

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 石黒 匡史



## 論 文 題 目

[Assessment of the Osteogenic Potential of Maxilla-Derived Mesenchymal Stromal Cells  
and the Utilization of Serum-Free Medium for Culture Thereof

(上顎骨由来間葉系細胞の骨形成能の評価および無血清培地の活用)

指 導 教 授 承 認 印

内 沼 栄 樹



# Assessment of the Osteogenic Potential of Maxilla-Derived Mesenchymal Stromal Cells and the Utilization of Serum-Free Medium for Culture Thereof

(上顎骨由来間葉系細胞の骨形成能の評価および無血清培地の活用)

氏名 石黒 匡史

## 1 序論

唇顎口蓋裂の治療のなかでも顎裂骨欠損部の骨形成は正常な咬合を獲得するための重要な治療である。従来、顎裂部骨形成のために顎裂部骨移植手術が行われている。donorは自家腸骨海绵骨が一般的であるが、複数回の骨移植が必要な症例もありその侵襲は軽くはない。当教室では骨移植の手術侵襲軽減を目的とし自家組織由来再生移植骨の開発を行ってきた。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る自家組織であるため、我々は上顎骨由来間葉系細胞 (MSCs) に着目した。さらに、安全な臨床応用にはウシ胎児血清 (FBS) 使用によるリスクを回避しなくてはならないと考えた。これらの背景のもと当研究は上顎骨由来 MSCs の骨形成能を検討し、加えて無血清培養下における骨形成能を検討した。

## 2 材料と方法

当研究は北里大学倫理委員会において承認のもと施行した。

### 2-1 検体と細胞培養

通常手術時に破棄される上顎骨余剰骨片が提供された。骨片から得られた上顎骨由来 MSCs は無血清培で培養し、3 継代目で骨分化誘導用無血清培地により骨芽細胞へ分化誘導した。対照として従来の FBS を用いた培養・分化誘導を行った検体を作成した。

### 2-2 *In vitro* study

骨芽細胞としての細胞活性をアルカリフォスファターゼ (ALP)、カルシウム、骨芽細胞マーカー (ALP, オステオカルシン; OC) で評価した。ALP は ALP 染色と活性の定量を行い、カルシウムはアリザリンレッド染色とカルシウム定量を行った。また、骨芽細胞マーカーは Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) にて発現を測定した。

### 2-3 *In vivo* study

MSCs をハイドロキシアパタイト (HA) ディスクを足場として播種し、この検体をヌードマウスに移植した。移植 8 週後に検体を摘出し HE 染色・免疫組織化学染色による組織学的評価と検体中に形成された骨組織面積の比較を行った。

### 2-4 統計処理

各群の比較には unpaired Student' s t-test 検定を行い有意差は  $P < 0.05$  とした。

## 3 結果

### 3-1 提供された検体情報

骨片の提供者は 6 ヶ月から 44 歳、男性 15 人、女性 15 人であった。

### 3-2 *In vitro* study

検体は ALP 染色で染色され、ALP 活性を認めた。また、アリザリンレッド染色で染色され、カルシウムを産生していた。さらに骨芽細胞マーカーの発現も認めた。これらでは、いずれも無血清培養検体と FBS 培養検体に有意な差は認めなかった。

### 3-3 *In vivo study*

無血清培養検体と FBS 培養検体とも HA の気孔内に良好な骨組織形成を認めた。形成された骨組織に隣接する細胞は抗ヒトオステオカルシン抗体陽性かつ抗ミトコンドリア抗体陽性でヒト細胞由来であった。両者の骨形成面積に有意差は認めなかった。

## 4 考察

上顎骨由来 MSCs は *in vitro study* で ALP 活性とカルシウム産生が確認でき、骨芽細胞の供給源となることが示唆され、*in vivo study* で骨組織形成が確認できた。これらより上顎骨は有用な骨形成細胞の供給源であると考えられる。一方、当科での腸骨由来 MSCs の骨形成能検討の経験や既存の報告より、腸骨由来 MSCs は上顎骨由来 MSCs に比べ骨形成能に優れる可能性がある。加えて、上顎骨由来 MSCs の培養は腸骨由来 MSCs の培養より感染が生じる確率が高い可能性がある。しかしながら、同一術野から容易に骨組織を採取できることを考慮すると、上顎骨はより低侵襲な骨形成細胞の供給源として有用であるといえよう。

また、無血清培地でも上顎骨 MSCs は骨形成能を有することが示された。無血清培地は細胞によって、増殖能や分化能に個体差が生じる可能性があるが、FBS 添加培地にもなうリスク回避や、自己血清添加培地にもなう患者の負担軽減を目的とするために有用であると思われる。今後、無血清培地の臨床応用には培地含有成分の細胞への長期的影響や移植床への影響など安全性の検討が必須である。