

博士論文（要約）

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

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻
臨床生殖・発達・再生医学領域

稲積 実佳子

（竹川 政範、岡 久美子、松田 光悦）

研 究 目 的

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。

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。

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。

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)とし、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%パラホ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、ヘマトキシリン・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・H₂O₂ 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 4.60mm², 2 週目 1.60mm²

照射群

1 週目 12.10mm², 2 週目 7.09mm²

照射移植群

1 週目 6.40mm², 2 週目 1.39mm²

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考えられた。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.