

学位論文題名

Ectopic Bone Induction by BMP-Loaded Collagen Scaffold and Bone Marrow Stromal Cell Sheet

(BMP 含有コラーゲンスキャフォールドと
骨髄間質細胞シートによる異所性骨形成)

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨髄間質細胞は、多分化能を有する間葉系幹細胞を含んでおり、骨芽細胞をはじめ様々な細胞に分化するという報告がなされている。また、骨再生のためのスキャフォールドとして用いられている線維化アテロコラーゲン(FC)と熱変性アテロコラーゲン(HAC)の複合体である FC-HAC スポンジは、骨原性細胞の分化増殖に関与すると報告されている。

本研究では、組織工学的手法を用いた新しい骨再生療法として、培養骨髄細胞シートを bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) 含有 FC-HAC スポンジと併用して移植し、異所性骨形成効果を検討した。

【材料・方法】

骨髄細胞シートの作製:F344 ラット(6 週齢)計 9 匹の両側大腿骨を摘出して骨髄を採取し、初期培養後に付着性細胞を回収し、10%FBS 含有 MEM にて継代培養を行った。コンフルエント後、培地を ascorbic acid, β -glycerophosphate, dexamethason 添加培地に変更し、単層の細胞シートを作製した。その後 3, 5, 7 日目に、 7×10^5 cell/dish を追加播種することで積層させ、10 日後にスクレーパーと trypsin-EDTA を用いて細胞シート状態でフラスコ底面より剥離させた。

移植手術:コラーゲンスキャフォールドには、オリンパステルモバイオマテリアルより提供をうけた 4%FC-HAC スポンジを 4mm 角に成形したものを、BMP 溶液は、アステラス製薬の rhBMP-2 を MEM にて 100 μ g/ml に調整したものを用いた。F344 ラット(10 週齢)計 17 匹に対し、全身麻酔および局所麻酔下にて両側大腿筋間部に以下の各群の試料を無作為に移植した。Control 群:FC-HAC スポンジのみ、Cell 群:FC-HAC スポンジ内部に骨髄細胞シートを埋入したもの、BMP 群:FC-HAC スポンジに BMP 溶液を含浸させたもの、BMP-Cell 群:FC-HAC スポンジに BMP 溶液を含浸させ、内部に骨髄細胞シートを埋入したもの。

組織学的観察および組織学的計測:移植 4 週後に周囲組織を含めて摘出し、通法に従い 6 μ m の薄切標本を作製した。HE 重染色後、組織学的観察および、新生骨面積と残存スポンジ面積について組織学的計測を行い、統計学的分析を行った。

【結果】

Control 群:8 部位のいずれにも新生骨は観察されず、FC-HAC スポンジの残存が認められた。スポンジ周囲において炎症性細胞は認められず、スポンジ内部には線維芽細胞が認められた。

Cell 群: 8 部位中 5 部位において新生骨が観察されたが、線維芽細胞が侵入した FC-HAC スポンジが骨周囲に残存しているものが多く認められた。また発達した骨梁は骨細胞を封入し、骨芽細胞が多数認められた。骨の中心部には血管を有する骨髓様組織が観察された。

BMP 群: 8 部位中 6 部位において新生骨様組織が観察された。しかし新生骨様組織には骨細胞や骨芽細胞が少なく、残存したスポンジが混在しており、骨髓もほとんど認められなかった。

BMP-Cell 群: 10 部位全てにおいて、多量の新生骨が形成された。骨梁はセメントラインを有し、多数の骨芽細胞が認められた。骨の中心部には、脂肪細胞や血管の豊富な骨髓様組織が認められた。骨梁周囲には部分的に破骨細胞も観察された。

組織学的計測結果: Control 群, Cell 群, BMP 群, BMP-Cell 群における新生骨面積 (mm^2) は、 0 ± 0 , 0.049 ± 0.062 , 0.237 ± 0.290 , 2.045 ± 1.329 で、BMP-Cell 群では他の 3 群より有意に大きい新生骨面積を示した ($p < 0.05$)。また残存スポンジ面積 (mm^2) は、 0.633 ± 0.576 , 0.128 ± 0.190 , 0.053 ± 0.150 , 0.005 ± 0.016 で、BMP-Cell 群の残存スポンジ面積は Control 群および Cell 群と比較して有意に少なかった ($p < 0.05$)。

【考察】

細胞を生体内に移植する方法として、本研究では骨髓間質細胞をシート状にして移植する方法を用いた。この方法により大量の細胞を再生の場に移植維持することが可能となり、細胞の移植と同時に細胞間接着因子や細胞外基質も移植できるため、組織の再構築に有利であると考えられる。さらに細胞シートは移植後速やかに周囲の組織に接着することが明らかになっており、コラーゲンスポンジへの早期の接着が起り、組織再生に有効に働いた可能性がある。

骨髓間質細胞は、多分化能を有する間葉系幹細胞を含み、骨芽細胞をはじめ様々な細胞に分化するという報告がなされている。本研究では骨芽細胞分化誘導培地にて培養した結果、ALP 活性の発現が認められ、骨髓間質細胞シートをスポンジに埋入して移植した Cell 群では骨形成が認められたと考えられる。また、コラーゲンが骨髓間質細胞の骨芽細胞への分化を促進するとの報告もあり、本研究でも FC-HAC スポンジに含まれる I 型コラーゲンが直接的に骨髓間質細胞の骨芽細胞への分化を促進したかもしれない。

BMP-Cell 群では、他の 3 群と比較して有意に多い新生骨が形成された。BMP-2 はこれまでにさまざまな幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導し、骨形成を促進することが報告されている。BMP-Cell 群では、FC-HAC スポンジに保持された BMP-2 は移植した骨髓間質細胞に作用し、骨芽細胞への分化増殖を促進し、その結果多量の骨が形成されたと考えられた。一方、BMP 群においても骨形成は認められたが、ごく少量であった。これは、BMP 群で形成された骨には骨髓や血管形成が少なく、骨梁には破骨細胞やセメントラインもほとんど認められなかったため、酸素供給が少なくリモデリング活性も低かったことが原因と考えられる。

本研究ではスキャフォールドとして FC-HAC スポンジを用いたが、いずれの群にも炎症性細胞の浸潤は認められず、良好な細胞侵入性を示したことから、生体親和性の高い材料であると考えられる。BMP-Cell 群ではスポンジの残存はほとんど認められず、これは、BMP 含有 FC-HAC スポンジがシートを形成する細胞の分化増殖を促進しただけでなく、移植部位の未分化間葉系幹細胞に対しても遊走増殖を促進した結果、骨形成と FC-HAC スポンジ吸収がスムーズに行われたためと考えられる。

【結論】

培養骨髓細胞シートを BMP 含有 FC-HAC スポンジと併用して移植することで高い異所性骨新生効果が認められ、新しい骨再生療法としての有効性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 土 門 卓 文
副 査 教 授 網 塚 憲 生

学 位 論 文 題 名

Ectopic Bone Induction by BMP-Loaded Collagen Scaffold and Bone Marrow Stromal Cell Sheet

(BMP 含有コラーゲンスキャフォールドと
骨髓間質細胞シートによる異所性骨形成)

骨髓間質細胞は、多分化能を有する間葉系幹細胞を含んでおり、骨芽細胞をはじめ様々な細胞に分化するという報告がなされている。また、骨再生のためのスキャフォールドとして用いられている線維化アテロコラーゲン (fibrillar collagen:FC) と熱変性アテロコラーゲン (heat-denatured atelocollagen:HAC) の複合体である FC-HAC スポンジは、骨原性細胞の分化増殖に関与すると報告されている。本研究では、組織工学的手法を用いた新しい骨再生療法として、培養骨髓細胞シートを bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) 含有 FC-HAC スポンジと併用して移植し、異所性骨形成効果を検討した。

F344 ラット (6 週齢) 計 9 匹の骨髓を採取し、付着性細胞を 10%FBS 含有 MEM にて継代培養した。コンフルエント後、培地を ascorbic acid, β -glycerophosphate, dexamethason 添加培地に変更し、単層の細胞シートを作製した。その後 3, 5, 7 日目に、 7×10^5 cell/dish を追加播種して積層させ、10 日後にスクレーパーと trypsin-EDTA を用いてフラスコ底面より剥離させ、これを骨髓細胞シートとした。コラーゲンスキャフォールドには 4%FC-HAC スポンジ (オリンパステルモバイオマテリアル) を用い、rhBMP-2 (100 μ g/ml, アステラス製薬) を含浸させた。これらの材料を用いて F344 ラット (10 週齢) 計 17 匹に対し、移植手術を行った。Control 群では FC-HAC スポンジのみを、Cell 群では FC-HAC スポンジ内部に骨髓細胞シートを埋入したものを、BMP 群では FC-HAC スポンジに BMP 溶液を含浸させたものを、BMP-Cell 群では FC-HAC スポンジに BMP 溶液を含浸させ内部に骨髓細胞シートを埋入したものを、それぞれ大腿筋間部に無作為に移植した。観察期間を 4 週とし、薄切標本を作製して HE 重染色を行い、組織学的観察および、新生骨面積と残存スポンジ面積について組織学的計測と統計学的分析を行った。その結果、Control 群では、新生骨は観察されず、線維芽細胞が侵入した FC-HAC スポンジの残存が認められた。Cell 群では、新生骨が観察されたが、骨周囲に FC-HAC スポンジの残存がみられた。BMP 群では、新生骨様組織が観察されたが、骨細胞や骨芽細胞が少なく、残存したスポンジが混在しており、骨髓もほとんど認められなかった。BMP-Cell 群では、多量の新生骨が形成され、骨梁はセメントラインを有し、多数の骨芽細胞が認められた。骨の中心部には、脂肪細胞や血管の豊富な骨髓様組織が認められ、骨梁周囲には部分的に破骨細胞も観察された。組織学的計測の結果、Control 群, Cell 群, BMP 群, BMP-Cell 群における新生骨面積 (mm^2) は、 0 ± 0 , 0.049 ± 0.062 , 0.237 ± 0.290 , 2.045 ± 1.329 で、BMP-Cell 群では他の 3 群よ

り有意に大きい新生骨面積を示した ($p<0.05$)。また残存スポンジ面積 (mm^2) は、 0.633 ± 0.576 , 0.128 ± 0.190 , 0.053 ± 0.150 , 0.005 ± 0.016 で、BMP-Cell 群は Control 群および Cell 群と比較して有意に少なかった ($p<0.05$)。

細胞を生体内に移植する方法として、本研究では骨髄間質細胞をシート状にして移植する方法を用いた。この方法により大量の細胞を再生の場に維持でき、細胞の移植と同時に細胞間接着因子や細胞外基質も付随させることが可能なため、組織再生に有利であると考えられる。骨髄間質細胞は骨芽細胞に分化することがわかっており、本研究では、培養により ALP 活性の発現が認められ、Cell 群では骨形成が認められたと考えられる。BMP-2 はこれまでに幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導し、骨形成を促進することが報告されているが、BMP 群では骨形成はごく少量であり、これは用いた濃度が低かったことや、酸素供給が少なくリモデリング活性も低かったことが影響している可能性がある。本研究で用いた FC-HAC スポンジは、炎症性細胞の浸潤が認められず良好な細胞侵入性を示したことから、生体親和性の高い材料であると考えられる。BMP-Cell 群では、スポンジに保持された BMP-2 はシートを形成する細胞に作用し、骨芽細胞への分化増殖を促進したため、骨形成と FC-HAC スポンジの吸収がスムーズに行われ、その結果、有意に多い新生骨が形成されたと考えられる。

以上のことから、培養骨髄細胞シートを BMP 含有 FC-HAC スポンジと併用して移植することで高い異所性骨形成効果が認められ、新しい骨再生療法としての有効性が示された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項は、

- (1) FC と HAC のそれぞれの特徴は何か
- (2) 培養骨髄間質細胞に ascorbic acid, β -glycerophosphate, dexamethason を添加した理由
- (3) 移植した培養骨髄間質細胞に対する rhBMP-2 の作用と骨増生について
- (4) Cell 群および BMP-Cell 群において、セメントラインの果たす役割と骨再生における意義であった。

これらの質問に対して、申請者はいずれにも適切かつ明快な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究は、培養骨髄細胞シートを BMP-2 含有 FC-HAC スポンジと併用して移植した場合の異所性骨形成効果を組織学的に評価しており、組織工学的手法を用いた新しい骨再生療法として臨床への応用に対して重要な指針を与えたことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認めた。