのが確認できる。したがって、術後 24 週においても破骨細胞による β -TCP の吸収が行われていることが推測される。



培養群術後 24 週では、 β -TCP 付近の新生骨はコラーゲン線維の走行が不規則で、内部の骨細胞の形態はふっくらとしている。一方、 β -TCP から離れた部位の新生骨は、コラーゲン線維が整然と密に配列し、骨細胞がコラーゲン線維の走行と平行に扁平となり、骨細管が伸び出している。鍍銀染色を行うと、 β -TCP 周囲の新生骨における骨細管の走行は不規則なのに対し、 β -TCP から離れた部位では規則的配列を示す。

(4) 新生骨の元素マッピング



培養群術後 24 週において、EPMA による元素マッピングを行ったところ、新生骨の上方部、中央部、下方部のいずれの部位についても、既存骨と同等のカルシウム、リン濃度を示す。

(5) まとめ

培養群における新生骨の形成は、 β -TCP ブロック辺縁部から起こり、徐々に厚みを増していった。

新生骨表層には多数の骨芽細胞が配列し、周囲の β -TCP 上には破骨細胞が局在しており、破骨細胞による β -TCP の吸収、骨芽細胞による新生骨形成といったカップリングのプロセスが示唆された。

複合体辺縁部に形成された新生骨は、術後 24 週目にはブロック全域に形成された。

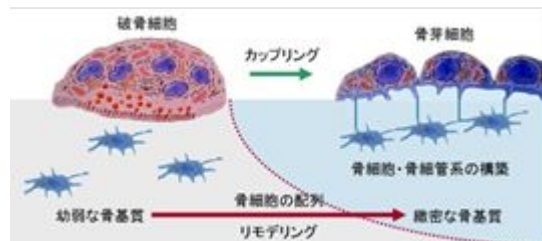
術後 24 週目の新生骨は層板様を呈する緻密骨へと改変し、カルシウム、リン濃度は既存骨と同等の値を示した。したがって新生骨が、リモデリングにより良好な骨質を有する緻密骨へと改変されていくことが示唆された。

β -TCP 付近の新生骨はコラーゲン線維の走行が不規則であり、内部の骨細胞の細胞質は豊かで、また骨細管の走行が不規則なのに対し、 β -TCP から離れた部位の新生骨は、コラーゲン線維が整然と密に配列し、骨細胞がコラーゲン線維の走行と平行に扁平となり、骨細管が規則的に配列していた。したがって β -TCP 上に形成された新生骨がリモデリングを受けることで骨細胞・骨細管系ネットワークを構築することが示唆された。

対照群ではブロック底部にわずかな新生骨を認めるのみで、ブロック内部は線維性結合組織で占められていた。

(6) 結語

骨髄細胞・ β -TCP ブロック複合体を用いた本実験モデルにおいて、骨芽細胞と破骨細胞のカップリングのプロセスを経て、 β -TCP の吸収、骨基質の改変、骨細胞・骨細管系の構築が行われることで、三次元的な形態で良好な骨質を有する緻密骨が誘導されることが示唆された。



(7) 今後の展開

今回の研究結果から、骨髄由来間葉幹細胞を用いることで骨再生能が向上することがわかり、培養技術を応用した骨再生の有用性が明らかとなった。しかし、生体内に移植後の培養細胞の動態と骨形成における役割については不明な点が多い。したがって今後は、培養細胞の動態、骨形成における役割、移植母床の細胞との関係や再生骨の骨質を微細構造学的・細胞生物学的に解析していきたい。また近年、間葉系幹細胞の採取部位として骨髄以外に脂肪、骨膜なども利用されている。間葉系幹細胞の採取が簡便で安全なものになれば患者への恩恵も大きい。そのため間葉系幹細胞の由来の違いによる骨再生能の差についても解析を進めていく予定である。

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)

Kojima T, Hasegawa T, Freitas PHL, Yamamoto T, Sasaki M, Horiuchi K, Hongo H, Yamada T, Sakagami N, Saito N, Yoshizawa M, Kobayashi T, Maeda T, Saito C, Amizuka N: Histochemical aspects of the vascular invasion at the erosion zone of the epiphyseal cartilage in MMP-9-deficient mice. Biomed. Res. 34: 119-128, 2013. 査読あり

[学会発表](計2件)

小島 拓、芳澤享子、小野由起子、坂上直子、齋藤直朗、小林正治：骨髄細胞・-TCPブロック複合体における骨再生機序と骨質の組織学的解析 .第35回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会、仙台、2014年2月1日。

Kojima T, Kobayashi, Yoshizawa M, Ono Y, Saito N, Takashima M, Arai Y, Saito C: Vertical distraction osteogenesis of a nonvascularized iliac bone in a reconstructed mandible: A report of 3 cases. 21st International conference on oral and maxillofacial surgery, Barcelona, Spain, Palau de Congressos de Catalunya, 20-24, Oct, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

小島 拓 (KOJIMA TAKU)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：90515777