

学位論文

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

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

伊藤 広也

(竹川政範, 近藤英司, 稲積実佳子, 柴山尚大, 松田光悦)

## 【緒 言】

骨髄由来間葉系幹細胞(Bone marrow derived mesenchymal stem cells;BMSCs)は多分化能を有している. Zhao W ら<sup>1)</sup>は BMSCs の肝線維症への治療効果の研究において, BMSCs の局所投与や静脈内投与を行い肝不全の回復に効果があったことを報告した. また Pathi S ら<sup>2)</sup>は BMSCs の筋損傷の回復への影響の研究において, BMSCs の局所投与や静脈内投与を行ない筋機能の回復に効果があったことを報告した. このように BMSCs の局所投与や静脈内投与によって, 組織損傷部位の早期治癒が認められるという報告<sup>3,4)</sup>が多く見られるようになった.

一方, 歯科や口腔外科領域では, 歯周病による歯槽骨吸収をはじめ, 嚢胞, 腫瘍, 外傷による顎骨欠損や変形などに対する治療として, 自家骨移植や人工骨による再建が行われている. そのため, 移植骨採取による負担や, 口腔内処置による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<sup>5)</sup>. 幹細胞投与が組織損傷を修復し創傷治癒を促進するのであれば, 顎骨の骨創治癒においても治癒促進につながることを期待される. しかし, BMSCs は骨髄中の有核細胞の 0.01~0.001% と少なく, 幹細胞治療のため十分な細胞数を得るためには多量の骨髄を採取する必要があり, 臨床においては極めて侵襲的な治療になる<sup>6)</sup>. 近年, 脂肪, 筋肉, 皮膚, 胎盤附属器など骨髄以外においても多分化能を持った組織幹細胞の存在が明らかにされ, 骨髄に代わる幹細胞の供給源として注目されている<sup>7-10)</sup>.

Zuk PA ら<sup>6)</sup>は脂肪組織に含まれる体性幹細胞(Adipose derived stem cells;ADSCs)が骨形成細胞, 軟骨形成細胞, 脂肪細胞などに分化することを報告した. より低侵襲な幹細胞の採取と導入方法としては, 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と思われる. しかし, 脂肪組織由来体性幹細胞が静脈内投与されたときの細胞動態や骨創に対する影響, 骨創治癒の機序に関しては, いまだ不明な点が多い. ADSCs の静脈内投与による創傷治癒および骨再生機序を明らかにするためには投与した細胞の骨再生部での局在を知ることが重要である.

本研究の目的は, 脂肪組織由来の体性幹細胞 ADSCs の静脈内投与が初期骨創治癒に与える効果と, その細胞動態を検討することである.

## 【材料と方法】

### <細胞>

F344ラット雄(Sankyo Labo Service Corporation, INC., Tokyo, Japan)から採取した鼠径部脂肪組織を、0.01M PBS(phosphate buffered saline)で十分に洗浄し、組織を細分化後、0.1% I型コラゲナーゼ(Roche Diagnostics Japan)で30分37℃にて震盪させ、組織を消化した。酵素処理後に脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)を分離した。ADSCsは2.5% FCS添加のDulbecco's modified Eagle's medium, (SIGMA-ALDRICH Co., St. Louis, USA)において37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養を行った。第1継代時に5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; SIGMA CHEMICAL CO., Anaheim, USA)をメディウムに添加し10 μM に調整して2時間培養した後、第2継代まで培養した。その後PBSで洗浄した後に0.2% trypsin/0.02% EDTA (SIGMA-ALDRICH)を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に5分程度静置した。これにメディウムを加えtrypsin作用を停止してから1500rpm×5min 遠心分離し、Lin G<sub>ra</sub><sup>11)</sup>の方法に従って生理食塩水で希釈して、細胞数を1×10<sup>6</sup> 個/ml に調整したものをADSCs注入液として静脈内投与に用いた。

### <方法>

近交系8週齢のF344ラット雄(Sankyo Labo Service Corporation, INC., Tokyo, Japan)を56匹使用した。本研究ではペントバルビタール(ネンブタール<sup>®</sup>; 40mg/kg)による腹腔内麻酔下で頭頂部皮膚を切開して頭頂骨を露出し、同部にトレフィンバーにより直径 4mm の円形の骨欠損を頭頂骨正中縫合部を避けて左右1か所ずつ形成し骨欠損モデルを作製した<sup>12)</sup>。皮膚はナイロン糸で縫合した。その3日後に、1×10<sup>6</sup>個/mlに調整したADSCs, 0.3ml をラット尾静脈から注入した(実験群)(図1)。骨欠損形成後7日目にはペントバルビタール腹腔内麻酔後、10% ホルマリン(10% タナホルム<sup>®</sup>;株式会社タナカ, 札幌, 日本)を用い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、さらに骨欠損形成後7日目, 14日目, 28日目に4% パラフォルムアルデヒド(MerckKGaA, Darmstadt, Germany)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なった。対照は骨欠損の形成のみを行なった群とし、同様に実験を行なった。

### <骨形成の評価>

#### 放射線学的観察

軟X線発生装置(M-1005, SOFTEX CO. LTD., Kanagawa, Japan)を使用し、X線写真における骨欠損部のdot数(黒色dot数)の変化をデジタルデータとして取り込み、Photo Shop<sup>®</sup>を用いて数値化し、StatView(HULINKS INC., Leesburg, USA)を使用して統計処理をした。

#### 超微細構造学的観察

採取した試料から実体顕微鏡下で軟組織を除去し、次いで5% NaOClを使用して脱有機を行った。0.01M PBSで洗浄後1%オスミウム-PBSで1時間の後固定を行い、上昇エタノール系列で脱水、第三ブチルアルコールで置換後に凍結乾燥(ID-2, EIKO Engineering

Co. LTD., Mito, Japan)を行なった。白金-金蒸着 (E-1030 Ion Sputter, HITACHI Co. LTD., Tokyo, Japan)の後、走査型電子顕微鏡 (S-4100, HITACHI Co. LTD., Tokyo, Japan)により、母骨および新生骨の血管腔や表面への骨添加・吸収の骨面形態を三次元的に観察した。

### 組織学的観察

実験動物の灌流固定後に試料を採取し、0.01M PBS (pH7.4)で3回試料を洗浄した。10% EDTA液により脱灰し(室温, 7日間), エタノール系列による脱水後, 水溶性プラスチック材料 (JB-4, Polysciences INC., Warrington, USA)に包埋した。3 $\mu$ 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より観察した。

### 免疫組織化学的観察

BrdUとそのモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法により観察した。BrdUの免疫組織化学的染色は酵素抗体間接法によって行い, モノクローナル抗BrdU抗体 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)を使用した。採取した試料を10% EDTA液で脱灰した後, パラフィン包埋し, 6 $\mu$ mに薄切後, 通法に従い脱パラフィンを行い, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加メタノール溶液で20分間浸透させ, 内因性ペルオキシダーゼ不活性化処理を行った。DNA変性を行なうために, 4規定塩酸にて37°C, 30分間処理後, 硼酸・硼砂緩衝液 (pH9.0)を用いて中和した。その後一次抗体として抗BrdU抗体 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)を室温で60分間反応させた。次にABC法 (VECTASTAIN<sup>®</sup> ABC KIT, Vector Laboratories, INC., California, USA)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30分反応させた。免疫組織化学的染色はDAB・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE, Vector Laboratories, INC., California, USA)を基質として発色させた後に光学顕微鏡により骨創部位における抗BrdU抗体陽性細胞の局在を観察した。

## 【結 果】

### <放射線学的所見>

対照群では, 形成した骨欠損部の辺縁から内方に向かって不透過像が認められた (写真1-A)。静脈内投与群では, 辺縁から連続して進展する広い面積の不透過像が認められた (写真1-B)。骨欠損部を示す透過像の面積 (dot) の計測では静脈内投与群 (n=16) が対照群 (n=8) 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 (表1)。

### <超微細構造学的所見>

#### 対照群 1週目 (写真 2-A, B)

走査型電子顕微鏡 (SEM) の低倍像で, 大小様々な孔を伴ったスポンジ状の新生骨が, 骨欠損形成部周囲の脳硬膜側で形成されていたが, 母骨の表面は新生骨に被覆されていない部

分も見られた。拡大像で新生骨は大小様々な血管腔を囲んだすう疎な梁状構造を示し、その表面には米粒状の石灰化物が不規則に並んでおり、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。

#### 対照群 2 週目 (写真 2-C, D)

SEM の低倍像で、新生骨は母骨全体を被覆しており、さらに骨欠損形成断端部は完全に被覆されていた。その新生骨表面は対照群 1 週目と比較して平坦であり、また血管腔の大きさは均一になりその数も減少していた。形成した骨欠損部の面積は対照群 1 週目と比較して同様であった。拡大像で新生骨は米粒状の石灰化物が不規則に配列しており、対照群 1 週目と比較して緻密になっていた。

#### 対照群 4 週目 (写真 2-E, F)

SEM の低倍像で、新生骨は骨欠損形成断端部を完全に覆い、新生骨表面は平坦であった。新生骨表面の血管腔の数は対照群 2 週目に比較して減少していた。骨欠損部の面積は対照群 2 週目と同様であった。拡大像では、新生骨表面は米粒状の石灰化物が規則的に配列し、骨芽細胞窩が散在する成熟骨の骨面を示していた。さらに広範囲に骨吸収窩が見られた。

#### 静脈内投与群 1 週目 (写真 3-A, B)

SEM の低倍像で、新生骨は骨欠損形成部周囲の脳硬膜側から形成されていたが、母骨表面の一部は、新生骨による被覆の無い部分が見られた。新生骨に被覆された部分では、対照群 1 週目と比較してその表面は平坦で、血管腔の大きさは均一で数は少なかった。骨欠損部の面積は対照群と比較して差がなかった。拡大像で新生骨は米粒状の石灰化物が不規則に配列し、対照群 2 週目に類似した緻密な像を示していた。

#### 静脈内投与群 2 週目 (写真 3-C, D)

SEM の低倍像で、新生骨は母骨全体を被覆しており、対照群 2 週目と比較してその新生骨表面は平坦で緻密な構造を示し、また血管腔も均一で差がなかった。両群 1 週目および対照群 2 週目と比較して、骨欠損部の面積は小さくなっていた。拡大像では、新生骨は米粒状の石灰化物が規則的に配列した緻密な構造で、一部その表面に骨吸収窩がみられた。一部には骨芽細胞窩が散在する成熟骨の骨面が見られた。

#### 静脈内投与群 4 週目 (写真 3-E, F)

SEM の低倍像で、新生骨は母骨全体を完全に被覆していた。新生骨表面は平坦で、血管腔は大きなものと小さなものが混在し、その数は静脈内投与群 2 週目と比較してさらに減少していた。形成した骨欠損部の面積は両群 1, 2 週目と比較して小さくなっていた。拡大像では、骨芽細胞窩が散在する成熟骨の骨面を示しており、一部その表面に骨吸収窩がみられた。

## <組織学的所見>

### 対照群 1 週目 (写真 4-A)

母骨の脳硬膜側でのみ新生骨形成が認められ、骨欠損形成断端部から欠損側に向かい形成されていた。新生骨の外側に類円形の核が大きな細胞が存在し、新生骨の骨梁は全体的に疎で内部に多数の太い血管腔を認めた。欠損内部では類円形の小さな炎症性細胞が集合し、その間に多数の血管が存在していた。

### 対照群 2 週目 (写真 4-B)

母骨の脳硬膜側でのみ新生骨形成が認められ、断端部から欠損側に向かい形成されていた。新生骨周囲は骨芽細胞に縁取られ、新生骨の骨梁は対照群 1 週目と比較して緻密になっており、内部に血管が多く観察された。骨欠損断端部では類円形の核が大きな間葉系細胞がみられた。骨欠損部の類円形の小さな炎症性細胞は 1 週目と比較して減少していた。

### 対照群 4 週目 (写真 4-C)

母骨の脳硬膜側から断端を被覆するように新生骨形成が認められた。新生骨は扁平な骨芽細胞に縁取られ、その骨梁は 2 週目よりも緻密で血管は少なかった。骨欠損部の細胞成分と血管は 1 週目および 2 週目と比較して減少していた。

### 静脈内投与群 1 週目 (写真 5-A)

母骨の脳硬膜側でのみ新生骨形成が認められた。新生骨の外側に類円形の大きな細胞が存在した。新生骨の骨梁は対照群 1 週目と比較して緻密になっており、血管も少なかった。骨欠損部では類円形の小さな炎症性細胞は対照群 1 週目と比較して少なく、その間に多数の大きな血管が存在していた。

### 静脈内投与群 2 週目 (写真 5-B)

母骨の脳硬膜側でのみ新生骨形成が認められ、断端部から欠損側に向かい形成されていた。新生骨の周囲は立方形の骨芽細胞に縁取られており、新生骨の骨梁は対照群 2 週目より緻密で、内部の血管は対照群 2 週目と比較して少なかった。骨欠損形成断端部では類円形の大きな間葉系細胞が対照群 2 週目より多くみられ、骨欠損部の類円形の小さな炎症性細胞は同様に少なかった。

### 静脈内投与群 4 週目 (写真 5-C)

母骨の脳硬膜側から骨欠損形成断端部を被覆するように新生骨形成が認められた。新生骨は立方形の骨芽細胞に縁取られ、その骨梁は対照群 4 週目と同様に緻密で、骨梁内の血管は小さく数も少なかった。対照群 4 週目と比較して骨欠損部の細胞成分と血管は多く確認された。

#### <免疫組織化学的所見>

抗 BrdU 抗体陽性細胞(抗 BrdU 陽性細胞)は静脈内投与群の新生骨内部に存在し骨細胞様にみられた。さらに、抗 BrdU 陽性細胞は新生骨内部の血管壁にもみられた。新生骨形成部以外には抗 BrdU 陽性細胞はみられなかった(写真 6)。

#### 【考 察】

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem cells;MSCs)は、1968年 Friendenstein ら<sup>13)</sup>の骨髄中に骨、軟骨、脂肪、線維性組織へ分化する細胞が存在するという報告以来、現在まで多くの研究者によって研究<sup>14)-16)</sup>されてきた。骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)は、骨髄から接着性細胞として容易に採取でき、培養により安定して細胞数が増える、多分化能を有するという性質がある。また生体内の創傷治癒においては、BMSCs は一過性に組織損傷部位に出現し短期間のうちに組織破壊を食い止め、修復・再生を促すために多種多様の成長因子やサイトカインを産生、分泌することが報告<sup>3,4,17,18)</sup>されている。そのため、現在の骨再生医療には BMSCs が広く研究、利用されている。しかし臨床応用することに関しては細胞採取の際の生体への侵襲の大きさ、得られる幹細胞数が限られるなどの問題がある<sup>6)</sup>。近年、BMSCs と同様の多分化能をもった脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)が存在することが報告された<sup>6)</sup>。BMSCs が、骨髄細胞 10 万個に 1 個の割合で存在することに比較して ADSCs は 500~1,000 倍という高い割合で存在<sup>19)</sup>している点や骨髄よりも低侵襲に採取可能なことから、最近では ADSCs の特徴や骨再生に関する研究<sup>7,17)</sup>が行なわれている。

組織再生のための幹細胞の投与方法は損傷部位に細胞を局所注入する方法、ポリエステル類などの足場となる人工材料に播種して局所投与する方法、そして静脈内注入する方法があり、それらの投与方法での損傷組織の治癒効果に関する報告<sup>1,2,7,11,20,21)</sup>がみられる。骨欠損部に ADSCs を直接注入する場合は注入幹細胞の欠損部位への静置が難しい。またポリエステル類やコラーゲンスポンジなどの足場材料を使って ADSCs を骨欠損部に局所投与する方法も損傷部位に侵襲を加えることになり、さらに足場材料自体の骨創治癒への影響が考えられる。今回我々は ADSCs の臨床応用と骨創治癒効果を検討する上で、損傷部位に最も低侵襲で足場材料自体の影響を排除した幹細胞導入法が望ましいと考え、静脈内投与方法を選択し研究を行なった。

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。幹細胞の静脈内投与に関して、効果的な骨再生に結びつく至適投与時期の報告は見られない。一般的に、創傷治癒は初期におこる炎症相(Inflammatory phase)が終わると、3日目から増殖相(Proliferative phase)に入り、血小板から放出される PDGF(platelet derived growth factor)によりマクロファージや線維芽細胞が損傷部に誘導され増殖する<sup>22)</sup>とされている。また損傷部では VEGF(vascular endothelial growth factor)の発現の増加がみられ、血管新生による組織修復が始まる時期

でもあり、この時期に ADSCs を投与することは、局所における新生血管を通して骨欠損部に到達し骨創治癒に効率よく働く可能性がある時期と考えられる。これらの一般論から、本研究では骨欠損形成後 3 日目に ADSCs の投与を行なった。

今回の研究で行なった超微細構造学的観察による表面性状は、対照群では 1 週目の新生骨はすう疎で、2 週目、4 週目では緻密になっていた。また 4 週目では骨芽細胞窩が散在する成熟骨像を示し骨吸収窩も見られた。静脈内投与群では 1 週目から新生骨は緻密で 2 週目、4 週目には成熟骨像や吸収窩が見られた。Boyde ら<sup>23,24)</sup>は膜性骨の発生から成熟における形態的变化を走査型電子顕微鏡で観察し、膜性骨形成初期においては多数の血管腔を伴った新生骨形態を示し、成熟骨になると骨芽細胞窩が散在し吸収窩もみられると報告した。本研究の骨創治癒における SEM を用いた超微細構造学的観察で、対照群に比べ、静脈内投与群の方が早い段階で Boyde ら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、静脈内投与群では 1, 2, 4 週目で経時的に小さくなっており、統計学的に 5% 水準で有意差が認められた。このことは静脈内投与群の方が早い骨創治癒を行なうことを示している。これら超微細構造学的、放射線学的観察から、対照群では 2 週目以降の骨新生が見られないのに対し、静脈内投与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ことから、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。

組織学的観察の 1 週目では、対照群の骨欠損部は炎症性細胞が多く存在しており、新生骨の骨梁はすう疎であったのに対し、静脈内投与群では炎症性細胞は少なく緻密な骨梁であった。この結果から静脈内投与群の方が対照群と比較し早期に炎症抑制作用が働き、骨形成の進行が早まったと考えられた。2 週目では対照群、静脈内投与群ともに骨欠損側の新生骨先端部に類円形の大きな細胞があり、新生骨形成が続いていると思われる像がみられた。4 週目になると、対照群では扁平な骨芽細胞が 1 列に並んだ骨形成休止期の像がみられるようになり、骨欠損部の細胞成分は少なくなっていたのに対して、静脈内投与群では立方形の骨芽細胞が 1 列に並び、骨欠損部の細胞成分や血管は豊富であった。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。

ADSCs 静脈内投与群と対照群の間で骨形成に差が出たことから、抗 BrdU 抗体陽性 ADSCs を静脈内投与して創傷部位での ADSCs の動態を観察したところ、BrdU 陽性 ADSCs は新生骨内部の骨細胞や新生骨内部の血管壁にみられた。これらの結果は、静脈内投与した ADSCs が骨創傷部位に到達し、過剰な炎症反応を抑制して骨や血管に分化することにより骨創治癒の促進に影響したことを示している。ADSCs には、障害部へ集積する能力<sup>12,25,26)</sup>や内・外胚葉細胞への分化の可塑性あることが知られており<sup>20)</sup>、今回静脈内投与した ADSCs も骨創傷部位へ動員され、骨芽細胞や血管内皮細胞へ分化して治癒を促進する作用が働いたと考えられる。

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<sup>21)</sup>があり、他にも ADSCs の性質として VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor) などの組織再生に重要な栄

養因子を多く分泌する栄養作用の報告<sup>27)</sup>, さらに ADSCs が線維芽細胞を活性化して創傷治癒を促進するという報告<sup>28)</sup>がある. このようなパラクリン作用も骨創治癒に関与した可能性が考えられ, 本研究の静脈内投与群における, 早期の炎症細胞の消失や新生骨の成熟化に関係していると考えられた.

ADSCs が骨創治癒を促すためには, 速やかに損傷部位に動員されることが重要であると考えられる. 一般的に骨損傷では, 損傷した部位から健常骨髄に損傷を知らせる初動シグナルがあり, これにより末梢血内に幹細胞を含む骨髄由来骨前駆細胞が一過性に大量動員される<sup>29,30)</sup>. その表面には SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) のレセプター CXCR4 を発現しており, 骨再生部位の新生血管内皮細胞は SDF-1 を産生している. SDF-1/CXCR4 相互作用により骨前駆細胞は骨再生部位に動員され, 骨形成を促していることが報告されている<sup>29,30)</sup>. ADSCs の表面にも同様に CXCR4 は発現しており, SDF-1 に起因して損傷部位に動員されている可能性を示唆した報告<sup>26)</sup>もあることから, 本研究で ADSCs が損傷部位に動員され骨や血管に分化し骨創治癒を促進したことは, ADSCs の SDF-1/CXCR4 相互作用が関与した可能性も考えられた.

最近, microRNA は, BMSCs 由来の exosome を介して細胞間を移動し受け手側で機能するということが明らかになった<sup>31,32)</sup>. さらに exosome を静脈内投与することによって障害部位での治癒促進が見られるという, BMSCs のパラクリン効果を示唆した報告<sup>33,34)</sup>や, ADSCs が exosome を分泌するという報告<sup>35)</sup>もある. 今後, ADSCs が損傷部位に誘導される初動シグナルの解明と, パラクリン効果に関与しているサイトカインや増殖因子, exosome の関与などの研究が必要と思われる.

ADSCs を静脈内投与する際の適切な時期に関して報告はなく, 投与細胞数に関しても報告によってばらつきがある. また静脈内投与する量によっては肺塞栓症を引き起こすとする報告<sup>26,36)</sup>もあるので慎重な検討が必要と思われる. さらに幹細胞が腫瘍発生阻止作用を示す一方で免疫抑制作用もあり, 腫瘍の成長と肺転移を促進している可能性があるとした報告<sup>37)</sup>や, 癌細胞の運動性, 浸潤性や転移を強化する作用を持つとする報告<sup>38)</sup>もある. 今後は幹細胞が傷害された組織で生着し, 機能的に有効な組織をどの程度再生可能かという点と, 治療が有効な傷害の程度や至適投与時期, 生体に与える負の作用についての検討が必要と思われる.

## 【結 語】

本研究で脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) を静脈内投与することにより, 投与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. 以上のことから脂肪組織由来幹細胞は細胞治療のソースとして有用であり, また静脈内投与も臨床応用可能と考えられた.

## 【文 献】

- 1) Zhao, W., et al., *Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis*. World J Gastroenterol, 2012. 18(10): p. 1048-58.
- 2) Pathi, S.D., et al., *Recovery of the injured external anal sphincter after injection of local or intravenous mesenchymal stem cells*. Obstet Gynecol, 2012. 119(1): p. 134-44.
- 3) Stoicov, C., et al., *Mesenchymal stem cells utilize CXCR4-SDF-1 signaling for acute, but not chronic, trafficking to gastric mucosal inflammation*. Dig Dis Sci, 2013. 58(9): p. 2466-77.
- 4) Singer, D.D., et al., *The effects of rat mesenchymal stem cells on injury progression in a rat model*. Acad Emerg Med, 2013. 20(4): p. 398-402.
- 5) Hupp, J., Ellis E III., Tucker M., *Surgical Reconstruction of defects of the Jaws*. Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery 5 th edition, 2008. 28: p. 605-618.
- 6) Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. 7(2): p. 211-28.
- 7) Tapp, H., et al., *Adipose-Derived Stem Cells: Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair*. Experimental Biology and Medicine, 2009. 234(1): p. 1-9.
- 8) Tamaki, T., et al., *Cardiomyocyte formation by skeletal muscle-derived multi-myogenic stem cells after transplantation into infarcted myocardium*. PLoS One, 2008. 3(3): p. e1789.
- 9) Zhao, M.T. and R.S. Prather, *The multi-potentiality of skin-derived stem cells in pigs*. Theriogenology, 2011. 75(8): p. 1372-80.
- 10) Jin, H.J., et al., *Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy*. Int J Mol Sci, 2013. 14(9): p. 17986-8001.
- 11) Lin, G., et al., *Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells*. Cytotherapy, 2010. 12(1): p. 88-95.
- 12) Levi, B., et al., *Studies in adipose-derived stromal cells: migration and participation in repair of cranial injury after systemic injection*. Plast Reconstr Surg, 2011. 127(3): p. 1130-40.
- 13) Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic Transplants of Bone Marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. 6(2): p. 230-47.
- 14) Jaiswal, N., et al., *Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro*. J Cell Biochem, 1997. 64(2): p. 295-312.
- 15) Digirolamo, C.M., et al., *Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate*. Br J Haematol, 1999. 107(2): p. 275-81.
- 16) Lee, K., et al., *Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation*. Mol Ther, 2001. 3(6): p. 857-66.

- 17) Noël, D., et al., *Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials*. *Exp Cell Res*, 2008. 314(7): p. 1575-84.
- 18) Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells : their phenotype, differentiation capacity, immunological Features, and potential for Homing*. *Stem Cells*, 2007. 25(11): p. 2739-49.
- 19) Fraser, J.K., et al., *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. *Trends Biotechnol*, 2006. 24(4): p. 150-4.
- 20) Banas, A., et al., *Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. 24(1): p. 70-7.
- 21) Banas, A., et al., *IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury*. *Stem Cells*, 2008. 26(10): p. 2705-12.
- 22) Richard, N.M., Ramzi, S.C., *Tissue Repair: Cell Regeneration and Fibrosis*. ROBBINS BASIC PATHOLOGY 7 th edition, 2003. 3: p.61-78
- 23) Boyde, A., Hobdell, M.H., *Scanning electron microscopy of primary membrane bone*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1969. 99(1): p. 98-108.
- 24) Boyde, A., *Scanning electron microscope studies of bone*. 2 nd ed.vol 1. Bourne G.H.(ed). Academic Press. New York, 1972 : p. 259-310
- 25) Ochiya, T., Y.Yamamoto, and A. Banas, *Commitment of stem cells into functional hepatocytes*. *Differentiation*, 2010. (2): p. 65–73
- 26) Yang, K.L., et al., *Human adipose-derived stem cells for the treatment of intracerebral hemorrhage in rats via femoral intravenous injection*. *Cell Mol Biol Lett*, 2012. 17(3): p. 376-92.
- 27) Nakanishi, C., et al., *Gene and Protein Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived From Rat Adipose Tissue and Bone Marrow*. *Circulation Journal*, 2011. 75(9): p. 2260-2268.
- 28) Kim, W.S., et al., *Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts*. *J Dermatol Sci*, 2007. 48(1): p. 15-24.
- 29) Otsuru, S., et al., *Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 354(2): p. 453-8.
- 30) Otsuru, S., et al., *Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway*. *Stem Cells*, 2008. 26(1): p. 223-34.
- 31) Pegtel, D.M., et al., *Functional delivery of viral miRNAs via exosomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(14): p. 6328-33.

- 32) Kosaka, N., et al., *Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells*. J Biol Chem, 2010. 285(23): p. 17442-52.
- 33) Lai, R.C., et al., *Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury*. Stem Cell Res, 2010. 4(3): p. 214-22.
- 34) Bruno, S., et al., *Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury*. J Am Soc Nephrol, 2009. 20(5): p. 1053-67.
- 35) Katsuda, T., et al., *Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes*. Sci Rep, 2013. 3: p. 1197.
- 36) Furlani, D., et al., *Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy*. Microvasc Res, 2009. 77(3): p. 370-6.
- 37) Mohseny, A.B. and P.C. Hogendoorn, *Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad*. Stem Cells, 2011. 29(3): p. 397-403.
- 38) Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. Nature, 2007. 449(7162): p. 557-63.

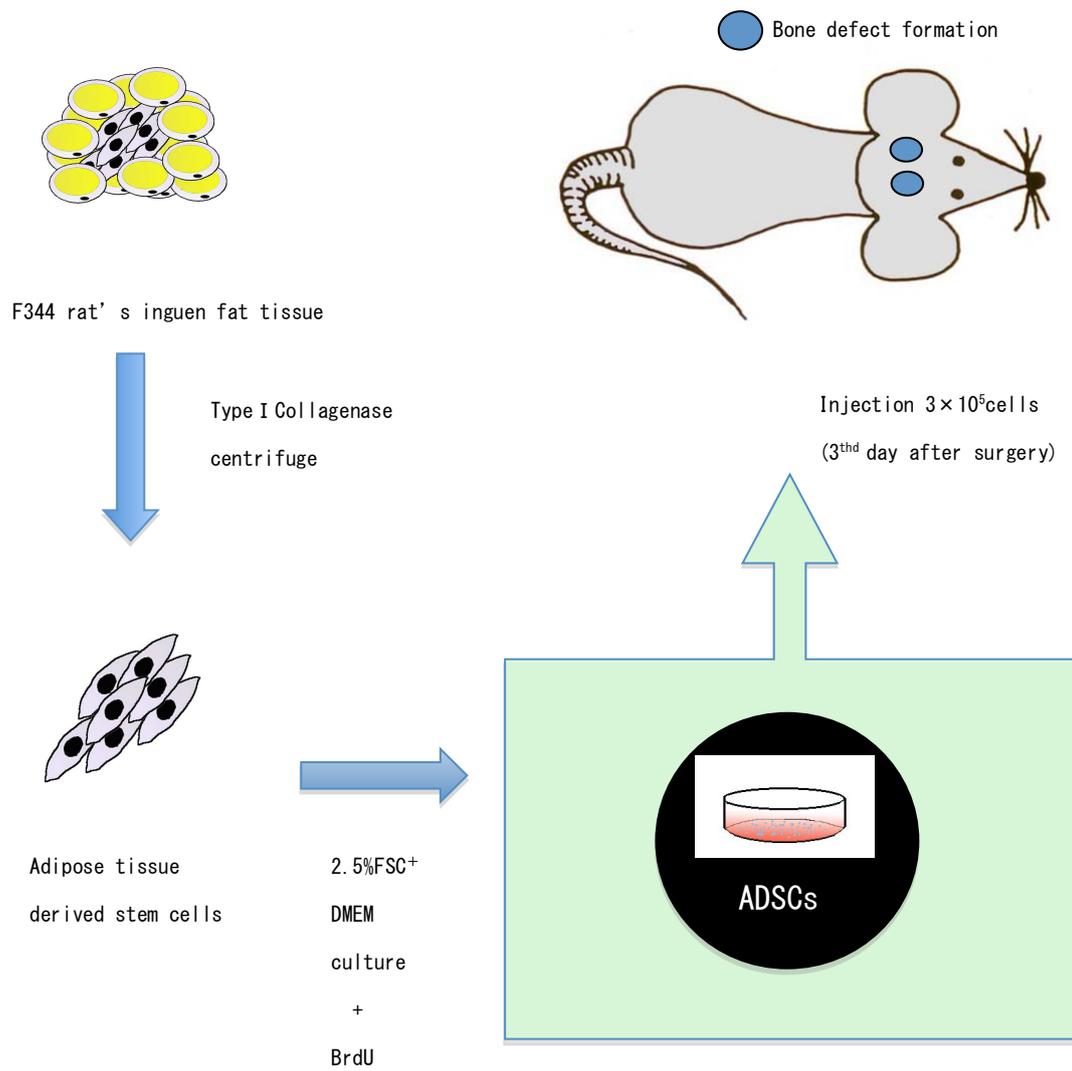


図1 ADSCs の分離培養方法と静脈内投与

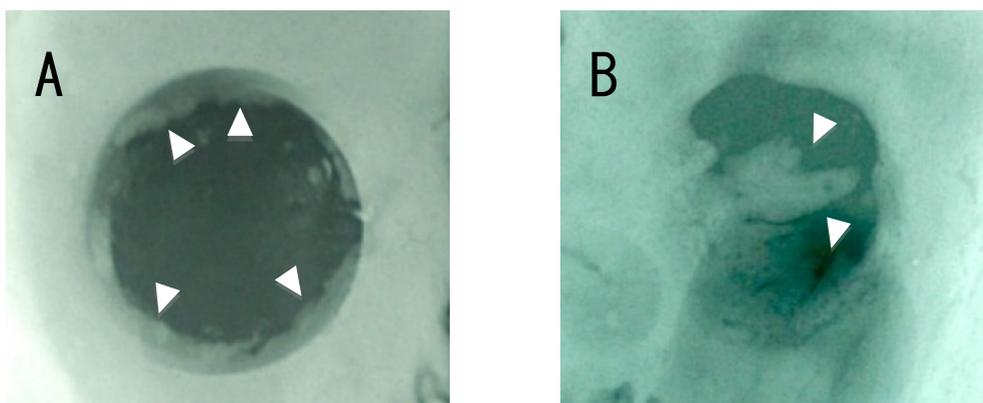


写真1 軟X線写真

写真A 対照群

写真B 静脈内投与群

写真A：対照群では骨欠損辺縁から内方に向かって不透過像(▶)が認められた。

写真B：静脈内投与群では辺縁からの広い面積の不透過像が認められた。

表 1 軟 X 線写真による骨欠損面積(4 週目)

dot

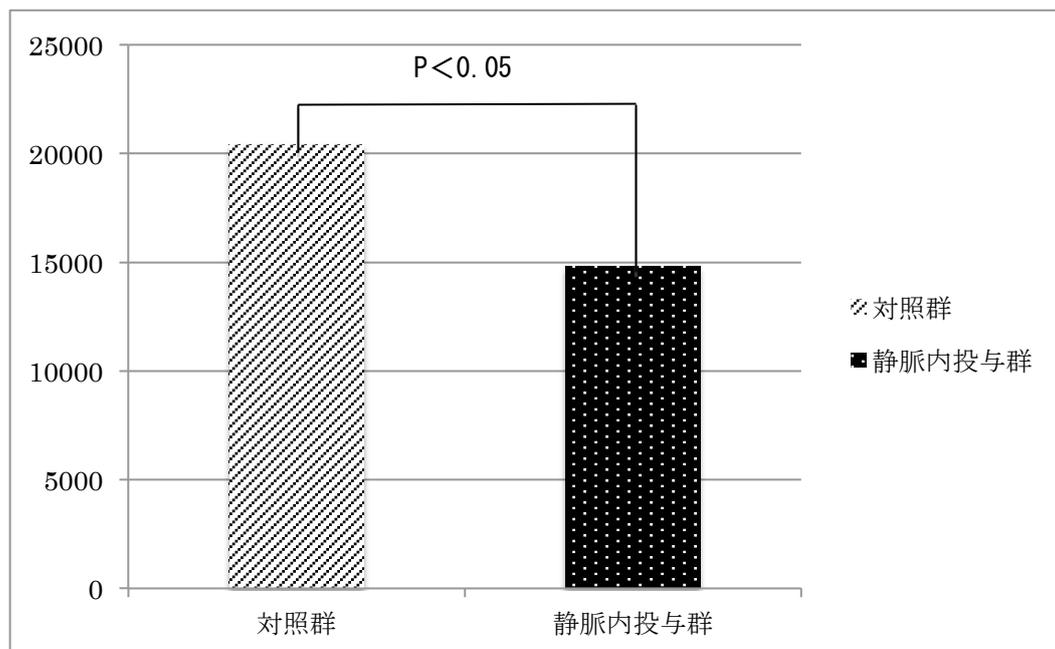


表 1 : 透過像面積(dot)の計測では統計学的に 5%水準で有意差が認められた。(P<0.05)

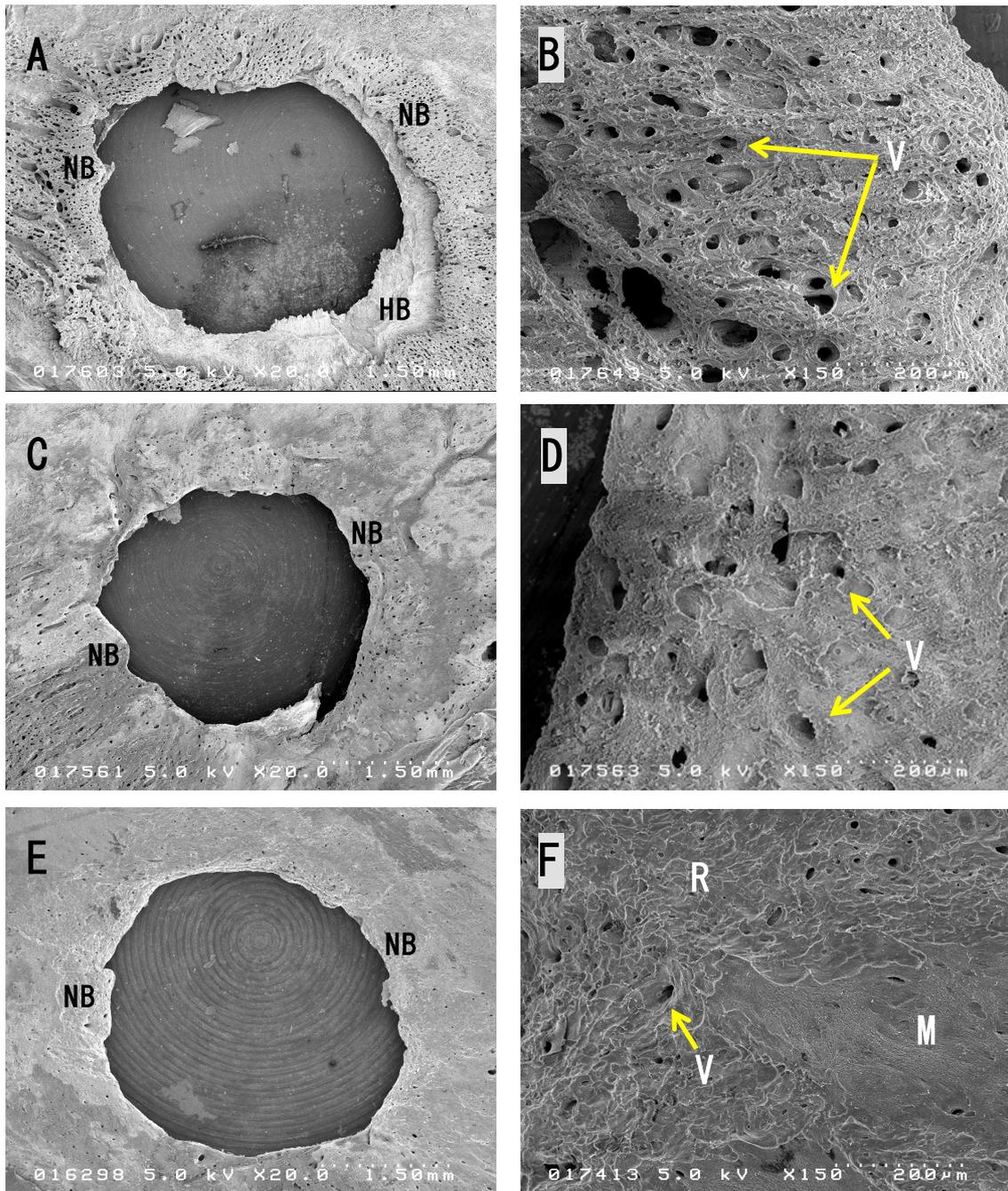


写真 2 走査型電子顕微鏡像 対照群

写真 2：対照群 1 週目では母骨(HB)の表面は新生骨(NB)に被覆されていない部分が見られ、新生骨は大小様々な血管腔(V)を伴った疎な梁状構造であった(A, B)。2 週目では新生骨は緻密になっているが骨欠損部面積に変化はなかった(C, D)。4 週目では成熟骨面(M)や広範囲な吸収窩(R)がみられた(E, F)。

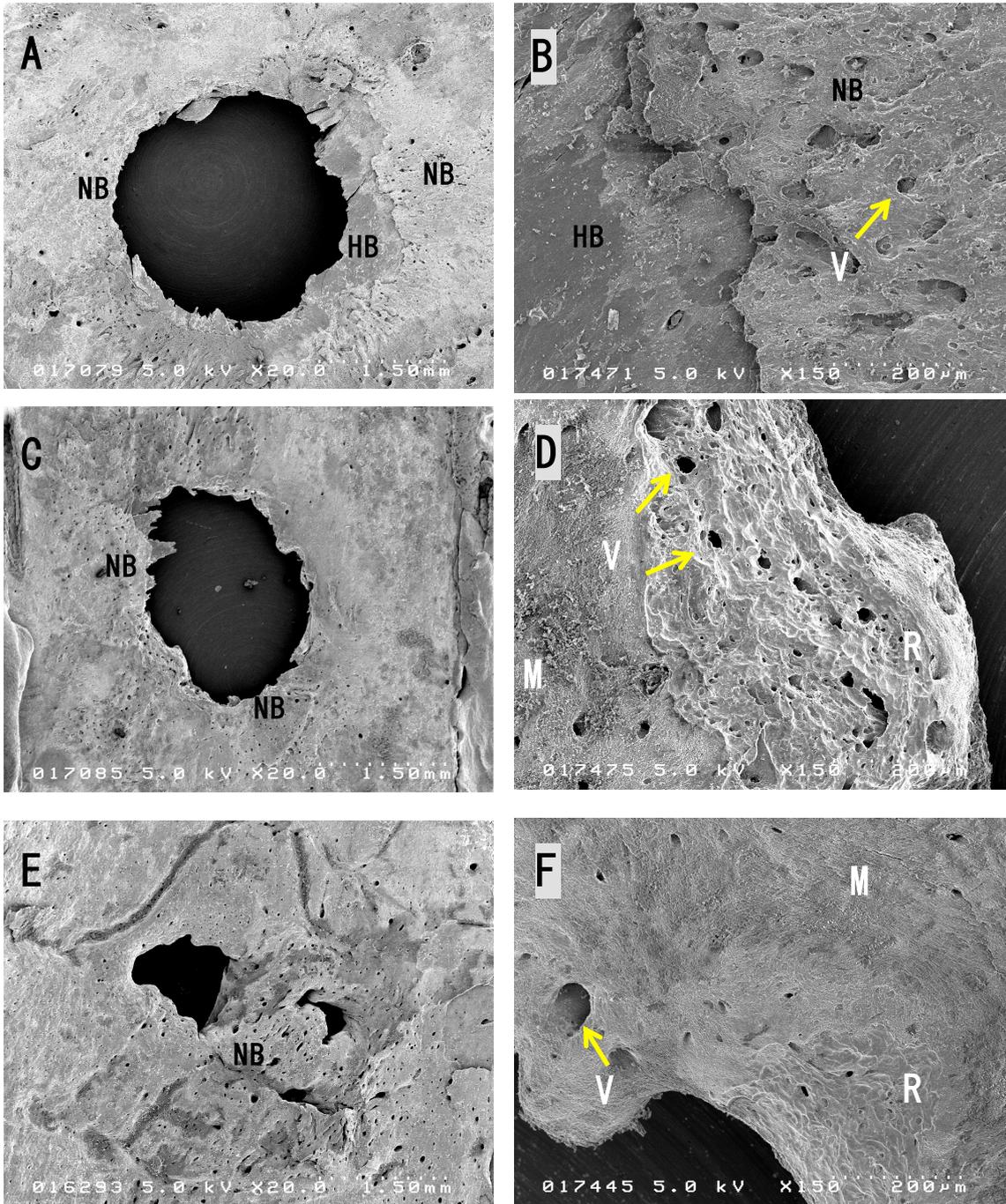


写真3 走査型電子顕微鏡像 静脈内投与群

写真3: 静脈内投与群 1週目では母骨(HB)の表面は新生骨(NB)に被覆されていない部分がみられたが, 新生骨は緻密になっていた(A, B). 2週目では骨欠損部の面積は縮小しており, また成熟骨面(M)や吸収窩(R)がみられた(C, D). 4週目ではさらに骨欠損部の面積は縮小しており, 成熟骨面(M)や吸収窩(R)がみられた(E, F).

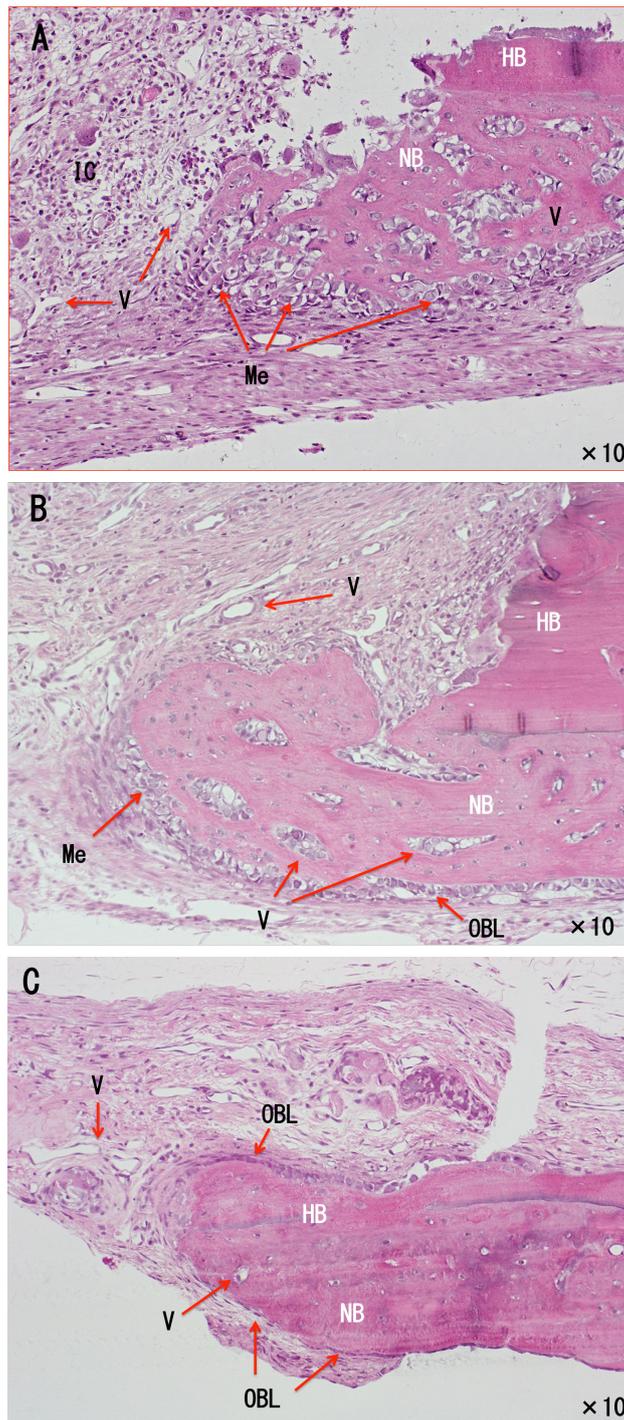


写真 4 光学顕微鏡像 対照群

写真 4 : 対照群 1 週目では新生骨 (NB) の骨梁はすう疎で、その外側に類円形の核が大きな間葉系細胞 (Me) が多くみられ、骨欠損部には炎症性細胞 (IC) が多く認められた (A)。対照群 2 週目では新生骨骨梁は緻密になり、骨欠損部の細胞成分は対照群 1 週目と比較して減少していた (B)。対照群 4 週目では新生骨は骨芽細胞 (OBL) に縁取られ、骨梁はさらに緻密になって血管 (V) も減少していた (C)。

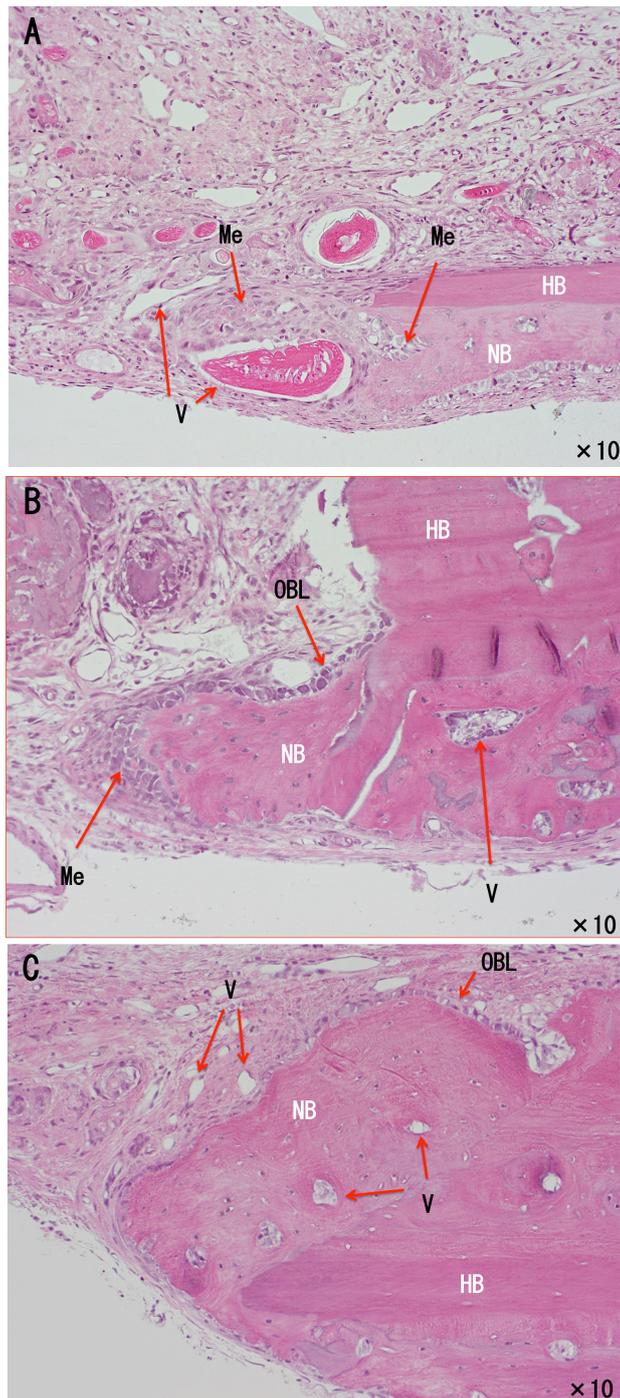


写真 5 光学顕微鏡像 静脈内投与群

写真 5：静脈内投与群 1 週目では新生骨骨梁は緻密で、血管(V)は少なかった(A)。静脈内投与群 2 週目では新生骨骨梁は緻密で、骨欠損断端部では類円形の核が大きな間葉系細胞(Me)がみられた(B)。静脈内投与群 4 週目では新生骨骨梁は母骨(HB)断端部を完全に被覆し、骨梁はさらに緻密になって血管(V)は減少していた。骨欠損部の細胞成分と血管(V)は多くみられた(C)。

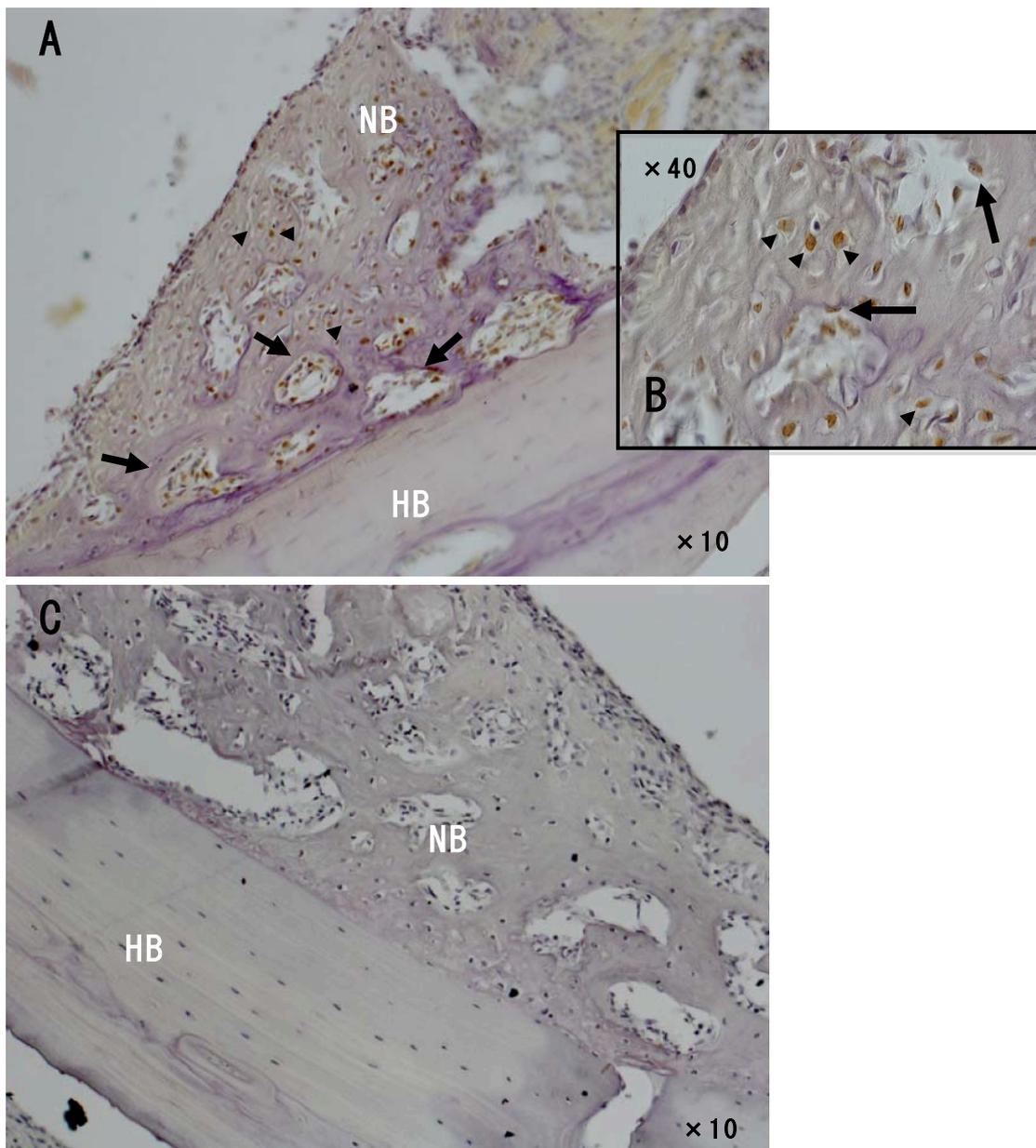


写真6 光学顕微鏡像 免疫染色後

写真6：静脈内投与群では抗 BrdU 陽性細胞は、新生骨内部に存在し骨細胞様(矢頭 ▶)にみられ、新生骨内部の血管壁(矢印 →)にもみられた。新生骨形成部以外にはみられなかった(A, B)。対照群では抗 BrdU 陽性細胞はみられなかった(C)。