

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463022

研究課題名(和文) 臨床に向けて顎骨欠損への適切な再生代替骨の選択

研究課題名(英文) The choice of the suitable regenerated substitutive bone to the defect of jaw bone

研究代表者

山崎 安晴 (YAMAZAKI, YASUHARU)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00210401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋骨欠損モデルの動物実験では、その骨形成量はscaffold<hBMCの上清 + scaffold <hBMCの上清(10X) + scaffold<hBMC + scaffoldの順となった。この結果から間葉系細胞を移植することによる骨再生医療は持続的な成長因子が必要とされる移植床に限定されることになると思われる。Recipient側の骨組織欠損の病態(全身状態、年齢、母床条件等)により、hybird型人工骨に加える因子を組み替え、骨組織の必要性に応じて、scaffoldに培養上清のみを、または濃縮培養上清を、さらにhBMCを添加するなどが考えられた。

研究成果の概要(英文)：By the animal experiment of the skull defect model, that amount of ossification became the following order: scaffold,< supernatant +scaffold, <supernatant (10X) + scaffold, < hBMC+scaffold. From this result, we thought that the bone regeneration therapy by using mesenchymal cells would be limited to the bone defect for which the continuous growth factors were needed. According to the circumstances (a general status, age, base conditions, etc.) of the bone defect of recipient, it was suggested that we could select the hybrid type bone substitute, for example conditioned medium alone or a concentrated conditioned medium, further hBMC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：未分化間葉系細胞 凍結保存 再生医工学

1. 研究開始当初の背景

唇顎裂や唇顎口蓋裂の一貫治療として、顎裂部骨移植は不可欠な治療となっている。手術時期は(5~6歳)から成人年齢(20歳前後)と広い年齢層に及び、またこれらいずれの骨移植も移植骨の donor としては自家腸骨海綿骨が第一選択されているのが実状である。しかし移植時期が低年齢であったり、recipient の母床の悪条件下では骨吸収が進行し再度の骨移植が必要な場合など、donor としての腸骨に与える影響が大きく、採骨部の将来に及ぼす形態的・審美的影響は未知数である。そこで我々は腸骨採取の軽減の目的から採取された骨組織からの骨由来間葉系細胞(BMC)の分離・増殖・凍結保存法の確立【Shimakura Y, Yamazaki Y. : Journal of Craniofacial Surgery 14(1): 108-116, 2003】と、その長期に凍結保存された骨由来間葉系細胞(BMC)による再生医工学を用いたハイブリッド型人工骨の開発【Matsui A, Yamazaki Y,ら J Craniofac Surg. 19(3):693-700,2008. , Aoyagi K, Yamazaki Y, : J Craniofac Surg. 21(3):666-678,2010. , Takase T, Yamazaki Y : The Kitasato Medical Journal 40(2):122-128, 2010.】を行ってきた。その結果、唇顎裂や唇顎口蓋裂患者各自の骨由来間葉系幹細胞を長期に凍結保存させ、各患者の必要な時期に必要な量を donor site に侵襲を加えることなく骨由来間葉系細胞(BMC)によるハイブリッド型人工骨を準備し臨床に供することが可能な段階となるに至り、凍結保存骨由来間葉系細胞の細胞遺伝学的性状の安全確認として染色体数分析と染色体染色による核板バンドパターン変化を行い、特に異常を認めない結果を得ている。【平成14-15年度】ヒト骨髄間葉系細胞からの骨芽細胞の分離・保存・増殖

法の確立と臨床展開の可能性 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費、基盤研究 C. 【平成16-17年度】凍結保存自己幹細胞(骨髄由来間葉系幹細胞)を用いたハイブリッド型人工骨の開発 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費、基盤研究C. 【平成18-19年度】凍結保存幹細胞(骨髄由来間葉系幹細胞)の継代培養時の変化とその安全性 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費、基盤研究C. また従来顎裂部骨移植年齢時に腸骨骨髄をDonorとすることなく出生時、口唇裂形成手術、口蓋裂形成手術時に得られるそれぞれ臍帯血から自己血清, scaffold (フィブリンネット: PPP), 成長因子(PRP), 骨芽細胞系間葉幹細胞を単離・長期凍結保存し、顎裂部骨移植年齢時に再構成骨組織を代替骨としての臨床展開可能性を検討した。臍帯血に関しては、医療技術の進歩に伴い、妊婦の胎児エコー検査により出生前に胎児の口唇裂・口蓋裂診断が可能となっている現在、本学でも術前診断に基づき紹介があり、年々増加傾向にある。胎児診断のご両親への形成外科的なケアは勿論であるが、出産時の臍帯血由来から自己血清, scaffold(フィブリンネット: PPP), 成長因子(PRP)を単離し、凍結保存後も有用であることを報告している【Baba K, Yamazaki Y, Ikemoto S, Aoyagi K, Takeda A, Uchinuma E: Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived autoserum. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 40 : 768-772,2012. Baba K, Yamazaki Y, Takeda A, Uchinuma E: Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 41:775-782,2013】. 【平成20-22年度】臍帯血由来間葉系幹細胞の凍結保存と唇顎

口蓋裂患者への臨床応用の可能性。文部科学省科学研究費，基盤研究C。また腸骨海綿骨に依存しない学童期での顎裂部骨移植が可能と考え口蓋骨・上顎骨に着眼した。口蓋骨・上顎骨は口唇裂・口蓋裂治療で行われる従来の手術時に過剰な侵襲を患者に与えることなく採取でき、骨形成を得たい顎裂部と解剖学的に隣接している部位である。そこで口蓋骨・上顎骨がBMC供給源として可能か否か、また自己血清の代替として無血清培地が適切か否か等を検討した。その結果、上顎骨由来のhBMCは有用でありまた無血清培地も臨床展開可能と判断した【Ishiguro M, Yamazaki Y, Baba K, Kumazawa K, Sugimoto T, Takeda A, Uchinuma E: Assessment of the Osteogenic Potential of Maxilla-Derived Mesenchymal Stromal Cells and the Utilization of Serum-Free Medium for Culture Thereof. The Kitasato Medical Journal 44:84-94, 2014】

【平成 23-25 年度】再生医工学を用いた腸骨海綿骨非依存型顎裂部骨移植の臨床展開の可能性について。

文部科学省科学研究費助成金事業 基盤研究 C。しかしこれまで種々病態が異なる顎顔面の骨欠損に対してどのようなタイプの再生代替骨が適切か検討されてこなかった。そこで今回は顎顔面骨欠損(顎裂部骨欠損を含む)に対して適材適所な代替骨の選択基準を検討する。

2. 研究の目的

提供された骨組織(腸骨および顎骨)・骨髄血(腸骨)を無血清培地で初代培養し得られた間葉系細胞(hBMC)を凍結保存、研究に併せて解凍後、その間葉系細胞および培養上清を使用し以下の項目を検討した。

尚、検体の提供に関しては、当大学の倫理委員会で承認を得、個人情報、安全性確保等には特に配慮して行なった。

- (1)凍結保存間葉系細胞の安全性を確認。
・形態学的検索と異常遺伝子発現検索
- (2)凍結保存間葉系細胞の間葉系細胞と培養上清を分離。それぞれ生物科学的活性と骨形成能の比較確認(in vitro, in vivo)。
- (3) Scaffold(hydroxyapatite etc)、hBMC の培養上清 + scaffold、hBMCの上清(10X)+scaffold、hBMC + scaffold をそれぞれ頭蓋骨欠損モデルで骨形成能比較(in vivo)。
- (4)顎顔面骨欠損に対して適材適所な代替骨の選択基準作成。

3. 研究の方法

- (1)凍結保存骨組織由来間葉系細胞の安全性(凍結保存期間は6 か月間)

【方法】10年以上-80 で凍結保存した腸骨由来間葉系細胞70検体のうち無作為に選んだ9検体を対象とした。凍結保存ヒト骨組織由来間葉系細胞を再培養し、G-band法による染色体検査、アレイ化CGH法による遺伝子検査を行った。

real-timePCRによるhTERT遺伝子の異常発現を確認した。さらにin vivoではHybrid型人工骨を作成しマウス背部皮下に検体を移植し、6ヶ月後腫瘍化の有無を確認した

- (2)骨組織由来間葉系細胞の凍結保存間葉系細胞を無血清培養により再培養し間葉系細胞と培養上清を分離。それぞれ生物科学的活性と骨形成能の比較確認(in vitro, in vivo)。

【方法】in vitro：培養上清の成長因子測定としてIGF-1, VEGF, HGF等をエライザー法で行なった。in vivo：動物頭蓋骨欠損モデル(ヌ-ドラット)に移植し、骨形成を組織学的に検討した。Scaffold はコーゲンアパタイト(Refit)を使用した。

(3) Scaffold(hydroxyapatite etc)、hBMCの培養上清 + scaffold、hBMC + scaffold、hBMCの培養上清 + hBMC + scaffoldをそれぞれ頭蓋骨欠損モデルで骨形成能比較(in vivo).

【方法】 in vivo : Scaffold はコラーゲンアパタイト(Refit)を使用した。

scaffold、hBMCの上清 + scaffold、hBMCの上清(10X) + scaffold、hBMC + scaffoldをそれぞれ動物頭蓋骨欠損モデル(ヌ - ドラット)に移植し、骨形成を組織学的に検討した。

(4) 顎顔面骨欠損に対して適材適所な代替骨の選択基準作成

4 . 研究成果

(1)凍結保存骨組織由来間葉系細胞の安全性 :

臨床応用するにおいてはその安全性を確認することが重要である。安全性評価としG-band法とCGH法による評価とhTERT遺伝子の発現の有無及びin vivo動物実験において移植6ヶ月後の代替骨に異常な組織増殖や腫瘍化像の確認を行ない、明らかな造腫瘍性は認められなかったが、一方でG-band法による染色体形態検査とCGH法による染色体異常検査において同一の1症例に異常所見を認めた。このことは骨形成等、臨床的に優位な間葉系細胞でも臨床に使用する前段階であらかじめ検体ごとにG-band法による染色体形態検査とCGH法による染色体異常検査が最低限必要と考えられた。

(2)間葉系細胞と培養上清を分離。それぞれ生物科学的活性と骨形成能の比較確認 :

【in vitro】成長因子の発現はIGF-1は検出されなかったが、VEGF、HGFは検出された。10倍濃縮において高い値が検出された。【in vivo】コントロールにおいては欠損部が残存し、明らかな骨形成を認めなかった。また培養上清(濃縮なし)では

一部骨形成を認めるが骨欠損部が残存していた。さらに10倍濃縮培養上清においては欠損部が新生骨により満たされていた。この結果から凍結保存された骨組織由来間葉系細胞の培養上清によっても骨形成が確認され、また培養上清の濃縮が骨形成を増強することが示唆された。間葉系細胞を移植することなしに骨再生医療が可能であれば、間葉系細胞の腫瘍化の懸念が払拭され、再生医療の安全性をさらに担保することになると考えられた。

(3)各種Hybrid型人工骨の頭蓋骨欠損モデルで骨形成能比較 :

骨形成量はscaffold、hBMCの上清 + scaffold、hBMCの上清(10X) + scaffold、hBMC + scaffoldの順となった。この結果から間葉系細胞を移植することによる骨再生医療は持続的な成長因子が必要とされる移植床に限定されることになると考えられた。

(4)代替骨の選択基準作成 :

Recipient側の骨組織欠損の病態(全身状態、年齢、母床条件等)により、hybird型人工骨に加える因子を組み替え、骨組織の必要性に応じて、scaffoldに培養上清のみを、または濃縮培養上清を、さらにhBMCを添加するなどが考えられた。

また今後の課題として培養上清には明らかに骨形成能が認められたことから、さらに精査し既知の成長因子以外の要素(エクソソームなど)の関与も検討すべきと思われた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Keiichi Parka, Hideki Amano, Yoshiya Ito, Shinya Kashiwagi, Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Masabumi Shibuya, Hidero Kitasato, Masataka Majima : Vascular endothelial growth factor

receptor-1 (VEGFR-1) signaling enhances angiogenesis in a surgical sponge model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 78:140-149, 2016. 査読有り

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.005>

山崎安晴、武田 啓：凍結保存自家骨組織由来間葉系細胞の意義 北里医学 45: 11-20, 2015. 査読有

<http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KI45-1/KI45-1p011-020.pdf>

[学会発表](計14件)

山崎 安晴、鬼塚 理、杉本孝之、熊澤憲一、杉本佳香、馬場香子、曾根由美子、岩田隆紀、武田 啓：骨組織由来間葉系細胞の多分化能は顎骨組織と腸骨組織では違うか？第16回日本再生医療学会総会 2017年 03月07日-09日 仙台国際センター 宮城

鬼塚 理、山崎安晴、杉本孝之、曾根由美子、武田 啓、朴 聖俊、中井謙太、岩田隆紀¹、大和雅之¹、岡野光夫：腸骨・顎骨組織由来間葉系幹細胞に対する網羅的遺伝子発現解析による検討。第16回日本再生医療学会総会 2017年 03月07日-09日 仙台国際センター 宮城

杉本佳香、杉本孝之、山崎安晴、熊澤憲一、曾根由美子、武田啓：骨組織再生医療における骨組織由来間葉系細胞とその培養上清の使い分け長期凍結保存された骨組織由来間葉系細胞の特性 第25回日本形成外科学会基礎学術集会 2016年09月15日～16日 ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター 大阪
馬場香子、山崎安晴、曾根由美子、熊澤憲一、杉本孝之、石黒匡史、武田啓：凍結保存後臍帯由来間葉系細胞の骨形成能と安全性(第2報) 第25回日本形成外科

学会基礎学術集会 2016年09月15日～16日 ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター 大阪

Yasuharu Yamazaki、Takayuki Sugimoto、Yumiko Sone、Akira Takeda：

Availability of conditioned medium from human autologous bone-derived mesenchymal cells. -Experimental study- The 10th World Biomaterials Congress, May 17-22, 2016. the Montreal Convention Center Canada

Takayuki Sugimoto、Yasuharu Yamazaki、Kenichi Kumazawa、Yumiko Sone、Akira Takeda：Cytogenetic safety of hBT-MSCs after long-term cryopreservation. The 10th World Biomaterials Congress, May 17-22, 2016. the Montreal Convention Center Canada

熊澤憲一、山崎安晴、杉本孝之、馬場香子、曾根由美子、武田 啓：骨組織由来間葉系細胞の生物学的検討。第15回日本再生医療学会総会 2016年03月17日～19日 大阪国際会議場 大阪

杉本孝之、山崎安晴、熊澤憲一、曾根由美子、武田 啓：凍結保存されたヒト骨組織由来間葉系細胞の培養上清による骨形成能 2016年03月17日～19日 大阪国際会議場 大阪

馬場香子、山崎安晴、曾根由美子、熊澤憲一、杉本孝之、石黒匡史、武田啓：凍結保存臍帯由来間葉系細胞の骨形成能の検討 2016年03月17日～19日 大阪国際会議場 大阪

山崎安晴、武田啓：凍結保存自家骨組織由来間葉系細胞の意義。第24回日本形成外科学会基礎学術集会 2015年10月08日～09日 岩手県民会館 岩手

馬場香子、熊澤憲一、杉本孝之、曾根由美子、山崎安晴、武田啓：凍結保存後臍帯由来間葉系細胞の安全性の検討。2015年

10月08日～09日 岩手県民会館 岩手
杉本孝之、山崎安晴、曾根由美子、熊澤憲一、武田啓：長期凍結保存された ヒト骨組織由来間葉系細胞の安全性. 第14回日本再生医療学会総会 2015年03月19日～21日 パシフィコ横浜 神奈川県
馬場香子、山崎安晴、熊澤憲一、杉本孝之、曾根由美子、武田啓：凍結保存後臍帯由来間葉系細胞の検討. 第14回日本再生医療学会総会 2015年03月19日～21日 パシフィコ横浜 神奈川県
熊澤憲一、山崎安晴、杉本孝之、武田啓：長期間凍結保存されたヒト骨組織由来間葉系細胞の安全性. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会 2014年10月09日～10日 長野県松本文化会館 長野

[図書](計1件)

Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: Bone regeneration using Wharton's Jelly mesenchymal stem cells. Perinatal Stem Cells Editor: Antony Atal, Springer Publishers, 2014, 373(299-311)
DOI 10.1007/978-1-4939-1118-9_27,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 安晴 (YAMAZAKI, Yasuharu)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：00210401

(2) 研究分担者

武田 啓 (TAKEDA, Akira)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：20197297

杉本 孝之 (SUGIMOTO, Takayuki)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：20365133

熊澤 憲一 (KUMAZAWA, Kenichi)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60383618

馬場 香子 (BABA, Kyoko)

北里大学・医学部・特別研修生

研究者番号：90327411