

学位論文要旨

氏名 杉本 孝之



論文題目

「The Significance of Performing Osteogenic Differentiation
in Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells」

(ヒト骨組織由来間葉系細胞に対して骨分化誘導を行う意義)

指導教授承認印

内沼 学 樹

The Significance of Performing Osteogenic Differentiation in Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells

(ヒト骨組織由来間葉系細胞に対して骨分化誘導を行う意義)

氏名 杉本 孝之

<はじめに>

唇顎口蓋裂は、正常な咬合の獲得を重要な治療方針の一つとしている。このため、自家腸骨海绵骨移植が顎裂部の骨形成に対する一般的な治療であるが、骨が十分に採取できない症例などでは手術が複数回必要となる。

我々は、この侵襲を軽減する目的で骨移植時に donor として用いられる腸骨組織の余剰となった骨組織から、初代培養で out growth してくる間葉系細胞を cell source として基礎研究している。これまでに分離・増殖・凍結保存法を確立し、マウス背部皮下組織内で骨形成能の検討を行った。

今回は臨床応用に則した骨組織の場でこのヒト骨組織由来間葉系細胞がどのような骨形成を期待できるかを検討した。まずこの細胞が元来どの程度の骨細胞ポテンシャルを持つか、骨芽細胞マーカーを用い検討した。次にこの細胞が骨組織の場で移植前処置として骨分化誘導が必要か否かを検索した。

<対象・方法>

長期間-80℃で凍結保存した 11 検体、男性 6 例女性 5 例で平均 8.9 歳のものを使用した。

▼再培養と骨分化誘導

再培養後、一方は非分化誘導間葉系細胞群（非分化）とし、一方は骨分化誘導間葉系細胞群（骨分化）として培養を継続した。また細胞標識のため NEO-STEM™0.2mg/ml を移植 48 時間前に培地に付加した。

▼骨芽細胞マーカーの発現評価

runt-related gene 2(RunX 2), alkaline phosphatase(ALP), osterix, osteocalcin(OC), の発現を real-time RT-PCR にて測定した。

▼hydroxyapatite (HA) へのヒト骨組織由来間葉系細胞の播種

直径 5mm、厚さ 2mm、気孔率 85%の HA を足場とし、増殖させた細胞それぞれ 1×10^5 cells/30ul を HA に播種し、検体とした。

▼ヌードラットへの移植

8 週令のラット頭蓋骨の左右に 5mm の全層欠損を作成し、同部位に 9 検体の hybrid 型人工骨を移植した。また control として頭蓋骨欠損モデルを作成した。移植 8 週間後検体を摘出した。

▼マイクロ CT 撮影

▼組織学的・免疫組織化学的評価

HE 染色を行い光学顕微鏡で観察した。抗ヒト osteocalcin 抗体による免疫組織化学的染色を行い蛍光顕微鏡で観察したほか、NEO STEM™の発現も確認した。骨形成量は HE 染色検体を光学顕微鏡で観察し面積比を求めた。

<結果>

▼骨芽細胞マーカーの発現

ALP と Osterix が、骨分化が有意($P<0.05$)に高値であった。

▼マイクロ CT の結果

頭蓋骨欠損モデルには骨形成を認めなかった。hybrid 型人工骨移植部には骨形成を認めた。

▼組織学的・免疫組織化学的評価

HA 気孔内に明らかな骨新生を認めた。免疫組織化学染色では骨新生と同一部位に抗ヒト osteocalcin 抗体に陽性な細胞と NEO STEM™ の発現を認めた。これによりヒト由来細胞からの骨新生を確認した。HA 気孔内の骨組織はラット由来の骨組織とヒト由来骨組織が共存し骨欠損を閉鎖しており、骨分化ではヒト由来の形成領域が広がった。また骨形成量は骨分化が有意に高値であった。

<考察>

骨芽細胞マーカーの発現は、この細胞自身が 10 年以上たった状態でも骨細胞の特性を持った前骨芽細胞に類似した細胞であることが確認できた。骨分化において OC では有意差が得られなかったことは誘導期間が短く、より後期に上昇する OC での発現の差につながらなかったと考えられた。このことは、一般の骨細胞の発生過程と矛盾しない結果であり 10 年以上凍結保存された骨由来間葉系細胞においても同様に正常な分化過程を経ていることが推察された。

移植した Hybrid 型人工骨にはいずれにおいてもヒト由来骨細胞からの新生骨形成を認めた。我々は以前マウス背部皮下で、骨分化のみの骨形成を確認したが、本研究に於いて骨格の骨組織環境下では非分化の場合でも骨形成することが可能であると確認した。しかし骨分化のほうが骨形成量が優位に高いことから、骨組織由来間葉系細胞は移植前処置に骨分化した方が Hybrid 型人工骨として効果的であると考えられた。

一方今回の研究では骨組織領域の環境下では骨誘導しない場合でも骨形成は可能であることが確認できた。このことは顎裂部や骨嚢胞部などの骨組織に包囲される移植環境下では非分化の適応も推察される。移植細胞の安全性の観点からは移植細胞への人工的誘導は最小限にすべきことは明らかであり、移植をうける骨組織欠損の状況により使い分けが可能であることが示唆された。

<結論>

我々の cell source は倫理面、安全面で優れている自家組織であり、しかも 10 年以上の長期保存された骨組織由来間葉系細胞に於いても優れた骨形成能が確認できた。このことは臨床応用に展開可能な結果と結論付けられた。