

学位論文

「Osteogenic Potential, Multipotency, and Cytogenetic Safety of Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells (hBT-MSCs) after long-term Cryopreservation.」

(長期凍結保存されたヒト骨組織由来間葉系細胞における
多分化能・骨形成能と安全性)

指導教授名 内沼 栄樹

申請者氏名 熊澤 憲一

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

唇顎口蓋裂患者は顎裂部骨移植年齢以前にも初回口唇裂形成手術や口蓋裂形成手術の加療がある。術野に隣接した骨組織より自己骨組織由来間葉系細胞を単離・長期凍結保存し、顎裂部骨移植時に凍結保存されたその間葉系細胞を培養増殖させ移植骨に用いることができれば、患者に対する負担を軽減できる可能性がある。しかし自己ヒト骨組織由来間葉系細胞(human Bone Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells: hBT-MSCs)を臨床応用していくためには、10 年以上の凍結保存が必要になる。本研究では、当科にて 10 年以上凍結保存された hBT-MSCs を解凍し培養を行い、in vitro と in vivo での評価を行った in vitro の評価として、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、カルシウム(Ca)産生能の評価を行った。骨分化誘導後、1 週後、2 週後、3 週後で検体を採取し student's T-test で統計学的に評価した。ALP 活性は骨分化誘導群、非分化誘導群の双方で認められたが、1~3 週後のすべてにおいて、骨分化誘導群が非分化誘導群に比べ、有意に高値であった(1 週後: $P=0.04$ 2 週後: $P=0.01$ 3 週後: $P=0.03$ 。) Ca 産生能は非分化誘導群では産生を認めなかったが、骨分化誘導群では、2 週後と 3 週後に Ca 産生を認めた。Ca 産生能評価はアリザリンレッドによる染色も行い Ca の産生を確認できた。また、RT-PCR による Runx-2, Osterix, Osteocalcin の発現を評価し、ウィルコクソン符号順位と検定による統計学的な評価を行った。

Runx-2 は骨分化誘導群で 1 週後 ($P=0.008$) と 3 週後 ($P=0.03$) に有意に高い発現を認めた。Osterix, Osteocalcin は 3 週目で骨分化誘導群が有意に高い発現を認めた。(osterix: $P=0.03$, Osteocalcin: $P=0.03$) ALP 活性と Ca 産生能では、非骨分化誘導群でも ALP 活性の経時的な変化を示すことから保存された間葉系細胞の中には前骨芽細胞に類似した細胞が存在していることが示唆され、またこの細胞を骨分化誘導することで ALP の活性が有意に上昇したことは、保存細胞が前骨芽細胞に分化したと考えられた。さらに Ca 産生能は骨分化誘導群でのみ認めたことから、凍結保存細胞の中には分化した前骨芽細胞はあまり含まれておらず、分化度の低い前骨芽細胞に類似した細胞が多いと思われた。Runx-2, Osterix, Osteocalcin の発現ではいずれも発現も骨誘導後 3 週目に有意に高く、これは hBT-MSCs は元来骨細胞に起源を持つ細胞群であることを意味し、前述の「前骨芽細胞に類似した細胞が多い」との推論と一致する結果である。また多分化能評価のため脂肪分化誘導を行い、オイルレッド染色にて脂肪細胞への分化を確認した。これにより凍結保存された hBT-MSCs に未分化な幹細胞が存在することも確認された。

in vivo での評価は動物実験を行い、解凍・再培養した凍結保存細胞を、骨分化誘導群と非骨分化誘導群とにわけて担体であるハイドロキシアパタイト(HA)のディスク上に播種し、ヌードマウス皮下に移植した。10 週後に取り出し、HE 染色とヒトオステオカルシン免疫染色による骨形成評価を行ったところ、骨の新生がみとめられ、また新生骨はヒトオステオカルシン陽性であった。非骨分化誘導群でも 4 例中 1 例で骨形成を認めたが、骨分化誘導群で、より多くの骨組織が産生されたことは、凍結保存骨組織由来細胞には未分化な細胞と、前骨芽細胞類似の細胞が含まれていることを裏付ける結果であると考えられた。

これらのことから、凍結保存細胞は 10 年以上経過していても、骨形成能、多分化能が維持されていることが確認できた。

また、長期間凍結保存された細胞を臨床に用いるには安全性評価が必要であり、染色体の形態検査、がん抑制遺伝子である p53 遺伝子の異常の有無とがん遺伝子の一つである myc 遺伝子の発現の評価を行った。形態学的検査は G-band 法を用いた。G-band 法は当科で 10 年以上凍結保存されている検体のうち無作為に選んだ 8 検体に対し行った。遺伝子検索は 10 年以上凍結保存された 3 検体に対して行った。これらの検査では異常は認められなかった。

これらのことより、初回手術時に得られた骨組織由来細胞を凍結保存、それを骨移植が必要な時期まで保存し、凍結保存細胞を移植骨として使用し、患者の負担を軽減できる可能性がある。さらに他の骨移植が必要になるような疾患においても骨採取の負担を軽減できる可能性があると考えられた。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 凍結保存されている検体 -----	1
2-2. 再培養と骨分化誘導および脂肪分化誘導-----	2
2-3. 凍結保存細胞の特性の調査と評価	
2-3-1. アルカリフォスファターゼ活性の測定-----	2
2-3-2. カルシウム産生能-----	3
2-3-3. アリザリンレッドSによるカルシウムの染色-----	3
2-3-4. オイルレッドを用いた脂肪の染色-----	3
2-3-5. RT-PCR による Runx-2, Osterix, Osteocalcin の発現の評価-----	3
2-4. 動物実験による凍結細胞の骨形成能の評価	
2-4-1. ハイブリッド型人工骨の準備-----	4
2-4-2. 動物での実験-----	4
2-4-3. 組織学的評価-----	4
2-5. 凍結保存細胞の安全性評価-----	5
3. 結果	
3-1. 凍結保存細胞の細胞特性	5
3-1-1. アルカリフォスファターゼの活性-----	5
3-1-2. カルシウム産生能-----	5
3-1-3. アリザリンレッドSによるカルシウムの染色-----	5
3-1-4. オイルレッド染色-----	6
3-1-5. RT-PCR による Runx-2, Osterix, Osteocalcin の発現の評価-----	6
3-2. 動物実験による組織学的骨形成能の評価-----	6
3-3. 凍結保存細胞の安全性-----	6
4. 考察	
4-1. 長期保存した骨組織由来間葉系細胞の多分化能・骨形成能-----	6
4-2. 長期保存された骨組織由来間葉系細胞の細胞学的安全性-----	7
4-3. 長期保存した骨組織由来細胞の臨床学的意義-----	8
5. 総括 -----	9

6. 今後の課題	9
7. 謝辞	9
8. 引用文献	10
9. 業績目録	12
10. 図表	14

1. 序論

口唇口蓋裂患者の治療において、顎裂部を骨組織により再建することは、良好な咬合を得るために重要な治療である。その治療として当科では初回手術の口唇形成術時に粘膜骨膜弁により顎裂閉鎖を行い混合歯列期(6歳～12歳)における顎裂部骨移植術を行ってきた。Millard¹⁾が報告しているように、顎裂部に対する骨移植術は自家腸骨海綿骨移植が一般的であるが、混合歯列期に行われるため、腸骨から十分な量の海綿骨を採取できないことや、また移植骨が吸収されてしまうために繰り返し手術が行われることがある。これは患者にとって大きな負担になっている。

唇顎口蓋裂患者は顎裂部骨移植年齢以前にも初回口唇裂形成手術や口蓋裂形成手術の加療がある。術野に隣接して上顎骨、下鼻甲介、口蓋骨等があり、そこから自己骨組織由来間葉細胞を単離・長期凍結保存し、顎裂部骨移植時に凍結保存されたその間葉系細胞を培養増殖させ移植骨に用いることができれば、患者に対する負担を軽減できる可能性がある。近年顎顔面外科領域ではヒト骨組織由来間葉系細胞の臨床応用について報告が散見されるようになってきている。²⁾³⁾

松尾ら⁴⁾は3～6か月間凍結保存されたヒト骨組織由来間葉系細胞を骨分化誘導後に自己血清で培養し *in vitro* と *in vivo* での骨形成能について報告し、骨形成能が保たれていることを報告した。しかし、凍結保存期間は最長6か月であり、臨床応用を目指すには短すぎる。凍結保存後も骨形成能が維持されているとする報告もあるが、その凍結保存期間は、長くても3年である。⁵⁾⁶⁾自己ヒト骨組織由来間葉系細胞を顎裂部骨移植術に臨床応用していくためには、10年以上の凍結保存が必要になると思われる。

本研究では、10年以上凍結保存されたヒト骨組織由来間葉系細胞を解凍し培養を行い、その細胞特性として、*in vitro* では脂肪分化誘導と骨分化誘導後の経時的な骨マーカーの推移、*in vivo* では骨形成能の評価をそれぞれ行った。

また、長期間凍結保存された細胞を臨床に用いるには、細胞の安全性評価が必要になる。そこで本研究では安全性評価として染色体の形態検査、がん抑制遺伝子である p53 遺伝子の異常の有無とがん遺伝子の一つである myc 遺伝子の発現の評価を行った。

2. 方法

本研究は北里大学倫理委員会の承認を得て行った。(承認番号：B12-101.)

また動物実験に関しては、動物実験委員会の承認を得て行った。(承認番号 2012-068)

2-1. 凍結保存されている検体

今回の研究には当科にて凍結保存されている骨組織由来間葉系細胞を用いた。

凍結保存は以下のようにして行った。当科にて行われた顎裂部骨移植時に得られた余剰骨を粉上にして 25cm² のフラスコに播種した。培養には細胞培養液 α -MEM(Life Technologies Corporation, CA, USA), 10%FBS(Sigma - Aldrich, MO, USA), 抗菌薬

(penicillin、streptomycin)，を加え、37℃、5%CO₂で培養を行った。
培地交換は週に2回行った。コンフルエントになった状態で75cm²のフラスコで第2継代を行った。再度コンフルエントになった状態で細胞を集めて、血清を含むCELLBANKER™(Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd., Fukushima, Japan)にサスペンドし-80℃で凍結保存した。この保存されている検体のうち10年以上経過しているもの7検体を研究に用いた (Table.1)

2-2. 再培養と骨分化誘導および脂肪分化誘導

凍結保存されている細胞は室温にて解凍し、75cm²フラスコに播種し、細胞培養液 α -MEM、10%FBS (MP Biomedicals, LLC, CA, USA)、抗菌薬 (ペニシリン、ストレプトマイシン) ,1ng/mL bFGF にてコンフルエントになるまで培養を行った。必要数になるまで増やしたのちに、6 well プレートに1 well につき 1.0×10^5 の細胞を播種した。播種したのちに、分化誘導をかけないものは今までと同様の細胞培養液を用い培養を行った。骨分化誘導は α -MEM, 10%FBS, 抗菌薬 (ペニシリン、ストレプトマイシン), 10^{-7} mol/L デキサメタゾン (Sigma – Aldrich MO, USA), 0.05mM アスコルビン酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan) ,10mM β -グリフェロフォスフェイト (Calbiochem, CA, USA)を加えた培地でおこない、37℃、5%CO₂で培養した。培養液は週に2回交換した。脂肪分化誘導は α MEM, 10%FBS, 抗菌薬 (ペニシリン、ストレプトマイシン) , 1μ Mデキサメタゾン,0.01mg/ml インスリン, 0.2mM インドメタシン, 0.5mM イソブチルメチルキサンチンを加えた培地で行った。

2-3. 凍結保存細胞の特性の調査と評価

2-3-1. アルカリフォスファターゼ活性

凍結保存細胞を室温で解凍したのち 6-well 培養プレートのそれぞれの well に 1×10^5 個ずつ播種した。骨分化誘導培地で 37℃、5%CO₂ で培養を行った。骨分化誘導培地は1週間に2回交換したアルカリフォスファターゼ活性は、骨分化誘導を行った後、1週後、2週後、3週後で検体を採取。骨分化誘導を行ったものと、行わなかったものを比較した。TRACP&ALP Assay Kit(タカラバイオ株式会社 TAKARA BIO Inc., Shiga、japan)を用い、スタンダードには Alkaline Phosphatase(Calf intestine)(TAKARA BIO Inc., Shiga、japan)を用いて活性の測定を行った。検体のタンパク量を Micro BCA Protein Assay(Thermo scientific, MA, USA)を用いて算出し補正を行った。

統計学的評価は student's T – test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

2-3-2. カルシウム産生能

凍結保存細胞を室温で解凍したのち 6-well 培養プレートのそれぞれの well に 1×10^5 個ずつ播種した。骨分化誘導培地で 37°C , 5% CO_2 で培養を行った。骨分化誘導培地は 1 週間に 2 回交換した。検体の採取は、骨分化誘導をおこなった後 1 週後, 2 週後, 3 週後で行い, 骨分化誘導を行わなかったのものと比較した。カルシウムの assay には, エスパ・Ca(ニプロ株式会社, 大阪, 日本)を用いた。統計学的評価は student's T-test を用い, $p < 0.05$ を有意とした

2-3-3. アリザリンレッドを用いたカルシウムの染色

凍結保存細胞を室温で解凍したのち 6-well 培養プレートのそれぞれの well に 1×10^5 個ずつ播種した。 37°C , 5% CO_2 で培養し, 骨分化誘導培地は 1 週間に 2 回交換した。アリザリンレッド染色は骨分化誘導後, 1 週後, 2 週後, 3 週後に行った。

アリザリンレッド染色は, PBS で 2 回洗浄し, 100%エタノールで固定。その後, 蒸留水で 2 回洗浄し, 室温のもと, 1.3%アリザリンレッド溶液で 2 分染色した。染色の後, 余分な染色液を蒸留水で 3 回洗いながし乾燥させた。

2-3-4. オイルレッドを用いた脂肪の染色

凍結保存細胞に脂肪分化誘導をかけたのち脂肪細胞が認められるかを確認するため, オイルレッドと用いた脂肪の染色を行った。

凍結保存細胞を室温で解凍した後, 6-well 培養プレートのそれぞれの well に 1×10^5 個ずつ播種した。 37°C , 5% CO_2 下で培養し, 脂肪分化誘導を行った。脂肪分化誘導培地は 1 週間に 2 回交換した。オイルレッド染色は脂肪分化誘導後, 1 週後, 2 週後, 3 週後で行った。オイルレッド染色の方法は, PBS で 2 回洗浄した後, 10%ホルマリン溶液で固定。その後蒸留水で洗浄し, 60%イソプロパノールで洗浄した。室温のもと, オイルレッド溶液で 60 分間染色した。染色の後, 60%イソプロパノール溶液で 1 回洗い流し, その後 PBS で 1 回洗い流した。

2-3-5. RT-PCR による Runx-2, Osterix, Osteocalcin の発現の評価

凍結保存されていた細胞を解凍し再培養した後, 6-well plate の 1-well につき 1.0×10^5 個の細胞を播種した。骨分化誘導を行い, 骨分化誘導をおこなった 1 週後, 2 週後, 3 週目に検体の採取を行った。骨分化誘導を行わなかった検体も同時に採取した。

検体は RNeasy® Mini Kit (Qiagen N.V., venlo, Netherlands) を用いて, 総 RNA を抽出した。抽出した Total RNA は Nano drop(Thermo scientific, MA, USA)を用い濃度を測定し, QuantiTect® Reverse Transcription(Qiagen

N.V. , venlo, Netherlands)を用いて cDNA を作成した。 cDNA の作成と、RT-PCR は、馬場ら⁷⁾の方法に沿って行い、GAP,Runx-2,Osterix,Osteocalcin の発現を調べた。統計学的な評価はウィルコクソン符号順位和検定を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

2-4. 動物実験による凍結細胞の骨形成能の評価

2-4-1. ハイブリッドタイプ人工骨の準備

ハイブリッド型人工骨の担体(scaffold)は、ハイドロキシアパタイトのディスク(HOYA 直径 5mm, 厚さ 2mm, 有孔率 85%)を用いた。

凍結保存細胞を解凍, 再培養し, 1つの検体を骨分化誘導を行う骨分化誘導群と骨分化誘導を行わない非骨分化誘導群とに分けた。骨分化誘導を行った後 1 週後, フラスコより trypsin-EDTA で細胞をはがし集めた。非骨分化誘導群も同様に細胞を集めた。6-well プレートを用意し, それぞれの well にハイドロキシアパタイトのディスクを置き, そのディスク上に, 骨分化誘導群, 非骨分化誘導群ともそれぞれ, 1.0×10^5 個の細胞を播種した。4 検体の凍結保存細胞を用い, ハイドロキシアパタイトのディスクは骨分化誘導群 4 個と非骨分化誘導群 4 個を準備した。

2-4-2. 動物での実験

細胞を播種したハイドロキシアパタイトのディスクは, 24 時間, 37°C, 5%CO₂ でインキュベーションした後に 5 週齢の雄ヌードマウス(BALB/cA Jcl-un ; クレア, 東京)の背部皮下に移植した。ヌードマウスは 3 匹準備した。凍結保存されていた検体の骨分化誘導群と非誘導群が同一のマウスに移植されるようにした。ヌードマウス 3 匹のうち, 2 匹は凍結保存細胞 1 検体分, 骨分化誘導群のディスク 1 個と非誘導群 1 個, あわせて 2 個のディスクを移植した。残りの 1 匹には凍結保存細胞 2 検体分, 骨分化誘導群のディスク 2 個と非誘導群 2 個の計 4 個のディスクを移植した。移植の際にはディスクの細胞を播種した面が皮膚側に向くようにした。細胞を播種したハイドロキシアパタイトのディスクは, 移植してから 10 週後に取り出した。

2-4-3. 組織学的評価

取り出したハイドロキシアパタイトのディスクは 4%Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan)で固定し, K-CX(株式会社ファルマ、東京、日本)を用い脱灰, 洗浄したのち, パラフィン包埋をおこない $4 \mu\text{m}$ の厚さで薄切を行った。HE 染色ののち顕微鏡下で観察を行った。また, 新生された骨がヒトの細胞由来であることを確

認するために、ヒトオステオカルシン免疫染色を行った。ヒトオステオカルシンの免疫染色には、一次抗体として Human Osteocalcin(タカラバイオ株式会社 TAKARA BIO Inc., Shiga, Japan)を 200 倍に希釈したものをを用い、4℃で一晩反応させ、二次抗体として Alexa Fluor® 568 rabbit anti-mouse IgG(H+L)2mg/mL (Invitrogen™, Life Technologies Corporation, CA, USA)を、200 倍に希釈したものをを用い、遮光し室温で 30 分反応させた。

2-5. 凍結保存細胞の安全性評価

凍結保存細胞の安全性評価のために形態学および遺伝子検索により評価を行った。形態学的検査は G-band 法を用いた。G-band 法は当科で 10 年以上凍結保存されている検体(全 70 検体)のうち無作為に選んだ 8 検体に対し行った。G-band 法による染色は北里大学病院検査部に依頼した。

遺伝子検索は、がん抑制遺伝子である p53 遺伝子の異状の有無と代表的ながん遺伝子の一つである myc 遺伝子の異状発現につき fish 法を用いて行った。それぞれ 10 年以上凍結保存された 3 検体に対して行った。これらの検査は、株式会社エスアールエルに依頼した。

3. 結果

3-1. 凍結保存細胞の細胞特性

3-1-1. アルカリフォスファターゼの活性

アルカリフォスファターゼの活性は骨分化誘導を行ったもの、行わなかったもの双方で認められたが、骨分化誘導後 1 週後、2 週後、3 週後すべてにおいて、骨分化誘導をおこなったものが、骨分化誘導を行わなかったものに比べ、有意に高値であった。(Figure.1a)

3-1-2. カルシウム産生能

カルシウムの assay では骨分化誘導を行わなかったものではカルシウムの産生が認められなかったが、骨分化誘導を行ったものでは、骨分化誘導後、2 週目、3 週目でカルシウムの産生を認めた。(Figure.1b)

3-1-3. アリザリンレッド S によるカルシウムの染色

アリザリンレッドの染色では、骨分化誘導を行ったもので、カルシウム産生が確認できた。(Figure.2)

3-1-4. オイルレッド染色

オイルレッド染色では、脂肪分化誘導を行ったもので脂肪の産生を確認できた。(Figure.3)

3-1-5. RT-PCR による Runx-2, Osterix, Osteocalcin の発現の評価

RT-PCR では, Runx-2, Osterix, Osteocalcin は, 骨分化誘導をおこなったものと, 骨分化誘導を行わなかったものの, 両方で発現が認められた. Runx-2 は骨分化誘導後 1 週目 ($P=0.008$) と 3 週目 ($P=0.03$) で, 骨分化誘導を行ったものに有意に高い発現を認めた. Osterix は 3 週目で骨分化誘導を行ったものの方が有意に高い発現を認めた ($P=0.03$). Osteocalcin は 3 週目で骨分化誘導をおこなったものが有意に高い発現を認めた. ($P=0.03$) (Figure.4)

3-2. 動物実験による組織学的骨形成能の評価

マウス皮下に移植し 10 週後に取り出した, 凍結保存細胞を播種したハイドロキシアパタイトのディスクにおいて、骨形成が認められた。新たに形成された骨はヒトオステオカルシン蛍光免疫染色陽性であり、ヒト由来の細胞から作られた骨であることが確認できた。(Figure.5) 細胞を播種したハイドロキシアパタイトの皮下移植は 4 例で行い、骨分化誘導群 4 例中 4 例で骨形成が認められた。一方では、非骨分化誘導群では 4 例中 1 例で骨形成をみとめたものの、明らかに骨は低形成であり、ほかの 3 例において骨形成は認められなかった。(Figure.6)

3-3. 凍結保存細胞の安全性

凍結保存細胞の安全性の確認の為にを行った検査では、G-band 法では異常は確認されなかった。3 検体に対し行った、myc 遺伝子、p53 遺伝子検査では異常は確認されなかった。(Table.2)

4. 考察

4-1. 長期保存した骨組織由来関係細胞の多分化能・骨形成能

再生医療の領域では、骨髄由来間葉系細胞が、自己複製能をもち骨、軟骨、腱、筋、骨髄⁽⁸⁾、肝臓⁽⁹⁾、神経⁽¹⁰⁾、心筋⁽¹¹⁾といった間葉系の組織に分化する能力を持っている細胞として盛んに研究が行われている。また凍結保存細胞の viability はたびたび報告されてきた。⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾

口唇口蓋裂患者において、顎裂部に対する骨移植はなくてはならない治療であり、現在標準的な治療として行われている。移植骨の採骨部位は腸骨が一般的であるが、十分

な量が採取できない場合や、移植骨が吸収されてしまう場合もあり、そのような場合は繰り返し骨移植が必要になる。このように骨採取は、顎裂部骨移植が行われる年齢においては患者の大きな負担になる。

本研究では、患者の負担を軽減するために、凍結保存細胞の臨床応用を目的とし、当科で凍結保存されているヒト骨組織由来間葉系細胞の特性を調べた。

凍結保存細胞の細胞特性をみると、アルカリフォスファターゼ活性は骨分化誘導群だけではなく、非骨分化誘導群でも経時的な変化を示すことから、保存された間葉系幹細胞の中には前骨芽細胞に類似した細胞が存在していることが示唆される。またこの細胞を骨分化誘導することでアルカリフォスファターゼの活性が有意に上昇したことから、骨組織由来間葉系細胞が前骨芽細胞に確実に分化したと考えられた。さらにカルシウム産生能は骨分化誘導をおこなわなければ、認められなかったことから、凍結保存細胞の中には分化した前骨芽細胞はあまり含まれておらず、分化度の低い前骨芽細胞に類似した細胞が多いと思われた。

骨芽細胞は分化の程度により異なったマーカーを示し、Runx-2, ALP, Osteocalcin の順に発現する⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。また Osterix は、骨芽細胞の分化と骨形成における特異的転写因子である⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾。Runx-2, Osterix, Osteocalcin の発現ではいずれも発現も骨誘導後 3 週目に有意差が認められている。このことは骨組織由来間葉系細胞は元来骨細胞に起源を持つ細胞群であることを意味し、前述の「前骨芽細胞に類似した細胞が多い」との推論と一致する結果である。

多分化能として凍結保存細胞の脂肪分化誘導を行った。その結果、脂肪細胞に分化することが確認できた。凍結保存された骨組織由来間葉系細胞に未分化な幹細胞が存在することも確認された。

動物実験では、マウスの皮下に移植をすることで、ヒト由来の骨組織を確認できた。骨分化誘導を行わなくても 4 例中 1 例で骨形成を認めたが、骨分化誘導を行うことで、より多くの骨組織が産生されたことは、凍結保存骨組織由来細胞には未分化な細胞と、前骨芽細胞類似の細胞とが含まれていることを裏付ける結果であると考えられ、in vitro の結果と矛盾しないものであった。Hamada ら⁽¹⁸⁾は、歯髄組織から得られたヒト骨組織由来間葉系細胞を培養し in vivo において骨分化誘導を行わなくても骨形成能があることを示したが、我々は凍結保存したヒト骨組織由来間葉系細胞でも in vivo における骨形成能を有することを見出した。

これらのことから、凍結保存細胞は 10 年以上経過していても、骨形成能、多分化能

が維持されていることが確認できた。骨組織由来間葉系細胞を凍結保存し、骨移植のドナーとして用いることで、腸骨採取の負担を軽減できる可能性があると考えられた。

4-2. 長期保存された骨組織由来間葉系細胞の細胞学的安全性

今回凍結保存細胞の安全性を確認するための試験的な検索として 10 年以上凍結保存された検体 70 例中から無作為に選んだ 8 検体で G-Band 法による形態学的検索を行った。その結果 8 検体の染色体では形態学的な異常を認めなかった。また myc 遺伝子や p53 遺伝子の異常の検索を行った 3 検体においても異常は認められなかった。

さらに凍結保存細胞の培養では異常な増殖を認めず、またそれら細胞の骨分化誘導過程においても ALP 活性と Ca 産生との経時的な変化や Runx-2, Osterix, Osteocalcin の発現時期をみても正常な分化をしていると考えられた。このことから 10 年以上凍結保存を行っても臨床応用に用いることができる可能性があると考えられた⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。

しかし実際に凍結保存細胞を安全に臨床応用するためには、今回のように DNA の形態学的検索と、がん遺伝子発現の検索として DNA マイクロアレイなどを用い、さらに詳細に異常遺伝子の発現などを調べていく必要がある。

4-3. 長期保存した骨組織由来細胞の臨床学的意義。

近年、ヒト骨組織由来間葉系細胞において FBS を用いない無血清培養法の報告が散見される⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾。この方法は感染などの生物材料を用いるリスクを排除するという点で有用である。それゆえ、自己血清を用いたヒト骨組織由来間葉系細胞の培養は安全面において有用である⁽²²⁾⁽²³⁾。

口唇口蓋裂患者は、幼少期から何度も手術が必要になる。初回手術は 3-4 か月ごろに行われる、口唇形成術の際には、隣接する上顎骨より骨組織を採取することが可能である。現在、口唇口蓋裂は出生前診断が可能であり、出生時に臍帯血より自己血清の採取とその凍結保存が可能である。我々はこれまでに自己血清で培養した細胞が、従来の FBS 培地を用いた細胞と同等の骨形成能をもつことを報告してきた⁽²⁴⁾。

今後の展望としては、出生前診断で口唇口蓋裂と診断された場合には臍帯血より自己血清を採取、保存し、初回手術で得られた上顎骨由来の骨髄由来細胞を凍結保存、それを骨移植が必要となる混合歯列期まで保存し、顎裂部に骨移植を行う段階で、解凍、培養を行い顎裂部の移植骨として使用可能であれば患者の負担を軽減できる可能性があると考えられる。

さらに本技術により、骨組織由来間葉系細胞を凍結保存して臨床に用いることができれば、口唇口蓋裂患者のみならず、骨移植が必要になるような疾患においても骨採取の負担を軽減できるようになる可能性があると考えられた。

5. 総括

本研究により、10年以上という長期間にわたる凍結保存を行っても、ヒト骨組織由来の間葉系細胞群における、多分化能・骨形成能は維持されていることが確認された。また、安全性に関しても予備的な調査としておこなった検査では異常は認められなかった。今後、臨床応用していくには更に安全性に関し調査を行っていく必要なものの、現段階では、骨形成能や明らかな形態学および遺伝子学的異常がないことが確認された。

これにより、長期間凍結保存されたヒト骨組織由来の間葉系細胞は臨床応用できる可能性が示唆された。

6. 今後の課題

本研究により凍結保存されたヒト骨組織由来間葉系細胞の臨床応用の可能性が示唆されたが、さらに安全性の確立に向けた研究を行っていく必要がある。DNA マイクロアレイなどの多数のがん関連遺伝子を一度に調べる方法などが考えられる。

本研究では、凍結保存細胞の特性の調査をしたが、凍結保存による細胞の生存率や新鮮細胞との増殖率の違いなどは検討していない。今後は細胞の生存率を調査し、それが低い場合には、凍結保存方法の改良や、新鮮細胞に比較して増殖率が低下しているのであれば、培養方法の改良などが必要になると考えられた。

7. 謝辞

本研究は MEXT 科研費 23592942 の助成を受けたものです。

本論文の作成に当たり、ご協力いただいた曾根由美子氏、北里大学病院検査部に感謝いたします。

8. 引用文献

- 1) Millard DR, Latham RA, Huifen X, et al. Cleft lip and palate treated by presurgical orthopedics, gingivoperiosteoplasty, and lip adhesion (POPLA) compared with previous lip adhesion method: a preliminary study of serial dental casts. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:1630-1644
- 2) Wongchuensoontorn C, Liebehenschel N, Schwartz U, et al. Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible – a case report. *J Craniofac Surg* 2009;37:155-161
- 3) Behnia H, Khojasteh A, Solimani M, et al. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniofac Surg* 2012;40:2-7
- 4) Matsuo A, Yamazaki Y, Takase C, et al : Osteogenic potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured with autologous serum. *J Craniofac Surg* 2008;19:693-700
- 5) Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, et al. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004;28:33-39
- 6) Hirose M, Kotobuki N, Machida H, et al. Osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells thawing in culture. *Mater Sci Eng C* 2004;24:355-359
- 7) Baba K, Yamazaki Y, Ikemoto S, et al. Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived autoserum. *J Craniofac Surg* 2012;40:768-772
- 8) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147
- 9) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- 10) Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:148-152
- 11) Mikino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705

- 12) Kotobuki N, Hirose M, Machida H, et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng* 2005;11:663-673
- 13) Shimakura Y, Yamazaki Y, Uchinuma E. Experimental study on bone formation potential of cryopreserved human bone marrow mesenchymal cell/hydroxyapatite complex in the presence of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg.* 2003;14:108-116
- 14) Sun H, Ye F, Wan J, et al. The upregulation of osteoblast marker genes in mesenchymal stem cells prove the osteoinductive of hydroxyapatite/tricalcium phosphate biomaterial. *Transplantation* 2008;40:2645-2648
- 15) Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431:343-349
- 16) Peng Y, Shi K, Wang L, et al. Characterization of Osterix protein stability and physiological role in osteoblast differentiation. *PLoS One* 2013;8:e56451
- 17) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17-29
- 18) Hamada K, Yamaguchi S, Abe S, et al. In vivo bone formation by human dental pulp cells sorting and osteogenic differentiation induction. *J Oral Tissue Engin* 2009;7:15-25
- 19) Mannello F, Tonti GA: Concise review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 2007;25:1603-1609
- 20) Liu C, Wu M, Hwang S. Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells. *Biochem Eng J* 2007;33:1-9
- 21) Ishikawa I, Sawada R, Kato Y, et al. The effectivity of the novel serum-free medium STK2 for proliferating human mesenchymal stem cells. *YAKUGAKU ZASSHI* 2009;129:381-384 (in Japanese)
- 22) Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005;65:3035-3039
- 23) Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PROS Med* 2009;6:221-231
- 24) Takeda A, Yamazaki Y, Baba K, et al. Osteogenic potential of human bone

marrow-derived mesenchymal stromal cells cultured in autologous serum: A preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg*2012;70:e469-e476

9. 業績目録

(I) 原 著

1. Kumazawa K, Sugimoto T, Yamazaki Y, Takeda A, Uchinuma E :
Osteogenic Potential, Multipotency, and Cytogenetic Safety of Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation.
The Kitasato Medical Journal, 44,1,(2014) in press
2. Sugimoto T., Yamazaki. Y., Kumazawa.K, Sone Y., Takeda A., Uchinuma E.:
The significance of Performing Osteogenic Differentiation in Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells
Journal of Oral Tissue Engineering, 11,2,(2014), in press
3. Baba K, Yamazaki Y, Ishiguro M, Kumazawa K, Aoyagi K, Ikemoto S,
Takeda A, Uchinuma E.:
Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived fibrin: A preliminary study.
Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery ,41,775-782,2013.
4. 根本 充, 熊澤 憲一, 石川 心介, 鴻池奈津子, 内沼 栄樹 :
皮弁修正を要した四肢再建例の検討 - 機能的・整容的四肢再建を目指して.
日本マイクロサージャリー学会会誌, 26,2 : 55～60, 2013
5. 熊澤 憲一, 根本 充, 秋本 峰克, 石川 心介, 内沼 栄樹 :
手指・手関節に発症したガングリオン摘出後再発例の検討.
日本手外科学会雑誌, 28,4 : 401～405, 2012
6. 根本 充, 青柳 和也, 柏木 慎也, 秋本 峰克, 石川 心介, 熊澤 憲一,
内沼 栄樹 :
重度四肢開放骨折に対する free flap を用いた早期再建.
創傷, 1,2 : 74～80, 2010
7. 中村 健, 大谷津 恭之, 熊澤 憲一, 宮澤 理恵 :
肛門周囲への植皮術の周術期管理.
熱傷, 33,5 : 273～279, 2007.

(II) 著 書

な し

(III) 総説・講座

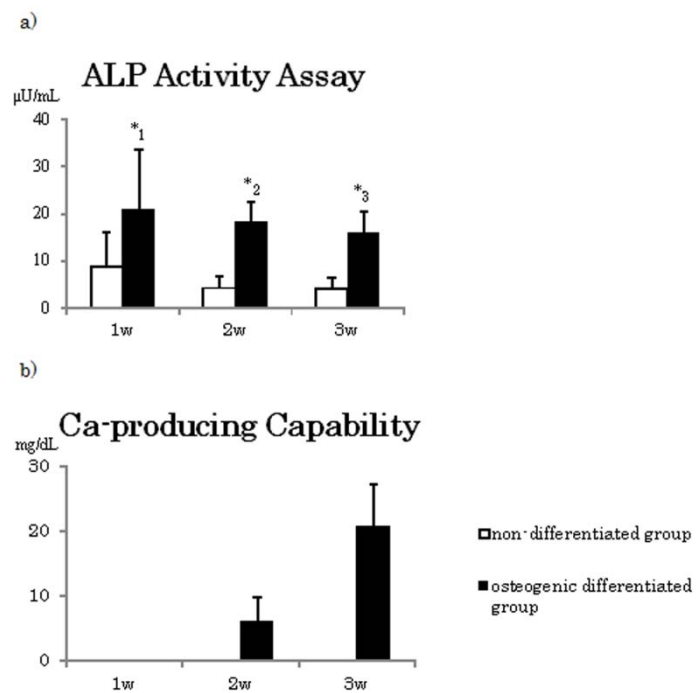
な し

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. 熊澤 憲一，武田 啓，内沼 栄樹：
【形成外科治療に必要なくすりの知識】ケロイド・肥厚性瘢痕に対する
薬物療法. PEPARS,70:50～55,2012
2. 熊澤 憲一，茅野 真子，山田 直人，内沼 栄樹：
両側重複母指・両側多趾症が4世代6名に発症した1家系.
日本形成外科学会会誌，29，4：253～258，2009

10. 論文図表

Figure. 1

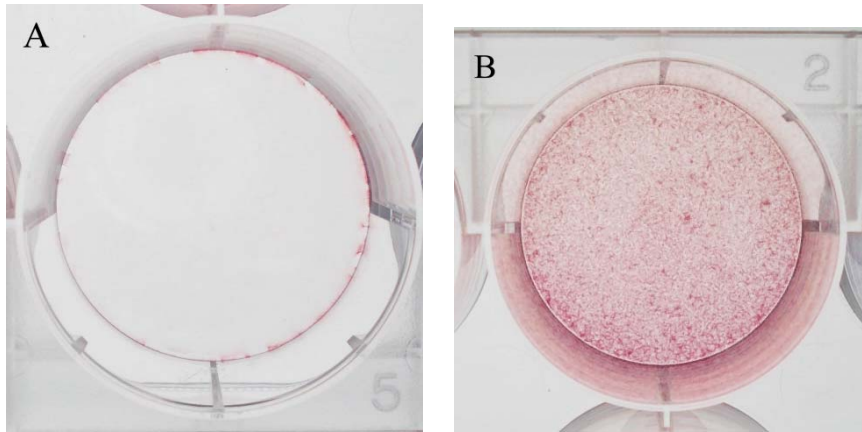


*: Student's T-test により統計学的な有意差が認められた. ($P < 0.05$).

(*₁: $P = 0.04$ *₂: $P = 0.01$ *₃: $P = 0.03$)

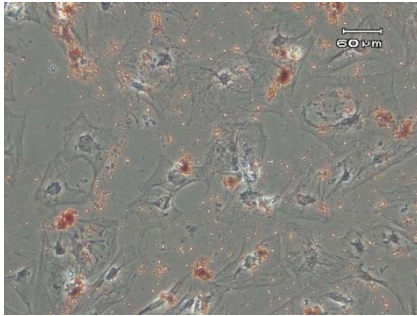
- a) ALP 活性の assay は骨分化誘導後 1 週目, 2 週目, 3 週目に行った.
全ての週において非分化誘導群に比べ骨分化誘導群は有意に ALP 活性が高かった.
- b) カルシウムの産生は, 骨分化誘導群で分化誘導後 2 週目と 3 週目に認められた. 非分化誘導群ではカルシウムの産生は認められなかった.

Figure.2



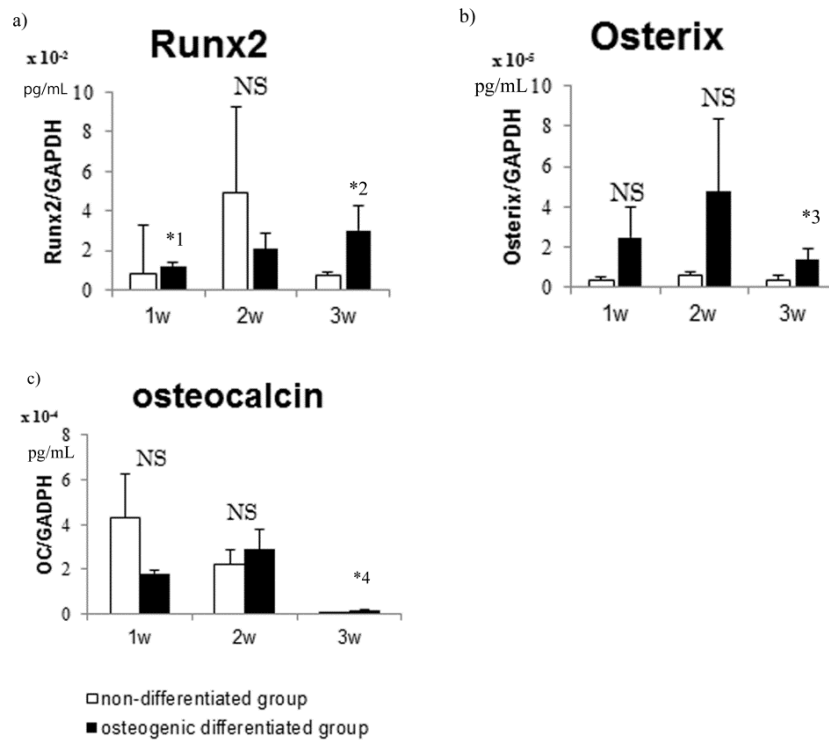
アリザリンレッドS染色では，非分化誘導群では染色されなかった(A)が，骨分化誘導群では染色された(B).

Figure.3



オイルレッドO染色. 脂肪滴が赤く染色され, 脂肪分化誘導を行うことで脂肪が産生されたのが確認できた.

Figure.4



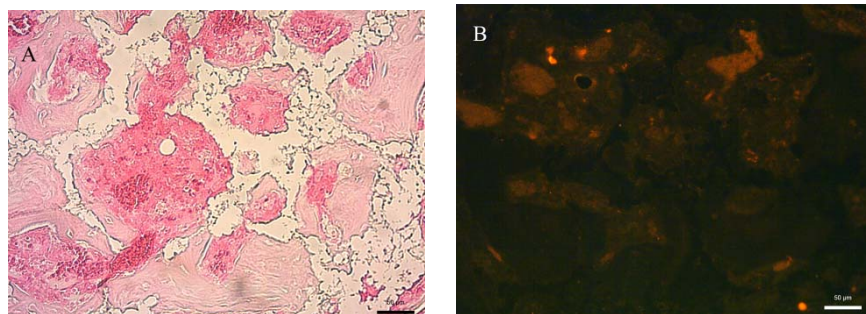
*:ウィルコクソン符号順位和検定で統計学的に有意差を認めた. ($P < 0.05$)

(*₁: $P = 0.008$ *₂: $P = 0.03$ *₃: $P = 0.03$ *₄: $P = 0.03$)

Runx-2 遺伝子の発現は非分化誘導群に比べ、骨分化誘導群において、骨分化誘導後 1 週目と 3 週目に有意に高い発現が認められた. teogenic differentiation.

Osterix 遺伝子と osteocalcin 遺伝子の発現は、非分化誘導群に比べ骨分化誘導群において、骨分化誘導後 3 週目に有意に高い発現が認められた。

Figure.5



倍率 ×200、スケールバー：50μm

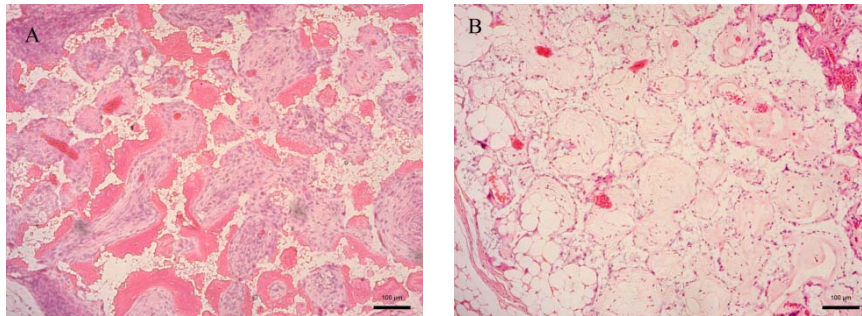
A: ヘマトキシリン・エオジン染色

ハイドロキシアパタイトの間に新生された骨が確認された。

B: ヒトオステオカルシン免疫蛍光染色

新生された骨はヒトオステオカルシン免疫蛍光染色陽性であり、ヒト由来の組織であることが確認できた。

Figure.6



倍率 ×100 スケールバー：100μm

A:骨分化誘導群

B:非分化誘導群

骨の新生は骨分化誘導群では認められたが，非骨分化誘導群では認められなかった．

Table.1 Donor Information

No.	Age,y	Sex	Donor site	Cryopreservation Period. y,mo	in vitro	in vivo	Cytogenetic safety evaluation
1	9	F	Iliac crest	10,3	○	○	
2	9	F	Iliac crest	13,7	○	○	
3	18	F	Iliac crest	13,3	○	○	○
4	9	F	Iliac crest	12,8	○	○	○
5	5	M	Iliac crest	12,1	○		○
6	5	F	Iliac crest	11,4	○		
7	6	F	Iliac crest	11,6	○		

7 検体に対し研究を行った。（男性 1 検体，女性 6 検体）

年齢は 5 歳から 18 歳で平均 8.7 歳であった．

骨採取部位はすべて腸骨陵からであった．

骨組織由来間葉系細胞の凍結期間は 10 年 3 か月間から 13 年 3 か月間であり，平均 12 年 1 か月であった．

in vitro での研究は 7 検体すべてに行い，in vivo での研究は 4 検体で行われた．細胞学的安全性の検索は 3 例に対し行われた．

Table.2 Morphologic investigation by G-banding stain

No.	Sex	Caryotype	Cryopreservation Period. y,
1	F	46,XX	15
2	F	46,XX	15
3	M	46,XY	14
4	F	46,XX	14
5	M	46XY,inv(9)(p12q13)	13
6	F	46,XX	12
7	F	46,XX	12
8	M	46,XY	11

G-band 法による細胞形態学的検査は当科で凍結保存されている検体の 70 検体のうち 8 例に対し行われた。染色体異常は認めなかった。

(inv(9)(p12q13): 正常変異)