

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463057

研究課題名(和文)濃縮血小板フィブリンと脂肪由来幹細胞分泌タンパクを用いた骨再生

研究課題名(英文) Bone regeneration using condensing platelet fibrin gel and adipose-derived stem cells conditioned medium

研究代表者

伊藤 秀寿 (ITO, HIDETOSHI)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：80384303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、効率的な骨再生を目的として、自己血液由来濃縮血小板フィブリンゲル(CGF)と脂肪由来幹細胞分泌タンパク(ADSCs-CM)を用いた新しい治療法の検討を行った。CGFは、培養実験において血管の伸長する効果が確認された。生体内では移植後4週以内で分解し、その際、マクロファージ、新生血管を誘導して、再生環境の構築に関与できることが分かった。一方、機械的強度としては延性に優れ、様々な場面で臨床応用が可能であると思われた。ADSCs-CMは、成長因子であるPDGF-AA、VEGF、HGF、TGF- β 1が含まれており、特に血管新生に関連するVEGFの他、HGF、TGF- β 1が多いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research is to investigate the effect to bone regeneration of condensing platelet fibrin gel derived from autologous blood (Concentrated Growth Factors: CGF) and adipose-derived stem cells conditioned medium(ADSCs-CM). In culture examination, the behavior of angiogenesis of CGF was confirmed. The CGF implanted subcutaneously in rabbit back was disappeared before 4 weeks after implantation. In process of disappearance, many macrophages and newly formed vessels was seen around the CGF. The compressed and membranous CGF showed excellent mechanical properties characterized by high ductility with wide clinical application. The ADSCs-CM contained PDGF, VEGF, HGF, and TGF- β 1, which are known to be necessary for tissue regeneration. This medium contained a high level of VEGF, HGF and TGF- β 1.

研究分野：口腔外科学

キーワード：再生 骨 脂肪幹細胞抽出蛋白

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において、腫瘍や嚢胞の摘出後や抜歯後の歯槽骨、加齢に伴う顎骨萎縮などの状況に対して、歯を支える骨の再生は重要な課題であり、より多くの骨を迅速に再生させる方法についてはまだ改善が期待されている。これまで骨再生治療においては、競合組織の侵入を防ぐ人工被膜の応用や骨補填材の開発が行われてきたが、現在では細胞増殖因子、スキャホールド、間葉系幹細胞の遊走を期待するだけでなく、外来性の多分化能幹細胞の導入も試みられるようになった。しかし、成長因子の場合は、大量の薬剤が必要であり、また徐放によって長くとどまる必要があること、薬剤自体が扱いにくいだけでなく、為害性の問題があることに加え、まだ高価なことが問題としてあり、広く臨床応用できるような状況には至っていない。簡単に手に入り、効果の時間的な制御が可能で、扱いやすい材料の開発が望まれている。以上の問題を解決するために、本研究では、近年、開発され臨床でも使用されている自己血由来の濃縮血小板フィブリンゲル (Platelet-Rich Fibrin: PRF および Concentrated Growth Factors: CFG) と脂肪由来幹細胞分泌蛋白 (Adipose-Derived Stem cells Conditioned Medium: ADSCs-CM) を用いた新しい骨再生法の検討を行うことを目的としている。今回、PRF ではなく、製造方法は少し異なるが成分がほとんど同じであるとされる CGF を用いた。CGF は、スキャホールドおよび徐放材料として用い、成長因子を含有するといわれる ADSCs-CM を含ませて利用すること目的として研究の提案を行った。

2. 研究の目的

背景で述べた通り、CGF はすでに様々な臨床で利用されている。自己血由来であることから異物反応を示さず、良好な治癒、再生があることが知られている。特に血液成分であることから血管の誘導に関連する成分があ

るといわれ、種々の再生への効果が期待されている。また成形性に優れ、一定の強度を有する膜状構造にすることができることから潰瘍面などの被膜材料として利用されている。しかし CGF については、生体内での分解挙動が明らかになっておらず、また実際に含まれている成分とその成分の生体内での効果も明らかになっていない。一方、ADSCs-CM も幹細胞が分泌する蛋白質で、様々な成長因子が含まれているといわれているが、実際に各組織での再生に必要な成分があるか分かっていない。さらにはこれらを複合的に用いる技術も確立できていなかったため、本研究において、各材料の成分の分析と生体内での挙動を確認し、両方を用いた動物実験を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)CGF の生体内分解挙動試験

スキャホールドとしての操作性また徐放材料としての分解挙動、さらには含有成分による再生効果について検討した。ウサギに全身麻酔をかけ、耳静脈または耳動脈から血液を採取し、専用の遠心機で CGF を作製した。背部皮膚を切開し、皮筋深部に空隙を作製して、CGF そのままのもの、膜状に圧接した CGF を移植した (図 1)。



図 1 . ウサギ皮下に移植しているところ

Sham-ope として空隙のみを作製した。移植後、1、2、3、4 週後に過剰麻酔にて屠殺し、移植部を切り出し、パラフィン包埋標本作製した。薄切標本はヘマトキシリンエオジン染色、エラスティカマッソン染色、また免疫組織化学染色として、C31 抗体、RAM-11 抗体による細胞同定と計測を行った。

(2)CGF の in vitro 血管誘導能試験

CGF の血管誘導能効果を確認するため、ウサギで採取された血液から調整した CGF を線維芽細胞、血管内皮細胞の層化、共培養系に入れ、滲出する成分による血管の伸長、血管腔構築について確認を行った(図2)。

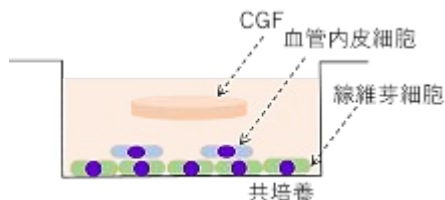


図2 CGF の血管新生効果を確認するための共培養方法

(3)膜状 CGF の機械的特性

CGF の機械的特性を確認するために、ウサギから採取された血液より作製した CGF の膜状ものを、13×11mm に成形し、両端に縫合糸をかけて、引張試験機にて強度と延性について確認を行った。

(4)ADSCs-CM の成分分析

ADSCs-CM の成分の分析を行うため、顆粒状の ADSCs-CM を生食水に溶かして、ELIZA にて、成分分析を行った。成分分析は、PDGF-AA、VEGF、FGF-2、HGF、TGF-1、IGF-BP1 などの成長因子についての、有無と濃度を調査した。

(5)動物埋植実験

ウサギの全身麻酔下にて、頭蓋部にキシロカインによる局所麻酔を行った。皮膚正中切開を行って骨面を露出させた後、トレフィンパーにて脳硬膜を露出する骨欠損を作製した。CGF および CGF に ADSCs-CM を混入して欠損部に移植した。移植後、2 週で過剰麻酔にて屠殺し、実験部の観察を行った。

4. 研究成果

(1) CGF の生体内分解挙動試験

CGF はそのままのもの、膜状に圧接したものいずれも生体内で分解した。CGF は HE 染色で好酸性物質としてみられ、はじめに周

辺に炎症性細胞が集まり、図3のように辺縁から細胞が侵入して、樹枝状に分解を進めた。一部には赤血球を入れた小腔がみられ、血管の侵入と思われた。観察期間で、周囲に癆痕様の組織の形成は確認されなかった。

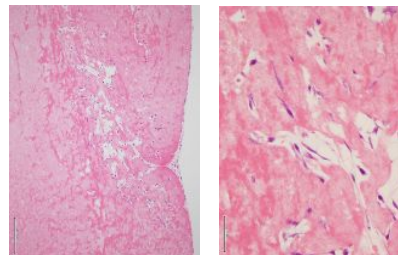


図3 左:移植したCGFの辺縁部中拡大像。辺縁部に樹枝状の分解領域がみえる。右:左図の拡大像。樹枝状空隙に細胞の侵入が確認された。

CGF は、いずれも3週までにほとんど分解された(図4)。図4のように1週では周囲との境界が明瞭であったが、2週では周囲の肉芽組織が形成され、CGF と密着していた。徐々に周囲から細胞の侵入を伴って分解が進行し、4週では少量の線維性組織を残して分解した。

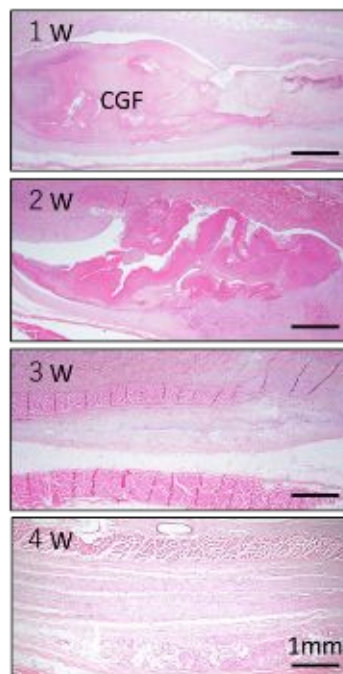


図4 CGF の分解過程を示す。1週で好酸性のCGFが確認されたが、4週ではほとんど確認ができなかった。

同じ標本を用いて、血管とマクロファージの染色を行い、出現数についての計測を行った。図5は、計測結果である。図5の上図がマクロファージで sham ope に比べ、そのままの CGF (untreated) と膜状に圧接した CGF (compressed) で、マクロファージの遊走の増加がみられた。CGF では2週に誘導のピークがみられ、初期の分解に関与すると思われた。また下図は血管数の変化を示し、sham ope に比べ CGF が血管を誘導した。少し残留期間の長い compressed CGF が長期に血管を誘導した。

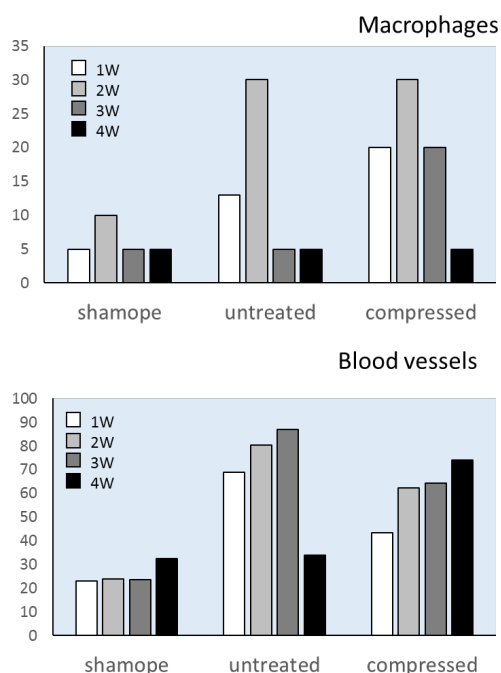


図5 免疫組織化学染色での、マクロファージおよび血管の誘導数の経時変化。Untreated : そのままの CGF、compressed : 圧接、膜状の CGF。

(2)CGF の in vitro 血管誘導能試験

CGF を入れた共培養系で血管新生効果が確認された (図6)。VEGF と同様の成長因子を有すると思われた。

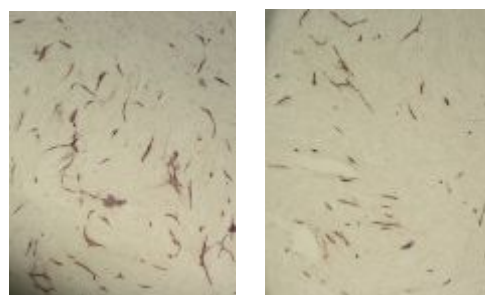


図6 共培養試験での新生血管。左 : CGF + VEGF、右 : CGF のみ。

(3)膜状 CGF の機械的特性

膜状 CGF は引っ張り試験にて、平均 0.37 N で破断したが、延性に優れ、約 200% の伸びを示した。成形性があり、様々な形状に適應できると考えられた。対照群として市販人工被膜を使用した。人工被膜は強度に優位性があるが延性がなく、扱いにくいと思われた。

(4)ADSCs-CM の成分分析

ADSCs-CM 溶液(80ug/ml)の成分分析では、PDGF-AA、VEGF、FGF-2、HGF、TGF-1、IGF-BP1、が含まれていた。種々の再生、特に血管新生に関連する成長因子である VEGF (約 100pg/ml)、TGF- 1 (約 200pg/ml)、HGF (約 2000pg/ml) を含んでいることが確認された。

(5)動物埋植実験

予備実験にて動物実験を行ったが、既存組織および競合組織の侵入により移植材料の効果を客観的に判定することができなかった。実験モデルについて再検討する必要がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

刀根武士、清水良央、伊藤秀寿、斎藤 悠、佐藤 工、及川麻里子、高橋 哲、熊本裕行、

ウサギ CGF における生体内作用の病理組織学および組織形態学的検討、第 19 回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会、2015 年 11 月 28 日、横須賀市

刀根武士、清水良央、齋藤 悠、及川麻里子、伊藤秀寿、高橋 哲、熊本裕行、自己血由来フィブリンゲル(CGF)の生体内分解挙動と組織反応、第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2015 年 5 月 13 日、大阪市

刀根 武士、清水 良央、齋藤 悠、及川 麻里子、高橋 哲、熊本 裕行、完全自己血由来フィブリンゲル (C G F) の生体内分解挙動と組織反応、第 59 回 (公 社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、2014 年 10 月 17 日、千葉市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 秀寿 (ITO, HIDETOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常
勤講師

研究者番号：80384303

(2) 研究分担者

清水 良央 (SHIMIZU, YOSHINAKA)

東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30302152

三木 康宏 (MIKI, YASUHIRO)

東北大学・国際災害科学研究所・講師
研究者番号：50451521

熊本 裕行 (KUMAMOTO, HIROYUKI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70215028

(3) 連携研究者

福岡 大太郎 (FUKUOKA, HIROTAROU)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常
勤講師

研究者番号：30568746

(4) 研究協力者

特になし