

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861680

研究課題名(和文)ラット下顎骨顎裂モデルを用いた骨芽細胞シートの顎骨再生に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Maxillofacial bone regeneration with osteogenic matrix cell sheets: An experimental study in rats

研究代表者

前田 雅彦(Masahiko, Maeda)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80453166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット骨髄由来間葉系細胞より細胞シートを作製した。ラット下顎骨顎裂部への移植実験を行い、本移植方法による顎骨再生の有用性を確認した。次に、ヒト骨髄由来間葉系細胞より細胞シートを作製し、免疫不全ラットの下顎骨顎裂部への移植実験を行ったが、骨形成は明らかではなかった。免疫不全ラットの背部皮下で移植実験を行ったところ、細胞シートを人工骨と複合化させて移植を行った群で、限定的ではあったが骨形成を確認した。ヒト骨髄由来間葉系細胞による細胞シート単独移植での骨形成は困難であったが、人工骨と複合化させ移植を行うことで、ヒト骨髄由来間葉系細胞による骨再生のヒト臨床応用の可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Cell sheets prepared from rat bone marrow-derived stromal cells were implanted into the rat mandibular symphysis; the results indicated the usefulness of maxillofacial bone regeneration. Next, cell sheets prepared from human bone marrow-derived stromal cells were implanted into the mandibular symphysis of immunodeficient rats; however, bone formation was not clear. Then, we subcutaneously implanted artificial bone into the immunodeficient rats. Although the therapeutic effect was limited, we confirmed the osteogenic capacity of these cell sheets. Thus, we gained insights into developing new approaches for maxillofacial regeneration using cell sheets from human bone marrow-derived stromal cells and artificial bone.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞シート ヒト間葉系幹細胞 顎骨欠損

### 1. 研究開始当初の背景

顎骨は咀嚼機能、審美的機能、構音機能を担う重要な器官で、その実質欠損は患者のQOLの著しい低下に直結する。しかし、顎骨の病的欠損例は多く、腫瘍性疾患（悪性・良性腫瘍）、顎裂・口蓋裂などの先天性疾患、骨髄炎や顎骨壊死などにより、時に広範囲の欠損が生じる。治療法としては、自家骨移植療法が第一選択となるが、採取量の限界と採取部位への侵襲が大きな課題点である。これを克服するために組織工学を応用した自己幹細胞移植の臨床応用研究が国内において進んでいる。

研究協力者である大串始（産業技術総合研究所 招聘研究員）は骨髄由来間葉系細胞を人工骨に播種し骨芽細胞へ分化させた「培養骨」が、生体内で優れた骨形成能を発現することを利用し、2001年より本学整形外科講座にて臨床応用研究を行った（Morishita T., et al, Artif. Organs, 2006）。

研究協力者である柳生貴裕は、顎骨領域における「培養骨移植」の有効性・安全性を解明するため、ラットを利用した基礎的動物実験を実施した（Yagyuu T., et al, J Tissue Eng Regen Med, 2012）。この動物実験によって、培養骨の顎骨再生への有効性が明らかとなり、2010年より「顎骨嚢胞摘出後の骨欠損を対象とした自己骨髄培養細胞由来再生培養骨の有用性を検証する研究」という課題で臨床研究を開始し、有用性・安全性を解明している。しかしながら、「人工材料を含まない自己細胞のみの移植材料」が安全性において理想的であり開発が必要である。

研究協力者である赤羽学（奈良県立医科大学健康政策医学講座 准教授）は、スキャフォールドフリーの細胞シートをラット間葉系細胞において開発した（Akahane M., et al, J Tissue Eng Regen Med, 2008）。細胞シートは、操作性に富み均一な細胞密度を確保可能であり、人工材料を含まない自己細胞のみの移植が可能である。この細胞シートによる顎骨再生能の有効性・安全性が証明されれば、今後の顎骨再生医療の更なる安全性の向上に直結すると確信する。

### 2. 研究の目的

本研究は、種々の原因により頭頸部における上・下顎骨の病的実質欠損に対する組織工学的手法である。細胞シートを使用した顎骨再生治療法の開発を目的とし、臨床研究課題申請のための基礎的研究に位置する。

細胞シートはスキャフォールドフリー移植材料として有用だが、新分野のための研究報告が乏しく、以下について明らかにする。顎骨再生の基礎的動物実験として、ラット下顎骨顎裂モデルの有用性の検証、ヒト骨髄由来間葉系細胞より作製した細胞シートの顎骨再生能の有無、細胞シートの顎骨欠損治療に対する有効性と安全性の検証。

実験はラットを用いた動物実験を主軸と

する。移植利用細胞としてラットおよびヒト由来細胞について検討する。さらに、従来では主にビーグル犬を利用していた顎骨再生研究領域において、新たにラット下顎骨顎裂モデルを作製し、代替動物実験としての有用性についても検証する。

### 3. 研究の方法

#### A. ラット間葉系細胞由来細胞シートの下顎骨顎裂モデルへの移植実験

免疫抑制剤の使用を避けるため、移植実験に際して近交系 Fisher344 ラット (F344rat) を使用した。分離したラット間葉系細胞より作製した細胞シートを、ラット下顎骨顎裂部へ移植した。移植実験は全身麻酔で行い、オトガイ部より切開を加え、下顎骨正中中部周囲を明示し、顎裂部周囲の介在組織を丁寧に除去し細胞シートを貼り付けた。移植後、切開部を縫合し移植実験を終了とした。移植後エンドポイントを設定し下顎骨を摘出後、画像解析（マイクロCT）組織学的評価を行った。

#### B. ヒト骨髄由来間葉系細胞による細胞シート作製と性能評価

ヒト骨髄由来間葉系細胞の培養条件は、村木らの報告（Muraki K., et al, Tissue Eng, 2006）を参考とし、基本培地を15%FBS添加MEM-とした。骨芽細胞分化誘導培地としてアスコルビン酸、デキサメタゾンを追加することとして、添加因子の濃度、培養期間を検討し、最適化を図った。

#### C. 免疫不全ラット下顎骨顎裂モデルへのヒト細胞シート移植実験

培養条件を最適化したヒト細胞シートによる、免疫不全ラット下顎骨顎裂部への移植実験を行った。感染予防を特に注意し、エンドポイントを8週として、下顎骨を摘出し評価を行った。

### 4. 研究成果

#### A. ラット間葉系細胞由来細胞シートの下顎骨顎裂モデルへの移植実験

ラット骨髄より間葉系細胞を採取し増殖させ、10nM デキサメタゾン、82µg/mL アスコルビン酸を添加した培地で14日間培養し、コンフルエントとなった後にセルスクレーパーを使用して細胞を周囲より物理的に剥がし、シート状に採取した（細胞シート）。

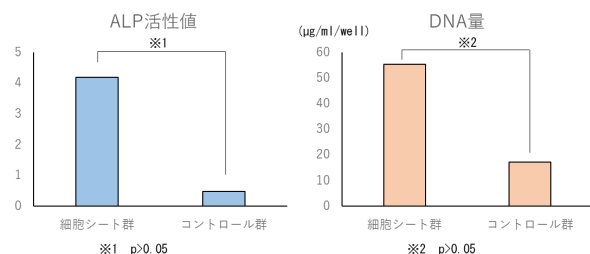


図1 ALP活性値とDNA量

添加因子なしで培養した細胞（コントロール）と比較し、骨分化能の評価を行った。ALP 活性、DNA 量を比較した結果、細胞シートはいずれの評価においても有意に高い値を示した（図 1）。

細胞シートをパラフィン包埋して組織切片を作製し、HE 染色を行ったところ、シート中には 2~3 層に重なった細胞が認められた。コントロールでは単層の細胞が認められるのみであった（図 2）。

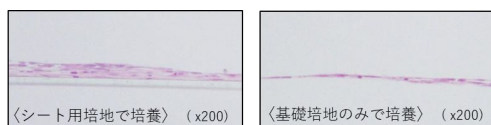


図2 細胞シートのHE染色

ラット細胞シートをラット下顎骨顎裂部へ移植し、8 週後に画像解析を行ったところ、移植群では旺盛な骨形成が認められ、左右の顎骨が癒合していたが、手術操作のみのコントロール群では骨形成がみられなかった（図 3）。

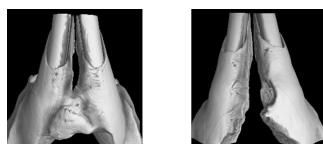


図3 細胞シート移植後のマイクロCT像

#### B. ヒト骨髄由来間葉系細胞による細胞シート作製と性能評価

ヒト骨髄由来間葉系細胞に添加因子を加えた培地で培養し、細胞シートを作製した。添加因子の濃度と培養日数を調整することで、ALP 活性、シートとしての強さ、しなやかさを確認し、最適と考えられる条件を設定した（デキサメタゾン：100nM、アスコルビン酸：20.5µg/ml、培養日数：10 日）。

#### C. 免疫不全ラット下顎骨顎裂モデルへのヒト細胞シート移植実験

上記条件により作製したヒト骨髄由来間葉系細胞による細胞シートを折りたたみ、塊状として免疫不全ラットの下顎骨顎裂部に移植した。レシピエントラットは F344/NJcl-rnu/rnu を使用した。

移植後 8 週目で顎骨を摘出し、マイクロ CT による画像解析を行ったが、骨形成は確認できなかった（図 4）。

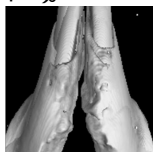


図4 ヒト細胞シート移植後のマイクロCT像

#### ・追加実験

上記実験を行い、当初予想していた結果が得られなかったため、免疫不全ラットを使用

し、背部皮下に移植を行うことでヒト骨髄由来間葉系細胞による細胞シートの骨形成能を再度確認した。細胞シートを人工骨と複合化した群ではわずかな骨形成が認められた。本研究ではスキャホールドフリー移植材料として細胞シートに焦点を当て、実験を行った。ラット細胞によるラットへの移植実験では、細胞シート単独移植による骨形成が確認できたが、ヒト細胞では同様の結果は得られなかった。細胞のみでの骨形成には限界があるため、スキャホールドとしての人工骨が移植の際には重要であることが予想される。より十分な骨形成を得るため、今後は細胞シートと人工骨の配分や人工骨の種類、培養骨との比較などが必要であると考えられる。

#### 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)

Ueyama Y, O Yagyuu T, Maeda M, et al. Maxillofacial bone regeneration with osteogenic matrix cell sheets: An experimental study in rats. Arch Oral Biol. 査読有, 2016, 138-145. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.017. Epub 2016 Aug 18.

〔学会発表〕(計 6 件)

「非破壊的測定法による培養骨搭載純チタンにおける移植前石灰化状態と新生骨形成との関連性評価」前田雅彦、上山善弘、今田光彦、大串始、桐田忠昭 第 14 回日本再生医療学会総会 2015 年 3 月 19-21 日 パシフィコ横浜

「培養骨搭載純チタン表面における移植前石灰化状態と新生骨形成との関連性評価」前田雅彦、上山善弘、今田光彦、大串始、桐田忠昭 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月 9-10 日 京都テルサ

「顎顔面領域での骨欠損における骨形成細胞シートの有用性と骨化様式の検討」上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、今田光彦、桐田忠昭 第 69 回日本口腔科学会学術集会 2015 年 5 月 14 日 大阪国際会議場

「骨形成細胞シート移植における顎骨領域の骨形成能の検討」上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、今田光彦、桐田忠昭 第 14 回日本再生医療学会総会 2015 年 3 月 19-21 日 パシフィコ横浜

「自己骨髄由来再生培養骨による顎骨骨欠損の再生 - 臨床研究結果報告 - 」上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、今田光彦、仲川雅人、桐田忠昭

「Osteogenic potential of the osteogenic matrix cell sheets in maxillofacial regeneration」Yoshihiro Ueyama, Takahiro Yagyuu, Masahiko Maeda, Mitsuhiko Imada, Tadaaki Kirita 2017 conference 2017 年 10 月 24-28 日 シドニー

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

前田 雅彦 (MAEDA, Masahiko)  
奈良県立医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：80453166

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

桐田 忠昭 (KIRITA, Tadaaki)  
柳生 貴裕 (YAGYUU, Takahiro)  
大串 始 (OHGUSHI, Hajime)  
赤羽 学 (AKAHANE, Manabu)  
上山 善弘 (UEYAMA, Yoshihiro)  
今田 光彦 (IMADA, Mitsuhiro)