

# 学位論文要旨

氏名 熊澤 憲一



論文題目

「Osteogenic Potential, Multipotency, and Cytogenetic Safety of Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells (hBT-MSCs) after long-term Cryopreservation.」

(長期凍結保存されたヒト骨組織由来間葉系細胞における多分化能・骨形成能と安全性)

指導教授承認印

内沼栄樹 

Osteogenic Potential, Multipotency, and Cytogenetic Safety of Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells (hBT-MSCs) after long-term Cryopreservation.

(長期凍結保存されたヒト骨組織由来間葉系細胞における多分化能・骨形成能と安全性)

氏名：熊澤憲一

唇顎口蓋裂患者は顎裂部骨移植年齢以前にも初回口唇裂形成手術や口蓋裂形成手術の加療がある。術野に隣接した骨組織より自己骨組織由来間葉系細胞を単離・長期凍結保存し、顎裂部骨移植時に凍結保存されたその間葉系細胞を培養増殖させ移植骨に用いることができれば、患者に対する負担を軽減できる可能性がある。しかし自己ヒト骨組織由来間葉系細胞(human Bone Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells: hBT-MSCs)を臨床応用していくためには、10年以上の凍結保存が必要になる。本研究では、当科にて10年以上凍結保存されたhBT-MSCsを解凍し培養を行い、*in vitro*と*in vivo*での評価を行った

*in vitro*の評価として、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、カルシウム(Ca)産生能の評価を行った。骨分化誘導後、1週後、2週後、3週後で検体を採取し student's T-test で統計学的に評価した。ALP活性は骨分化誘導群、非分化誘導群の双方で認められたが、1~3週後のすべてにおいて、骨分化誘導群が非分化誘導群に比べ、有意に高値であった(1週後:P=0.04 2週後:P=0.01 3週後:P=0.03。) Ca産生能は非分化誘導群では産生を認めなかったが、骨分化誘導群では、2週後と3週後にCa産生を認めた。Ca産生能評価はアリザリンレッドによる染色も行いCaの産生を確認できた。また、RT-PCRによるRunx-2, Osterix, Osteocarcineの発現を評価し、ウィルコクソン符号順位和検定による統計学的な評価を行った。

Runx-2は骨分化誘導群で1週後(P=0.008)と3週後(P=0.03)に有意に高い発現を認めた。Osterix, Osteocalcinは3週目で骨分化誘導群が有意に高い発現を認めた。(osterix:P=0.03,Osteocalcin:P=0.03)

ALP活性とCa産生能では、非骨分化誘導群でもALP活性の経時的な変化を示すことから保存された間葉系細胞の中には前骨芽細胞に類似した細胞が存在していることが示唆され、またこの細胞を骨分化誘導することでALPの活性が有意に上昇したことは、保存細胞が前骨芽細胞に分化したと考えられた。さらにCa産生能は骨分化誘導群でのみ認めたことから、凍結保存細胞の中には分化した前骨芽細胞はあまり含まれておらず、分化度の低い前骨芽細胞に類似した細胞が多いと思われた。Runx-2, Osterix, Osteocarcineの発現ではいずれも発現も骨誘導後3週目に有意に高く、これはhBT-MSCsは元来骨細胞に起源を持つ細胞群であることを意味し、前述の「前骨芽細胞に類似した細胞が多い」との推論と一致する結果である。

また多分化能評価のため脂肪分化誘導を行い、オイルレッド染色にて脂肪細胞への分化を確認した。これにより凍結保存されたhBT-MSCsに未分化な幹細胞が存在することも確認された。

*in vivo*での評価は動物実験を行い、解凍・再培養した凍結保存細胞を、骨分化誘導群と非骨分化誘導群とにわけて担体であるハイドロキシアパタイト(HA)のディスク上に播種し、ヌードマウス皮下に移植した。10週後に取り出し、HE染色とヒトオステオカルシン免疫染色による骨形成評価を行ったところ、骨の新生がみとめられ、また新生骨はヒトオステオカルシン陽性であった。非骨分化誘導群でも4例中1例で骨形成を認めたが、骨分化誘導群で、より多くの骨組織が産生されたことは、凍結保存骨組織由来細胞には未分化な細胞と、前骨芽細胞類似の細胞とが含まれ

ていることを裏付ける結果であると考えられた。

これらのことから、凍結保存細胞は10年以上経過していても、骨形成能、多分化能が維持されていることが確認できた。

また、長期間凍結保存された細胞を臨床に用いるには安全性評価が必要であり、染色体の形態検査、がん抑制遺伝子である p53 遺伝子の異常の有無とがん遺伝子の一つである myc 遺伝子の発現の評価を行った。形態学的検査は G-band 法を用いた。G-band 法は当科で10年以上凍結保存されている検体のうち無作為に選んだ8検体に対し行った。遺伝子検索は10年以上凍結保存された3検体に対して行った。これらの検査では異常は認められなかった。

これらのことより、初回手術時に得られた骨組織由来細胞を凍結保存、それを骨移植が必要な時期まで保存し、凍結保存細胞を移植骨として使用し、患者の負担を軽減できる可能性がある。さらに他の骨移植が必要になるような疾患においても骨採取の負担を軽減できる可能性があると考えられた。