

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

### 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 梶山 創太郎(福岡県)  
博士の専攻分野 博士(歯学)  
学位記番号 甲第438号  
学位授与年月日 平成27年3月13日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科  
(博士課程) 歯学専攻  
学位論文題目 Bone formation by human umbilical cord perivascular cells  
(臍帯組織由来幹細胞を用いた骨再生療法の検討)  
Journal of Biomedical Materials Research Part A  
DOI:10.1002/jbm.a.35396 平成27年2月11日発行  
論文審査委員 主査 教授 二藤 彰  
副査 教授 花田 信弘 副査 教授 五味 一博

### 内容の要旨

#### 【緒言】

再生医療には細胞(幹細胞)、足場、増殖因子(サイトカイン)という3要素による組織再生が必要である。幹細胞を用いた再生療法は、細胞と足場を組み合わせることにより自在に生体組織や臓器を再生させることができるため、ドナー不足や免疫拒絶という問題を抱える臓器移植にかわる医療として注目されている。これまで骨髄間葉系幹細胞(以下BMMSCs)は細胞ソースとして用いられているが、採取部位、採取量等に多くの問題を抱えている。そこで我々は新たな細胞ソースとしてヒト臍帯動・静脈周囲に存在する間葉系幹細胞(以下HUCPVCs)に注目した。HUCPVCsは医療廃棄物となった臍帯より採取するためドナーに新たな侵襲を加えることなく十分な細胞を確保できるメリットがある。また、主要組織適合遺伝子複合体(MHC) class IIのみられない細胞が存在すると報告されている。このことから今後他家移植への臨床応用細胞ソースとして期待されている。

これまでの我々の研究から骨髄幹細胞の培養上清(以下BM-CM)を用いてHUCPVCsを培養することでより効果的にHUCPVCsを骨芽細胞へと分化させる可能性があることを見いだしている。おそらくはBMMSCsから放出されるパラクライン因子がHUCPVCsに働きかけHUCPVCsを骨芽細胞へと分化させていると考えられる。

本研究ではHUCPVCsをBM-CMを用いて培養し、*in vitro*において分化の状態を確認し、分化させたHUCPVCsが*in vivo*において骨再生を引き起こすかについて検討する事を目的とした。

#### 【材料と方法】

##### *In vitro*

HUCPVCsはトロント大学より提供された、臍帯組織をSarugaserらの方法によって分離、培養した細胞を用いた。BMMSCsは理化学研究所から購入した不死化した細胞を用いた。HUCPVCsはflow cytometryによりCD105, CD73に陽性、CD45, CD34, MHC class IIに陰性を示した。実験群は以下の5群として*in vitro*での実験を行った。

HUC(-): HUCPVCsを非石灰化誘導培地で培養

HUC(+): HUCPVCsを石灰化誘導培地で培養

CM-HUC: HUCPVCsをOsugiらの方法により作製したBM-CMを加えた石灰化誘導培地で培養

BM(-): BMMSCsを非石灰化誘導培地で培養

BM (+) : BMSCs を石灰化誘導培地で培養

#### ① RT-PCR

各実験群を 2・4 週間培養後、RT-PCR にて Col I, Runx2, ALP, BSP の硬組織関連遺伝子発現を GAPDH で標準化した後、比較した。

#### ② ALP 活性の測定と ALP 染色

各実験群を ALP assay では 2・4 週間培養、ALP staining では 4 週間培養後、ALP assay, ALP staining を行い、分化の状態を確認した。

#### *In vivo*

##### ① 移植材料

担体として直径 5 mm, 厚さ 0.8 mm のコラーゲンスポンジを用いた。HUCPVCs (Passage3) と BMSCs を  $1.0 \times 10^6$  cells/ml に PBS 中にて調整し、担体を設置した遠沈管に入れ、900 rpm で 1 分間遠心することで担体に播種した。1 週間培養後、ラット頭蓋骨への移植材料として用いた。

##### ② 実験動物

6 週齢の雄性 Wistar 系ラットにペントバルビタールを用いて腹腔内注射で麻酔した。頭蓋冠に二つの円形の骨欠損(全層、直径 5 mm) を作製し、実験材料を欠損部に移植した。実験群は、sham : 何も移植しない群、Control, CM, BM, HUC, CM-HUC とした。移植後縫合し、抗生剤を腹腔内注射した。また、免疫抑制薬を投与し免疫抑制状態にした。タイムポイントは 4 週とした。

##### ③ 免疫組織化学

ラット組織での BM-CM にて培養した HUCPVCs の分化を同定するために凍結脱灰切片にて免疫組織化学による分析を行った。Osteocalcin (hOC) antibody はヒト骨芽細胞を検出するために用いた。Anti-human nuclear antigen (hNA) antibody はヒトの細胞のマーカーとして用いた。Hoechst33342 を、核染色のために適用した。

##### ④ 放射線学的観察

頭部頭蓋冠を含む組織を X 線マイクロ CT を用いてマイクロ CT 分析を行った。画像を収集して三次元構築ソフトを用いて、3D 画像にして分析した。また、新たに再生された骨の体積を比較した。

##### ⑤ 組織学的観察

頭部頭蓋冠を含む組織を固定脱灰後、段階的エタノールを用いて脱水し、トルエンにて溶剤置換され、パラフィンに包埋した。標本を  $6 \mu\text{m}$  の厚さの組織切片を作るために、冠状方向に切断し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。組織学的分析は、光学顕微鏡を用いて行った。

##### ⑥ 統計学的分析

*in vitro* と *in vivo* の結果について、各群の標準誤差を算出し、統計学的評価は Kruskal-Wallis non-parametric 検定を用いた。p 値が  $< 0.05$  の時統計学的有意差が見られたと評価した。

#### 【結 果】

##### ① *In vitro*

RT-PCR において、COL I は 2・4 週の全ての群で遺伝子発現が認められた。Runx2 では 2 週での HUC (+) と CM-HUC において遺伝子発現を認めた。ALP では 2・4 週の BM 群と 4 週の CM-HUC で遺伝子発現が認められた。BSP では 4 週の BM 群と CM-HUC で遺伝子発現が認められた。ALP 活性の測定では、BM (-) と比較して BM (+) で ALP 活性の上昇が認められた。また、4 週において CM-HUC は HUC (-), HUC (+) と比較して有意に高い ALP 活性の上昇が認められ、ALP 染色陽性細胞が認められた。

##### ② *In vivo*

マイクロ CT 分析によって測定した画像を三次元構築し、新たに再生された骨の体積を比較した。新生骨再生部の体積はそれぞれ、sham は  $0.8 \pm 0.8 \text{ mm}^3$ , Control は  $1.6 \pm 1.5 \text{ mm}^3$ , CM は  $3.8 \pm 1.4 \text{ mm}^3$ , BM  $2.4 \pm 1.2 \text{ mm}^3$ , HUC は  $4.8 \pm 1.1 \text{ mm}^3$ , CM-HUC は  $5.4 \pm 1.0 \text{ mm}^3$  であった。HUC と CM-HUC において Control や sham と比較して有意に高い新生骨再生が見られた ( $p < 0.05$ )。

組織学的分析においても HUC と CM-HUC は、Control や sham と比べて、高い骨再生を示した。これらの群では骨梁の形成が認められ、CM-HUC ではより厚みのある骨梁の形成が認められた。BM, CM では骨細胞が点状に存在していた。

Control では担体の孔に結合組織が満たされていた。sham では骨膜のみ認められた。炎症反応はどのグループでも観察されなかった。

ヒト細胞の普遍的なマーカーである hNA 抗体を用いたところ、CM-HUC 群の細胞の核にて陽性反応を示した。また、Hoechst33342 を用いたところ、同群のラットとヒトの細胞の核が検出された。この2つの像を重ね合わせると、ラット体内でのヒトの細胞の生着が認められた。Control 群では hNA 抗体に陽性反応は見られなかった。さらに、骨形成マーカーである OC 抗体では、hNA 抗体にて染色された細胞の細胞質を染色した。このことから移植した CM-HUC の細胞が骨芽細胞へと分化したことが示唆された。

#### 【考 察】

本研究で得られた結果の一部は我々が予期したものに反していた。

第一に、*in vitro* での結果は、*in vivo* での結果を反映していなかった。*In vitro* において、ALP assay や ALP 染色は培養細胞の骨形成の指標として用いられる。しかし、ALP 活性で非常に高い活性を示した BM (+) 群は、*in vivo* において骨形成が見られなかった。この結果は、*in vitro* で得られた結果が *in vivo* での細胞の挙動を予測するとは限らないことを示した。

第二に、我々が使用した不死化された骨髄幹細胞は *in vitro* において石灰化傾向を示したものの、*in vivo* では Osugi らの報告とは一致しなかった。Osugi らは初代培養ヒト骨髄細胞からの培養上清は、ラット骨髄細胞の分化を促進することを示している。今回本実験では、利便性のために不死化された骨髄幹細胞を選択した。また、ドナーは 91 歳の女性に由来し、E6、E7 および hTERT を発現させ不死化していた。これは不死化される前に、元の細胞集団はほとんど骨形成の可能性がなかったと考えられる。

第三に、我々の結果は幹細胞が宿主の環境によってその場に適した分化を引き起こすことを示した。HUC 群と骨形成の見られなかった群 (sham, Control, BM) の違いは、宿主の環境が骨形成に関与したのではないと思われる。実際、統計学的に HUC や CM-HUC と sham や Control との間には骨形成量に有意差が認められた。宿主の環境は、遊走した細胞集団の分化に影響を及ぼすと予想される。

最後に、我々はグループごとの n 数が少ないことを認める。骨形成量に見られる傾向はより多くの n 数によって統計的により有意になったと考えられる。

#### 審査の結果の要旨

再生医療には細胞 (幹細胞)、足場、増殖因子 (サイトカイン) という 3 要素による組織再生が必要である。幹細胞を用いた再生療法は、細胞と足場を組み合わせることにより生体組織や臓器を再生させることができるため、ドナー不足や免疫拒絶という問題を抱える臓器移植にかわる医療として注目されている。これまで骨髄間葉系幹細胞 (以下 BMMSCs) が細胞ソースとして用いられているが、採取部位、採取量等に多くの問題を抱えている。本論文申請者らは新たな細胞ソースとしてヒト臍帯動・静脈周囲に存在する間葉系幹細胞 (以下 HUCPVCs) に注目した。本研究では HUCPVCs を骨髄幹細胞の培養上清 (以下 BM-CM) を用いて培養し、*in vitro* において骨芽細胞へと分化するか、そして分化させた HUCPVCs が *in vivo* において骨再生を引き起こすかについて検討する事を目的とした。*in vitro* で HUCPVCs を培養し、RT-PCR により遺伝子発現を検討したところ、BM-CM を加えた HUCPVCs (以下 CM-HUC) で、培養後 2 週あるいは 4 週において Runx2, ALP, BSP の遺伝子発現が増加した。また CM-HUC は HUCPVCs を石灰化誘導培地で培養した場合 (HUC+) とくらべて有意に高い ALP 活性の上昇が認められた。次に *in vivo* でラット頭蓋冠に骨欠損 (全層、直径 5 mm) を作製し様々な条件で培養した細胞を播種したコラーゲンスポンジを埋入した。4 週後に組織を回収し、マイクロ CT 分析、組織学的観察により評価した。マイクロ CT 分析により HUC と CM-HUC において Control や sham と比較して有意に高い新生骨再生が見られた。組織学的分析においても HUC と CM-HUC は、Control や sham と比べて、高い骨再生を示した。さらにヒト細胞の普遍的なマーカーである hNA 抗体と骨形成マーカーである OC 抗体を用いて CM-HUC について免疫染色を行ったところ、hNA 抗体にて染色された細胞の細胞質に OC の局在が見られた。このことから移植した CM-HUC の細胞が骨芽細胞へと分化したことが示唆された。

以上、本研究における結果は、HUCPVCs が示す骨分化能を *in vitro*, *in vivo* の両面から検討したものであり、臨床応用においても HUCPVCs が骨再生の細胞ソースとして有用である可能性を示した知見と考えられる。よって、本論文は博士 (歯学) の学位請求論文として十分な価値を有すると判定した。