

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	近藤英司
<p>学位論文題目</p> <p>放射線照射後の骨欠損部に移植をおこなった骨髄由来間葉系幹細胞の機能</p> <p>共著者名</p> <p>竹川政範・伊藤広也・柴山尚大・稲積実佳子・松田光悦</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>口腔悪性腫瘍の治療では放射線治療を行うことが多いが、照射後の骨創の治癒は遅延し、放射線性顎骨壊死や感染を発症しやすく難治性である。またこれらの治療には、顎骨を切除し、骨移植や人工骨移植が行われるが患者のQOLは著しく低下する。</p> <p>近年、体性幹細胞を用いた骨、軟骨、筋組織などの再生医療が飛躍的な進歩を遂げてきており、このような細胞治療は傷害された組織を再生するのみでなく、疾病治療や各種創傷の治癒促進に応用することも期待されている。</p> <p>今回われわれは、放射線照射後の骨創の治癒に対する骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) 移植の有用性とBMSCsの骨創治癒における機能を明らかにすることを目的として研究を行った。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

F344ラットから摘出した大腿骨からBMSCを分離・培養し、第2継代目に達した後、骨芽細胞分化誘導培地において培養を行った(分化BMSC)。同様に骨分化誘導培地での培養を行わない間葉系幹細胞(未分化BMSC)も準備した。

動物は8週齢のF344ラット雄を使用した。放射線照射はCsガンマ線照射装置、Cs<sup>137</sup>線源を使用して、線量15Gyの1回照射をラット頭部に行った。照射後2週目にラット頭頂骨左右に直径4mmの骨欠損部を作製した。3×10<sup>5</sup>個のBMSCをコラーゲンスポンジに播種させて骨欠損部に埋入した。骨分化誘導培地で培養した分化BMSCを移植した例を分化細胞移植群とし、未分化BMSCを移植した例を未分化細胞移植群として使用した。対照群は担体のみの埋入とした。移植後1, 2, 4週目に評価を行った。

### ① 放射線学的観察

軟X線発生装置を使用し、放射線学的に新生骨形成を観察した。移植床の骨欠損部面積の測定はImageJを使用した。

### ② 血管鋳型の作製と観察

移植部および照射部の血管再生を検討するために血管鋳型注入剤を血管内注入した。注入後に頭頂骨を採取し試料を作製後、走査型電子顕微鏡で観察した。

### ③ 骨表面の微細構造学的観察

採取した頭頂骨を5%NaOClにて脱有機し、通法に従い試料を作製後、走査型電子顕微鏡により、骨創を観察した。

### ④ 組織学的観察

採取した頭頂骨を、10%EDTA液を用いて脱灰し、水溶性プラスチック包埋材(JB-4)に包埋した。3μmで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色後に光学顕微鏡で観察した。

### ⑤ 免疫組織化学的検討

BrdUを添加培養液中で培養した未分化BMSCを担体に播種し、骨欠損部に埋入した(照射群)。対照群は、放射線照射を行わず移植した群(対照群)とした。移植後1週目に試料を採取し、脱灰後、パラフィン包埋をして薄切した。通法に従って処理し、一次抗体として抗BrdU抗体を反応させた。ABC法により、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体と反応させた。DAB・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>にて発色させた後に光学顕微鏡により観察した。

## 成 績

### 1. 放射線学的所見

対照群は、移植床辺縁部は骨欠損部の形態と類似していた。細胞移植群では、分化、未分化ともに骨欠損部面積は縮小しており、その面積は細胞移植群が対照群に比較して小さく、統計学的に5%水準で有意差が認められた。分化、未分化細胞移植群の骨欠損部面積に明らかな差は認めなかった。

### 2. 超微細構造学的所見(レジン血管注入像)

- ① 対照群：1週目では脳硬膜側より多数の毛細血管が認められたが，2，4週目と経過に伴い血管数は減少していた。
- ② 分化細胞移植群：1週目では脳硬膜側から多く毛細血管がみられ，その数は対照群よりも多く認めた。2，4週目において血管数は減少していたが，太い血管が複数認められた。
- ③ 未分化細胞移植群：1週目では多数の毛細血管が認められた。その数は対照群，分化細胞移植群よりも多かった。2週目では太い血管を限局して複数認めた。4週目では血管数が減少していた。

### 3. 超微細構造学的所見

- ① 対照群：1，2週目ともに骨新生がほとんど認められなかった。母骨表面は平坦で小さな血管腔が僅かに認められた。4週目では新生骨が母骨を覆うように認めた。拡大像で膜性骨形成初期における多数の血管腔を伴った新生骨の形態を示した。
- ② 分化細胞移植群：1週目で新生骨は形成されており，その表面は平坦で血管腔を多数認めた。4週目では新生骨は母骨全体を被覆しており，その表面は平坦で血管腔を多数認めた。骨欠損部の面積は対照群よりも縮小していた。
- ④ 未分化細胞移植群：1週目で新生骨は形成されており，同部は血管腔を多数伴った平坦な表面を呈していた。2週目以降では，新生骨は母骨全体を完全に被覆していた。骨欠損部の面積は対照群よりも縮小していたが，分化細胞移植1週目と差は認めなかった。

### 4. 組織学的所見

- ① 対照群：1週目では母骨周囲には新生骨は認められなかった。2，4週目でわずかに新生骨が形成されていた。骨欠損部では類円形の小さな炎症性細胞と血管を認めた。
- ② 分化細胞移植群：1週目では母骨から骨欠損方向に向けて新生骨形成が認められた。新生骨の骨梁は比較的疎で内部に血管を認めた。2，4週では新生骨は母骨を被覆するように形成されていた。
- ③ 未分化細胞移植群：1週目では母骨から骨欠損方向に向けて新生骨形成が認められた。新生骨の骨梁は緻密で血管を多数認めた。4週目では新生骨は骨欠損部を完全に被覆していた。

### 5. 免疫組織学的所見

BrdU陽性細胞は，照射群では新生骨形成部周囲，新生骨内，および骨欠損内部の血管に多数分布していた。対照群ではBrdU陽性細胞は新生骨内および新生骨周囲に分布しており，骨欠損部の血管には見られなかった。

## 考 案

本研究では骨髄由来間葉系幹細胞が多分化能を有しているところに注目し，放射線照

射後の骨創治癒に対する効果と治癒経過を検討した。移植細胞は、骨芽細胞に分化させた骨髄由来間葉系幹細胞に加え、骨細胞への分化をはじめ血管新生が期待できる多分化能を有した骨髄由来間葉系幹細胞を用い検討した。本研究結果から、対照群は新生骨形成、血管新生ともに移植後4週経過しても抑制されていたが、細胞移植を行った実験群では著明な新生骨形成がみられた。未分化細胞移植群と分化細胞移植群の間で、血管形成は未分化細胞移植群がより著明であったが、骨形成量に差は認めなかった。分化細胞移植群は骨芽細胞が骨新生を行っているが、未分化のまま移植した幹細胞は、骨芽細胞への分化だけでなく、多種の細胞へ分化し組織再生に関わった可能性が考えられる。

BrdUによる骨髄由来間葉系幹細胞のトレーサー実験において、放射線照射群では、新生骨だけではなく、新生した血管にも存在が認められ、移植した未分化骨髄由来間葉系幹細胞は血管形成細胞、骨形成細胞に分化・誘導されることが推測された。このことは未分化骨髄由来間葉系幹細胞が骨形成に必要な細胞に分化し、放射線照射によって傷害された骨の創傷治癒に必要な細胞の供給源となって治癒を促進すると考えられた。照射をしていない対照群では創傷治癒に利用される細胞増殖能が正常であること、さらに骨芽細胞、血管形成細胞に分化する能力が低下していないことから、生体内での治癒機能が十分に働き、移植した細胞を必要としなかったと考えられた。以上から本研究においては分化細胞移植群では成長因子やサイトカインを産生、分泌することで骨芽細胞をはじめ骨創治癒に必要な組織、細胞を誘導した可能性があり、未分化細胞移植群では細胞の多分化能を発揮することで自ら多様な組織を作り上げた可能性が示唆された。

従って、放射線照射後の障害を受けた骨創に、骨髄由来間葉系幹細胞を移植することは、骨創治癒を促進し、正常な骨形成に有用であると思われた。

## 結 論




骨髄由来間葉系幹細胞は放射線照射後の骨再生医療に有用であると考えられる。また、照射後の骨欠損部に移植した骨髄由来間葉系幹細胞は、骨形成細胞および血管形成細胞に分化することで骨形成および創傷治癒の改善に関与していることが明らかとなった。

## 引 用 文 献

(重要な引用文献 3 編以内を掲載すること。)

- 1) Takekawa,M., Matsuda,M., Ohotubo,S. Effect of irradiation on autogenous bone transplantation in rat parietal bone. *Histol Histopathol* 2000; 15: 7-19.
- 2) Pittenger,MF., Mackay,AM., Beck,SC., Jaiswai,RK., Douglas,R., Mosca,JD., Moorman,MA., Simonetti,DW., Craiq,S., Marshak,DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
- 3) Ohgushi,H., Kotobuki,N., Funaoka,H., Machida,H., Hirose,M., Tanaka,Y., Takakura,Y. Tissue engineered ceramic artificial joint-ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 2005; 26: 4654-4661.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	近藤 英司
<p>審査委員長 高橋 康二 </p> <p>審査委員 船越 洋 </p> <p>審査委員 松田 光悦 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>放射線照射後の骨欠損部に移植をおこなった骨髄由来間葉系幹細胞の機能</p>			
<p><b>【研究の背景・目的】</b> 口腔悪性腫瘍の放射線治療では、照射後の骨創治癒は遅延し、難治性の放射線性顎骨壊死や感染を発症しやすく、その治療には、骨移植や人工骨移植が行われる。近年、体性幹細胞を用いた骨の再生医療が飛躍的な進歩を遂げており、本研究は、放射線照射後の骨創の治癒に対する骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)移植の有用性とその機能を検討した。</p>			

### [方法]

本研究ではラットの大腿骨から摘出した BMSCs を分離し、骨芽細胞分化誘導培地において培養を行った分化 BMSCs と培養を行わない未分化 BMSCs をコラーゲンスポンジに播種した。Cs<sup>137</sup> 線源で線量 15Gy の 1 回照射をラット頭部に行った後 2 週後に頭頂骨左右に作製した骨欠損に 2 種類の BMSCs を埋入し、移植後 1、2、4 週目に比較検討した。対照は担体のみの埋入とした。

評価方法は、軟 X 線発生装置による放射線学的観察、捜査電子顕微鏡 (SEM) による骨表面の微細構造学的観察、HE 染色による組織学的観察、そして移植幹細胞の動態をみるため BrDU を用いた免疫組織化学的検討をおこなった。

### [結果]

軟 X 線写真で骨欠損部の面積が、対照群では 1、2、4 週目でほぼ同様であったが、細胞移植群では経時的に小さくなり骨欠損部が新生骨で充たされた。SEM 観察では、移植群の方が早期に成熟骨に成長していた。さらに血管鑄型作製後の SEM 観察では、移植群、特に未分化細胞移植で新生骨形成に伴う豊富な血管形成と、成長に伴う血管の減少を認め、生理的な骨の新生と成長を認めた。BrDU 標識では、未分化細胞移植群で新生血管にも移植細胞が存在し、未分化細胞が骨形成に加え骨欠損部の創傷治癒にも機能していることが証明された。

### [要約]

今回の結果から、骨芽細胞に分化した細胞移植、未分化の細胞移植どちらも骨創での骨形成に寄与するが、特に未分化細胞は、骨と血管の両者に分化することにより、骨創治癒を促進する可能性が示された。

本研究は、医の倫理性において問題なく、内容も骨創の治療に関し極めて有用で、かつ将来的に新たな治療法開発につながる情報を提供したものである。また本学位論文提供者は、当該および関連領域について十分な知識ならびに学力を有しており、試問審査においても明快な回答が得られた。よって本論文が学位論文に値するものと判断する。