

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	稲積 実佳子
<p>学位論文題目 放射線照射後の骨欠損部に移植をおこなった脂肪組織由来幹細胞の効果</p> <p>共著者名 竹川政範, 岡久美子, 松田光悦</p> <p>未掲載 (北海道医学雑誌に投稿予定)</p> <p>研究目的</p> <p>放射線治療は悪性腫瘍の治療に有効であり, 治療の選択肢の一つとして行なわれている. しかし, 照射野には正常組織が含まれるため, 骨などの創傷治癒の遅延が生じる. 骨創の治癒が遅延する原因は, (1) 骨創周囲における骨形成細胞への分化の障害, (2) 血管新生の障害, (3) 照射野の微小循環不全といわれている. 近藤は放射線照射後の骨創治癒を改善するために, 骨髄由来間葉系幹細胞移植が有用であると報告している.</p> <p>従来, 骨の再生医療では増殖能が高く, 多分化能を有することから骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) を用いた研究が多くおこなわれてきた. 一方, 脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) は BMSC と同様の効果をもち, さらに低侵襲に細胞を採取できることから BMSC と比較して臨床応用する上での優位性が高いと考えられる.</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 ADSC 移植の効果と ADSC 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

動物は近交系8週齢のF344ラット雄を120匹使用した。放射線照射はCsガンマ線照射装置, Cs137線源を用いて15Gyの1回照射をラット頭部に行った。照射後2週目に頭頂骨正中の左右に直径4mmの円形の骨欠損をそれぞれ形成した。

細胞はF344ラット雄から採取した鼠径部脂肪組織より, 脂肪組織由来幹細胞(ADSC)を分離し, BrdU標識を行い第2継代まで培養した後, 担体(コラーゲンスポンジ)に播種し頭頂部の骨欠損部に移植した。

照射後ADSCを移植した群を照射細胞移植群(以下照射移植群), 照射後担体のみを埋入した群を照射非細胞移植群(以下照射群)とし, それぞれ42匹のラットを使用した。また, 照射を行わずに骨欠損部に担体のみを埋入したものを対照群とし36匹のラットを使用した。移植後1, 2, 4週目にそれぞれ各評価方法に合わせて試料を作製した。

試料は, 4%パラフォルムアルデヒドによる灌流固定を行い, 超微細構造学的, 組織学的, 免疫組織化学的観察のための試料採取を行った。

### ① 超微細構造学的観察

採取した試料を走査型電子顕微鏡(以下SEM)により, 母骨および新生骨の血管腔や表面の骨面形態を三次元的に観察した。

### ② 新生骨形成範囲の観察

脳硬膜側の新生骨形成の程度を評価するためにSEM写真上において欠損部の断端と新生骨との間に露出した母骨の面積をImageJ(National institute of Health. USA)を用いて計測し数値化した。

### ③ 血管鑄型の作製と観察

移植部周囲の血管新生を検討するために血管鑄型注入剤を注入後, 走査型電子顕微鏡で観察した。

### ④ 組織学的観察

灌流固定後に採取した試料を, ハマトキシリン・エオジン染色し光学顕微鏡で観察した。

### ⑤ 免疫組織化学的観察

免疫組織化学染色は酵素抗体間接法で行い, 一次抗体として抗VEGFR2抗体(以下VEGF)および抗BrdU抗体を反応させ, 次いでABC法で反応させた。免疫組織化学染色はDAB・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を基質として発色させ光学顕微鏡で観察した。

## 成 績

### ① 超微細構造学的所見

#### 対照群

移植後 1 週目は新生骨の形成範囲は脳硬膜側で母骨の露出した部分があったが、2 週目はほぼ母骨を被覆し 4 週目は骨欠損断端部まで完全に被覆した。

#### 照射群

移植後 1, 2 週目は新生骨の形成範囲は対照群と比較して明らかに少なかったが、4 週目に母骨を完全に被覆した。

#### 照射移植群

移植後 1 週目は新生骨の表面の形態は対照群と比較すると粗造で被覆範囲はほとんど差がみられなかったが、2 週目は対照群と同様に平坦で緻密な構造を示し、4 週目は母骨を完全に被覆した。

### ② 新生骨形成範囲の観察

#### 対照群

1 週目 4.60mm<sup>2</sup>, 2 週目 1.60mm<sup>2</sup>

#### 照射群

1 週目 12.10mm<sup>2</sup>, 2 週目 7.09mm<sup>2</sup>

#### 照射移植群

1 週目 6.40mm<sup>2</sup>, 2 週目 1.39mm<sup>2</sup>

母骨の露出面積は 1, 2 週目には対照群, 照射移植群と比較して照射群は統計学的に有意に大きく, 統計学的有意差を認めた ( $p < 0.05$ ). 4 週目には全実験群で母骨は新生骨によって被覆され, 測定値は 0 であった。

### ③ 血管鑄型の作成と観察

#### 対照群

1 週目では多くの毛細血管が欠損側に向かって進展しており, 2 週目でやや減少した。

#### 照射群

1 週目では細くまばらな毛細血管を認め, 2 週目でさらに減少した。

#### 照射移植群

対照群と比較して 1 週目では太い血管が多量に密集し, 2 週目に血管数は減少した。

### ④ 組織学的観察

#### 対照群

1, 2 週目で新生骨の形成は母骨の脳硬膜側に認め, 骨欠損部では 1 週目のコラーゲンスポンジ内部に細胞および血管はほとんどみられなかった。

#### 照射群

1, 2週目で新生骨の形成は少なく, 1週目のコラーゲンスポンジ内に血管, 細胞はみられなかった.

#### 照射移植群

1, 2週目で新生骨の形成は母骨の脳硬膜側に認め, 骨欠損部では1週目のコラーゲンスポンジ内部に多数の血管や間葉系細胞がみられ, 2週目でさらに増加した.

4週目ではすべての群で新生骨は骨欠損断端部を被覆していた.

### ⑤ 免疫組織化学的観察

#### 抗BrdU抗体染色

##### 対照群および照射群

BrdU陽性細胞は観察されなかった.

##### 照射移植群

1, 2週目で, BrdU陽性細胞は骨細胞および骨膜周囲に多数みられ, 新生骨形成部で骨芽細胞様に配列していた. 骨欠損部では1週目でコラーゲンスポンジ内の血管壁および間質にみられ, 2週目には主に血管壁にみられた.

#### 抗VEGF抗体染色

##### 対照群

VEGF陽性細胞は皮下組織の間質および血管周囲で, 1週目には多数みられ, 2週目以降で減少した. 骨欠損部においては, 1週目ではほとんどみられず, 2週目で増加し4週目では減少した.

##### 照射群

VEGF陽性細胞は同様の部位で, 1週目は少数みられ, 2週目に増加する傾向がみられた. 骨欠損部では, 1週目でほとんどみられず, 2週目で増加し4週目では減少した.

##### 照射移植群

VEGF陽性細胞は同様の部位で, 1週目には多数みられ2週目以降で減少した. 骨欠損部においては, 1週目よりコラーゲンスポンジ内の血管および細胞の周囲に陽性細胞がみられ, 4週目では減少した.

## 考 案

本研究では, 放射線照射の影響による骨の創傷治癒遅延に対して, ADSCを移植することによる創傷治癒への効果を検討した.

SEM像を用いた骨形成面の形態と血管注入の観察および光学顕微鏡所見から, 照射群は対照群と比較して血管新生が抑制され新生骨形成が遅延していた. 放射線照射による骨および軟組織の創傷治癒の遅延は, それらの修復に関与する間葉系細胞の遊走, 増殖, 分化の障害および血管新生の障害が影響していると考えられた. ADSC移植は骨創の治癒に関連する細胞や成長因子を供給す

ることで新生骨形成を改善し、さらに照射組織の血管新生を回復させることで骨創治癒が改善したと推察された。

そこで、ADSC 移植による放射線照射後の骨創治癒と血管新生の改善した機序を解明するために、トレーサー実験として BrdU 標識した ADSC を移植し、移植細胞と VEGF 陽性細胞の局在についての検証を行った。その結果、ADSC は新生骨形成部で骨芽細胞様に配列しており、BMSC と同様に放射線照射後の骨創部において、新生骨形成に関与する骨形成細胞に分化することが示された。また放射線照射移植後、初期における BrdU 陽性細胞と VEGF 陽性細胞の分布を比較すると、皮下組織では BrdU 陽性細胞はほとんど見られないが VEGF 陽性細胞は間質及び血管周囲に多数見られ、さらに骨欠損部ではコラーゲンスポンジ内部および血管周囲に分布していた。以上から、ADSC は創傷部の間葉系細胞などに作用して VEGF 陽性細胞を分化誘導することで血管新生を促進していると推察された。また、スポンジ内部の血管壁には BrdU 陽性細胞も少数分布しており、ADSC は血管に分化する能力も有していると考えられた。

以上の結果から、ADSC は血管内皮細胞に直接分化する能力と、血管新生に作用する VEGF 陽性細胞を分化誘導するパラクライン作用の両者により、放射線照射後に生じた骨創における血管新生を改善させたと考えられた。放射線照射により傷害された創傷部の血管新生が回復したことで新生骨形成が促進されたと考えられるが、パラクライン作用の効果については今後の研究によりさらに解明してゆく必要があると思われる。




## 結 論

脂肪組織由来幹細胞を放射線照射の影響により治癒困難な骨創部位へ移植することは、血管新生、骨形成を促進し創傷治癒に効果があることが明らかとなった。

## 引 用 文 献

- 1) Takekawa M, Matsuda M, Ohotubo S. Effect of irradiation on autogenous bone transplantation in rat parietal bone. *Histol Histopathol* 15: 7-19, 2000.
- 2) Marx, R. E. A new concept in the treatment of osteoradionecrosis. *J Oral Maxillofac Surg* 41: 351-357, 1983.
- 3) 近藤英司. 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. *北海道医学雑誌* 90: 39- 47, 2015.

## 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	稲積 実佳子
<p>審査委員長 <u>          </u> 船越 洋 </p> <p>審査委員 <u>          </u> 東 徳良 </p> <p>審査委員 <u>          </u> 河原 浩 </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脂肪組織由来幹細胞の効果</p>			
<p>放射線照射は種々のがん治療に使用されており、大きな成果を上げている。一方で、放射線治療は、がん組織に加えて周囲の正常組織に対しても障害を及ぼすことから、照射部位においては正常細胞の減少、微小循環の破綻、肉芽組織の形成不良、骨新生や上皮被覆の遅延が生じ慢性的な治癒不全がおこることが課題となっている。口腔領域の放射線照射においては、中でも骨組織の創傷治癒の遅延が臨床上大きな課題となっている。しかしながら、その解決方法は確立していない。</p> <p>本研究では、放射線照射後の創傷治癒に対して、間葉系幹細胞の1つである脂肪組織由来幹細胞（以下 ADSC と略す）の移植の放射線障害後の骨組織の創傷治癒促進への有用性とその作用分子機序を解析することを目的として研究を行った。</p> <p>方法：(1) 脂肪組織由来幹細胞（ADSC）は雄の F344 ラットから鼠径部脂肪組織を採取し、その後 Zuk らの方法に準じて分離した。その後 ADSC は 10% FBS を含有する DMEM 標準培地にて 37°C5%CO<sub>2</sub> の条件下で 2 週間初代培養を行い、80%コンフルエントの状態トリプシン処理を行い、1 x 10<sup>5</sup> 細胞/ml に調整し細胞播種を行った。移植には全て第 2 継代細胞を用い、BrdU トレーサー実験においては、第 1 継代時に培地に BrdU を添加して 2 時間培養した細胞を用いた。(2) 動物実験には近交系 8 週齢の F344 ラット雄を 120 匹用いた。放射線照射は本学 RI 施設の Cs ガンマ</p>			

線照射装置を用いて頭部に 15Gy の照射を行い、照射後 2 週間目に深麻酔下に頭頂骨に左右 1 カ所ずつ直径 4 mm の円形骨欠損を作出した。照射群として骨欠損部にコラーゲンスポンジのみ、照射移植群として  $3 \times 10^5$  個含有コラーゲンスポンジを 42 匹ずつ移植した。放射線照射を行わずにコラーゲンスポンジを移植した群を対照群とし、全 3 群で比較解析した。結果：走査型電子顕微鏡 (SEM) の観察結果、1 週間目では対照群と比較して照射群では明らかに新生骨の形成範囲が少なく、母骨の一部にしか骨新生を認めなかった。一方で、照射移植群では 1 週目から骨欠損形成部周囲の脳硬膜側で骨新生を認め、新生骨形成範囲は広範囲であった。2 週間目においても照射群では対照群と比較して新生骨形成範囲は少なく、骨欠損形成断端部の母骨は新生骨により被覆されていなかった。一方で、照射移植群では、新生骨は母骨全体を被覆しており、一部で母骨の露出を認める程度と骨新生が促進されていた。骨形成を定量的に評価すると、術後 1 週間では対照群では露出断面積が  $4.6\text{mm}^2$  と縮小していたのに対して、対照群では  $12.1\text{mm}^2$  と骨新生による被覆が遅延した。照射移植群では  $6.4\text{mm}^2$  と骨新生が促進していた。2 週間目では、 $1.6\text{mm}^2$  および  $1.39\text{mm}^2$  と対照群と照射移植群はほぼ同程度となっており、照射群の  $7.09\text{mm}^2$  に比べて骨新生が顕著であった。以上から、脂肪細胞由来幹細胞の移植により、放射線照射による骨新生の遅延が改善することが明らかとなった。

次に、移植による血管新生の解析のため、一部の動物に術後右心房から血管鋳型注入剤 (メタクリレート) を注入して血管観察を行った。その結果、対照群では術後 1 週間から骨欠損部に向かう新生血管を多く認めたのに対して、照射群では少なくその傾向は 2 週間目でも顕著であった。一方で、照射移植群では術後 1 週間から骨欠損部に向かう新生血管を多く認めた。以上から、脂肪由来幹細胞移植により、骨欠損部への血管新生も促進することが明らかとなった。

最後に、これらの骨新生や血管新生が移植細胞自身によるのか、それとも母床からの骨新生や血管新生を誘導しているかを明らかにするため、移植細胞を予め BrdU でラベルして解析した。免疫染色の結果、新生骨組織や新生血管を構成する細胞に BrdU 陽性の移植細胞を認めた。さらに BrdU 陽性細胞には血管新生促進因子 VEGF の受容体の免疫性が陽性な細胞も含まれる事が明らかとなった。このことから、BrdU 陽性の移植細胞自身が骨形成や血管新生に直接貢献していることが明らかとなった。一方で、骨新生細胞や新生血管細胞の中に BrdU でラベルされない細胞も混在していた事から、移植細胞はパラクリン、エンドクリン的にも作用している事が明らかとなった。

本研究結果は、脂肪由来幹細胞の移植による放射性障害後の骨再生への有用性に関する初めての報告であり、その分子機序をも解析した本研究結果は、オリジナル且つ臨床的意義の大きな研究成果である。

提出者はこの論文内容と関連領域についての各審査委員による諮問に対しても適切な回答が得られ、この領域において十分な知識を有する事が示された。以上から、本審査委員会は、本論分が博士 (医学) の学位に値するものと判定した。