

主論文の要旨

**Conditioned media from mesenchymal stromal cells
and periodontal ligament fibroblasts under cyclic
stretch stimulation promote bone healing in mouse
calvarial defects**

〔 伸展刺激下で得た間葉系幹細胞・歯根膜線維芽細胞由来培養上清は
マウス頭蓋骨欠損モデルにおける骨治癒を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

荻須 宏太

【緒言】

外傷や腫瘍などに起因する骨欠損の再建には自家骨や同種骨、異種骨、人工骨が用いられているが、自家骨であれば採取量の制限や採取部の侵襲、同種骨や異種骨、人工骨では感染やアレルギーのリスクがしばしば問題となる。我々はこれまでヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) を骨欠損部に移植し良好な結果を得てきたが、細胞採取時の侵襲や感染のリスク、細胞の腫瘍化などの問題点が指摘されている。そこで、細胞移植に代わる方法として幹細胞培養後の培養上清 (conditioned medium 以下 CM) を用いる方法を考案し、ラット頭蓋骨欠損部にヒト骨髄由来間葉系幹細胞由来培養上清 (hMSC-CM) を投与することで骨形成が促進されることを報告した。一方、過去の報告では細胞培養時に機械的刺激を加えることで CM 中の成長因子の組成が変化し、特に伸展刺激下で培養すると骨形成因子の発現が上昇することが知られている。臨床では整形外科、顎顔面外科領域における仮骨延長術や、矯正歯科治療における歯の移動など機械的刺激を応用した治療が実施されており、機械的刺激と骨形成は関わりが深い。本研究の目的は伸展刺激を加えて得た CM が、通常条件で得た CM よりも骨再生に適していることを示すことである。

【材料および方法】

hMSCs およびヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLFs) をそれぞれシリコンチャンバーに播種し、70~80%コンフルエントに達した後、伸展刺激群 (以下 Stretch 群) は伸展周期 0.17 ヘルツ (10 往復/min)、伸展率 5% の刺激を与えながら、非伸展群 (以下 Non-stretch 群) については通常条件下でそれぞれ 24 時間培養した。その後、各細胞の Stretch 群、Non-stretch 群の CM および細胞を 1500 rpm/5min の遠心分離によりそれぞれ回収した。細胞は real time-qPCR を、CM は ELISA、Tube formation assay、Alizarin red S 染色による解析で評価した。*in vivo* では 10 週齢、オスの ICR マウスを用いて生検用トレフィンプンチにより直径 2 mm の頭蓋骨欠損モデルを作成した。欠損部にコラーゲンスポンジを担体として各細胞由来の Stretch 群 CM (以下 S-CM)、Non-stretch 群 CM (以下 N-CM) および DMEM (DMEM 群) を投与した。欠損のみの Defect 群についても設定した。2 週間後に免疫染色で血管新生を、4 週間後に μ CT およびヘマトキシリンエオジン染色で骨形成についてそれぞれ評価した。

【結果】

細胞の real time-qPCR では HPLFs、hMSCs とともに Stretch 群で骨形成因子および血管新生因子の発現が上昇していた (Figure 1)。CM 中の骨形成、血管新生因子含有量は ELISA では両細胞とも Stretch 群で BMP2/4、VEGF-A が増加、HPLF-CM では PDGF-AA も Stretch 群で増加しており、タンパクレベルでも有意な差を認めた。細胞群間の比較では BMP2 の S-CM 群および VEGF-A の両群に有意差を認めた (Figure 2)。Tube formation assay では各細胞とも N-CM 群と比較して S-CM 群では管腔形成部の面積、長さ、枝分かれ数の全項目において増加を認めた。また細胞間の比較においても HPLFs

と比較して hMSCs で全項目での増加を認めた (Figure 3)。Alizarin red S 染色では両細胞とも N-CM 群と比較して S-CM 群では染色度が高く、石灰化能は伸展刺激により上昇していた。また、細胞間での比較では HPLFs と比較して hMSCs で石灰化が亢進していた (Figure 4)。in vivo において、 μ CT での評価では Defect 群、DMEM 群と比較して N-CM 群、S-CM 群とも骨体積比は増加しており、両細胞とも S-CM 群の方が N-CM 群より増加を認めた。一方で HPLFs 群と hMSCs 群との間では差を認めなかった (Figure 5)。免疫染色では Defect 群、DMEM 群と比較すると N-CM 群、S-CM 群とも新生血管の面積は増加しており、両細胞とも S-CM 群の方が N-CM 群と比較して有意に増加していた。HPLFs と hMSCs との間では差を認めなかった (Figure 6)。

【考察】

in vitro において過去の報告と同様にいずれの細胞においても CM 中の骨形成因子、血管新生因子が伸展刺激により増加し、石灰化能、管腔形成能の評価においても Stretch 群、Non-stretch 群の間で有意差を認め、in vivo でも各細胞において N-CM 群と比較して S-CM 群で骨形成、血管新生が有意に増加していたことから伸展刺激を加えることで骨再生に有効な CM が得られたことが明らかになった。過去の報告では細胞種や、伸展刺激の強度により上昇する因子や上昇の度合いは様々であり、これらの条件を変化させる事でより有効な CM を得られる可能性がある。本研究では従来用いてきた hMSCs に加え、歯根膜由来である HPLFs を用いた。これは歯科矯正治療における歯の移動では牽引側で骨の添加が見られることから、高い骨形成能を有する可能性が考えられたためである。結果、in vitro において hMSCs には劣るものの HPLFs でも CM の石灰化能、管腔形成能を認め、伸展刺激によりさらに上昇した。一方 in vivo では hMSCs と HPLFs との間の比較において骨形成、血管新生能に差は認めなかった。今回観察した以外の因子が関わっている可能性があると考えられ、今後さらにマイクロアレイやサイトカインアレイ等で網羅的な解析を検討する必要があると考えられた。本研究では CM 中の骨形成、血管新生因子の含有量がともに増加し、in vivo でも投与部の骨再生、血管新生がともに増加していた。過去の報告でも血管新生は幹細胞や成長因子の輸送などを介して骨再生を促進する重要な役割を担っていることが報告されていることから、本研究においても血管新生が骨再生に重要な役割を果たした事が示唆された。

【結論】

伸展刺激下で得た細胞培養上清が血管新生を促進することで骨再生を促す事が示された。