

福井雅士論文内容の要旨

## Ectopic bone formation facilitated by human mesenchymal stem cells and osteogenic cytokines via nutrient vessel injection in a nude rat model

ヌードラットモデルにおいて、ヒト間葉系幹細胞と骨形成サイトカインの栄養血管内投与により異所性骨形成が促進される。

福井雅士、秋田定伯、秋野公造

Wound Repair and Regeneration 13:332-40, 2005

紹介者：長崎大学大学院医学研究科外科系専攻 平野 明喜教授

### 要約

#### 1) 緒言

外傷や悪性腫瘍切除後、血行障害、感染、放射線被爆などを契機に発生する大きな骨欠損は、患者にとって重大な機能的、整容的なリスクとなり、しばしば治療に難渋する。これに対する治療法としては血管柄付骨弁が臨床上非常に有効な方法であるが、採取部と採取量に限界があるため、その適応が制限を受けることも多い。こういった問題を解決するため、より低侵襲な方法として、組織工学で作成した骨弁の臨床応用がある。

我々は既に、栄養血管を介してサイトカインと情報伝達刺激物質の作用が調節可能である事を皮弁モデルで証明しており、今回これを応用して骨髄由来幹細胞（ヒト間葉系幹細胞 human mesenchymal stem cells, 以下、hMSCs とする）と骨形成因子（以下 BMP-2 とする）と塩基性線維芽細胞増殖因子（以下 bFGF とする）を栄養血管から投与することで異所性骨新生が可能かを検討した。

2) 対象と方法 オスヌードラット (F344/NJCl-rnu) の下腹部皮下でゼラチン性の担体を腹壁結合組織（筋膜）弁で覆い、hMSCs と bFGF と BMP-2 を浅腹壁血管から注入した。これにより血管柄を有する移植可能な異所性骨弁の作成を意図した。注入する因子により 4 群に分類した。即ち 1) 対照群 (n=25) : 0.1ml の PBS (phosphate buffered saline solution) を注入。2) 幹細胞群(n=25) : 0.1ml の DMEM 培地と  $5 \times 10^6$  個の hMSCs を注入。3) サイトカイン群(n=25) : 0.1ml の DMEM 培地と  $10 \mu\text{g}$  の bFGF と  $10 \mu\text{g}$  の BMP-2 を注入。4) 幹細胞・サイトカイン併用群(n=25) : 0.1ml の DMEM 培地と  $5 \times 10^6$  個の hMSCs と  $10 \mu\text{g}$  の bFGF と  $10 \mu\text{g}$  の BMP-2 を注入。flap 内に出現した骨の量と質の経時的変化を骨塩量 (Dual energy X-ray Absorptiometry, DEXA)、組織像、骨マーカー (アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、転写因子である Polyomavirus enhancer binding protein 2 $\alpha$ A) の免疫組織像で検討した。

#### 3) 結果

幹細胞・サイトカイン併用群の flap 内の骨塩量は術後 4 週で他の対照群、

幹細胞群、サイトカイン群と比較し有意に増加した ( $p<0.01$ )。術後 7 日までの組織像では各群共に著明な変化はなかった。幹細胞・サイトカイン併用群ではその他の群と比較して術後 2 週で血管構造の構築と血管周囲組織の蓄積がはっきりと認められ始め、更に術後 4 週で塩基性ミネラル構造が線維芽細胞様の間葉系幹細胞を取り囲み、骨芽細胞や破骨細胞の裏打ちを認めた。幹細胞・サイトカイン併用群の術後 4 週の免疫染色ではその他の群と比較してアルカリフォスファターゼとオステオカルシンが広範囲で明確に発現し、更に術後 4 週で Polyomavirus enhancer binding protein 2 $\alpha$ A の発現が確認された。

#### 4) 考察

本実験ではヒトの間葉系幹細胞とサイトカインを用いて血管柄付き骨弁として利用可能なヒトの異所性骨組織の作成を意図した。

従来の方法の多くは体性幹細胞を鋳型に入れて情報伝達物質の刺激下、生体外で培養して骨を作成するもので、臨床上有用と報告されているが、作成に長期間を要し、生体外で再生するために一旦血行が遮断されるといった移植に際しての欠点がある。これに対して我々の方法では、間葉系幹細胞と刺激因子の栄養血管内投与により、比較的短時間で血流豊富な異所性骨弁の作成が可能であった。これは単に遊離骨としての移植ではなく、血管柄付骨弁としての移植が可能という点で臨床的に優れているものと思われる。

成人幹細胞は自己増幅能や多分化能を有し、より単純で容易な骨再生が可能であり、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いるよりも安全面、倫理面で有利と考えられる。In vitro の研究では間葉系幹細胞は自己増幅性で、骨、軟骨、脂肪、筋肉、腱等の系列に分化し、特に骨誘導培地での細胞の微細電顕構造と細胞特性が研究されているが、in vivo での組織分化は、循環中の幹細胞が各種動物で組織分化する事実以外あまり判っていない。しかし、我々の研究で骨分化への効果は in vivo で BMP-2 と bFGF の使用により相乗的に認められ、骨欠損創への効果もヌードラットの頭蓋骨欠損モデルで hMSCs と BMP-2、bFGF の併用により術後 4 週までに認められることが判っている (副論文 Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K, Wound Repair Regen12: 252-259)。今回、細胞やサイトカインを単独ではなく併用することが、in vivo での異所性骨形成にとっても非常に重要な条件であると証明できた。