

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	伊藤 広也
<h3>学位論文題目</h3> <p>脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与が初期骨創治癒に与える効果</p> <h3>共著者名</h3> <p>竹川政範、近藤英司、稲積実佳子、柴山尚大、松田光悦</p> <h3>未公表</h3> <h3>研究目的</h3> <p>歯科口腔外科領域では、歯周病による歯槽骨吸収や腫瘍、外傷による顎骨欠損に対し、自家骨移植や人工骨による再建が行われている。その際、移植骨採取の負担や、感染などのリスクも多く、より低侵襲でリスクの少ない治療が望まれている。近年、脂肪、筋肉、皮膚など骨髄以外にも多分化能を持った組織幹細胞の存在が明らかになり、中でも脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) は低侵襲で採取可能な幹細胞として注目されている。骨創への幹細胞の低侵襲導入法として静脈内投与法があり、幹細胞治療により骨創の治癒や機能回復に効果があるという報告も多い。しかし、静脈内投与されたADSCsの細胞動態や骨創への影響、治癒の機序に関しては、いまだ不明な点が多い。本研究の目的は、ADSCsを静脈内投与した際の局在と細胞動態を検討することによって、初期骨創治癒に与える効果を検討することである。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

F344ラット雄から採取した鼠径部脂肪組織からADSCsを分離・培養し、第1継代時に5-Bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)を10%FBS(GIBCO)と複合抗生物質を含有したDMEM (Sigma)培地に添加し第2継代まで培養した。細胞数を $1 \times 10^6$ 個/mlに調整し、ADSCs静脈内注入液として用いた。

動物は近交系8週齢のF344ラット雄を56匹使用した。ペントバルビタールによる腹腔内麻酔下で頭頂骨を露出し、直径4mmの円形骨欠損を左右1か所ずつ形成した。3日後に、ADSCs静脈内注入液、0.3 mlをラット尾静脈から注入した。骨欠損形成後7日目にペントバルビタール腹腔内麻酔後、10%ホルマリンにて灌流固定を行い免疫組織化学的観察のための試料採取を、同様に7日、14日、28日目まで4%パラフォルムアルデヒドによる灌流固定後に放射線学的、超微細構造学的、組織学的観察のための試料採取を行った。対照は骨欠損の形成のみを行った群とした。

### 1. 放射線学的観察

軟X線発生装置(M-1005、SOFTEX)を使用し、X線写真における骨欠損部のdot数の変化をデジタルデータとして取り込み、統計処理を行った。

### 2. 超微細構造学的観察

採取した試料を5%NaOClにて脱有機し、通法に従って試料を作製後、走査型電子顕微鏡(S-4100)にて骨創を観察した。

### 3. 組織学的観察

採取した試料を10%EDTA液により脱灰し、水溶性プラスチック材料(JB-4)に包埋後、 $3 \mu\text{m}$ に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色後に光学顕微鏡にて観察した。

### 4. 免疫組織化学的観察

採取した試料を10%EDTA液で脱灰後、パラフィン包埋し、 $6 \mu\text{m}$ に薄切。脱パラ後、内因性ペルオキシターゼ不活性化処理を行った。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ターゼ標識抗マウスIgG抗体と反応させてDAB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

両群ともに骨欠損部辺縁から内方に向かって不透過像を認めたが、その面積は静脈内投与群の方が対照群よりも広く、透過像面積(dot)を比較すると静脈内投与群の方が対照群より小さく、統計学的に5%水準で有意差を認めた。

## 2. 超微細構造学的所見

### ① 対照群

1週目では大小様々な孔を伴ったスポンジ状の新生骨が形成を認め、膜性骨形成初期の新生骨形態を示していた。2週目では新生骨は1週目より平坦で緻密になり血管腔の大きさは均一で減少していた。母骨の表面は新生骨に完全に被覆されていた。4週目では新生骨は平坦で、成熟骨骨面や広範囲な骨吸収窩を認めた。骨欠損部の面積は1、2、4週とも同様であった。

### ② 静脈内投与群

1週目では対象群2週目の形態に類似していた。2週目の新生骨は緻密で、成熟骨骨面や骨吸収窩が見られ、対象群4週目に類似していた。4週目では新生骨はより緻密になり、成熟骨骨面を呈していた。骨欠損部の面積は1、2、4週と経時的に小さくなっていた。

## 3. 組織学的所見

### ① 対照群

1週目では新生骨外側に類円形で核の大きな細胞が存在し、新生骨の骨梁はすう疎で内部に多数の太い血管腔を認めた。欠損内部では多数の炎症性細胞と血管が存在していた。2週目では新生骨外側に類円形で核の大きな細胞がみられ、新生骨周囲は骨芽細胞様の細胞に縁取られ、新生骨骨梁は1週目と比較して緻密で、内部に血管が多く観察された。4週目では新生骨は立方形の骨芽細胞様細胞に1列に縁取られ、その骨梁は2週目よりも緻密で血管は少なかった。

### ② 静脈内投与群

1週目では新生骨外側に類円形で核の大きな細胞が存在し骨梁は対照群1週目と比較して緻密になり、血管も少なかった。2週目では新生骨周囲は骨芽細胞様細胞に縁取られており、対照群2週目より新生骨骨梁は緻密で、内部の血管は少なかった。4週では新生骨は骨芽細胞様細胞に1列に縁取られ、骨梁は対照群4週目と同様であったが、骨梁内の血管は小さく数も少なかった。

## 4. 免疫組織化学的所見

抗BrdU抗体陽性細胞（抗BrdU陽性細胞）は静脈内投与群にのみ認められた。抗BrdU陽性細胞は、新生骨内部、新生骨内部の血管壁にみられた。新生骨形成部以外には抗BrdU陽性細胞はみられなかった。

## 考 案

本研究ではADSCsを静脈内投与した実験群と静脈内投与していない対照群の骨創治癒を骨欠損形成後7、14、28日と経時的に比較観察した。その結果、軟X線写真での骨欠損部を示す透過像面積は実験群が対照群に比較して小さく、統計学的に5%水準で有意差を認めた。走査型電子顕微鏡での観察においては対照群に比べ、実験群の方が早い段階でBoydeら<sup>(3)</sup>の示した成熟骨にきわめて類似した形態を示していた。また骨欠損部の面積

は、対照群では1、2、4週目で同様であったが、実験群では1、2、4週目で経時的に小さくなっていった。これらのことから、実験群では対照群より骨形成が早く進行し、さらに4週目においても骨形成が継続しているため、ADSCsの静脈内投与は良好な骨創治癒を促すことが示された。

光学顕微鏡での観察においては対照群1週目に多く見られる炎症性細胞が実験群1週目では少なく、新生骨骨梁は対照群がすう疎であったのに対し、実験群は緻密であった。ADSCsにはIL-1RA(receptor antagonist)、IL-10などの抗炎症作用のサイトカインを豊富に分泌することによる炎症抑制作用があることから早期に炎症抑制作用が働き、実験群の方が骨形成の進行が早まったと考えられた。また両群4週目の骨欠損部の組織像では実験群の方が細胞成分や血管が豊富であり、このことから静脈内投与群の方がより長い期間新生骨形成を行う可能性があることが示唆された。抗BrdU抗体陽性ADSCsは新生骨内部の骨細胞や血管壁にみられた。この結果から、静脈内投与したADSCsが骨創傷部位に到達し、骨や血管に分化することにより骨創治癒を促進するオートクリン作用があったことが示された。




## 結 論

ADSCsの静脈内投与により、幹細胞が骨損傷部位に集積して骨、血管に分化し、骨創治癒を促進していることが示唆された。以上のことからADSCsは骨創における細胞治療のソースとして有用であり、また幹細胞の静脈内投与法も臨床応用可能と考えられるが、さらに詳細な検討が必要である。

## 引 用 文 献

1. Zuk, P.A., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):p 211-28.
2. Levi, B., et al. Migration and Participation in Repair of Systemically Injected Adipose-Derived Stromal Cells to Sites of Cranial Skeletal Injury. *Plast Reconstr Surg.* 2011 March ; 127(3):p 1130-1140.
3. Boyde, A., Hobdell, M.H., Scanning electron microscopy of primary membrane bone. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1969;99(1):p 98-108.

## 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	伊藤 広也
<div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;">           審査委員長 伊藤 浩  </div> <div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;">           審査委員 飯島 一  </div> <div style="text-align: right;">           審査委員 松田光悦  </div>			
学位論文題目			
<p style="font-size: 1.2em;">脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与が初期骨創治療に与える効果</p>			

骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow derived mesenchymal cells; BMSCs)は多分化能を有しており、肝線維症の治療に関して BMSCs の局所投与や静脈内投与が肝不全の回復に効果的であった報告、筋損傷の治療に関して BMSCs の局所投与や静脈内投与が筋機能の回復に効果的であった報告などがなされている。また、脂肪組織に含まれる体性幹細胞 (Adipose derived stem cells; ADSCs)は骨形成細胞、軟骨形成細胞、脂肪細胞などに分化することが報告されており、可能であれば骨髄に比較して幹細胞採取が低侵襲に行える脂肪組織から ADSCs を採取し、生体への外科的侵襲のない静脈内投与による幹細胞導入が望ましい。この研究では、F334 ラット雄から採取した単径部脂肪組織から脂肪組織由来 ADSCs を分離して培養し、細胞数を  $1 \times 10^6$  個/ml に調整したものを ADSCs 注入液として用い、頭頂骨に骨欠損を作成したラットに注入液を静脈内投与し、その効果を評価した。X線学的、組織学的、免疫組織化学的に検討したところ、投与した幹細胞が損傷部位に集積して骨、血管に分化していることが確認され、骨創治癒を促進していることが示唆された。この研究から ADSCs は細胞治療のソースとして十分な条件を兼ね備えていること、また静脈内投与も臨床応用が可能であることが判明した。

以上、本研究結果より顎骨欠損や変形など歯科および口腔外科領域の治療として脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)の静脈内投与が有効であることが判明し、この研究論文は学位論文に十分値するものであると判定した。この治療が有効な傷害の程度や至適投与時期などに関して更なる検討がなされれば、早期に臨床応用されることが期待できる。