

# 論文内容要旨

## 骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)を用いた 顎裂閉鎖治療法

－MSCs の血管新生に果たす役割の検討－

応用生命科学部門 歯科矯正学

(主指導教員：谷本 幸太郎 教授)

統合健康科学部門 口腔生物工学

(副指導教員：二川 浩樹 教授)

応用生命科学部門 歯科矯正学

(副指導教員：國松 亮 助教)

沖 奈苗

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

## 論文内容要旨

論文題目： 骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)を用いた顎裂閉鎖治療法

—MSCsの血管新生に果たす役割の検討—

学位申請者 沖 奈苗

口唇裂・口蓋裂患者の上顎顎裂部に対して、一般的に患側犬歯萌出前における自家骨(腸骨海綿骨細片)移植が広く行われている。本術式の良い骨架橋の形成率は約70%とされているが、腸骨採取時の外科的侵襲が課題である。両側性顎裂や顎裂幅が大きい場合においては、手術が複数回に及ぶ場合もあり、若年者が多くを占める患者にとってきわめて大きな負担となる。以上の背景から、より侵襲の少ない方法として、間葉系幹細胞(MSCs)を用いた骨再生医療の応用が期待されている。

我々は、これまでにビーグル犬顎裂モデルを用いて、自家腸骨より採取した MSCs の移植実験を行い、骨再生の誘導を確認した。その実験において、MSCs を移植した場合の再生骨の血管数が対照群に比較して有意に多いことが明らかとなった。一般的な骨再生過程においては、移植後に形成された結合組織に周囲から血管が侵入し、栄養と酸素を供給する環境が整えられた時点で、骨芽細胞による類骨の形成と石灰化が誘導される。また、近年の臨床研究において、MSCs は炎症部位や組織傷害部位に集積する性質があり、移植後の生着促進・造血系再構築・免疫抑制作用に寄与しているとの報告がある。顎裂部骨再生においても、骨形成の前段階として結合組織と血管網再構築が重要であると考えられるが、MSCs がどのように血管新生に関与しているかの詳細は明らかにされていない。

本研究では、移植後の生体内における MSCs の血管新生における役割を明らかにすることを目的として、MSCs と血管内皮細胞(HUVEC)を共培養することにより、相互作用を検討するとともに、ビーグル犬を用いて、移植部位における初期血流量を継続的に測定した。

倫理委員会の承認を得て、3名の口唇裂・口蓋裂患者の腸骨骨髄移植時に余剰の骨髄より採取した MSCs を単離培養した。まず、初めにこれらの細胞についてフローサイトメーターによる表面抗原解析および多分化能の検討(骨芽細胞分化、脂肪細胞分化、軟骨細胞分化)を行い、MSCs の同定を行った。次に、得られた MSCs と HUVEC を共培養し、血管新生における MSCs の影響を検討した。さらに、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salts (MTS) assay 法により、生細胞数を比較するとともに、蛍光ラベルされた HUVEC による管腔形成の様相を蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、血管新生因子である vascular endothelial growth factor A(VEGF-A)、platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1)、matrix metalloproteinase 2(MMP2)、matrix metalloproteinase 9(MMP9)が共培養によってどのように変化するかを real-time PCR により比較検討をおこなった。そのうち、VEGF-A における MSCs の骨芽細胞分化前後の発現変化を real-time PCR および Western blot 法により解析した。

次に、イヌ(3か月齢雌ビーグル種)上顎両側第二切歯・犬歯間に幅約 5 mm、長さ約 10 mm

の顎裂を外科的に形成した。1 か月後に作製した顎裂部の自然治癒が生じないことを確認し、これを顎裂モデルとした。一方、腸骨骨髓より MSCs を単離培養し、コンフルエントに到達した時点で、顎裂部に炭酸アパタイト (CAP) 担体とともに移植した。右側 (実験側) に CAP と MSCs を移植し、左側 (対照側) には同量の CAP 単体を移植した。その後、レーザードップラー血流計のガイド用のシースを移植体中央に歯肉辺縁部より深さ 9.5 mm の部位に埋入し、両隣在歯にワイヤーを用いて固定し、骨再生を誘導した。移植部における MSCs の骨再生血管新生能を明らかにするため、移植後 1 か月間における X 線写真と血流量の経時的評価を行った。

その結果、以下のことが明らかとなった。

1. 3 名の口唇裂・口蓋裂患者の腸骨より採取された細胞は、フローサイトメーターを用いた表面抗原解析により CD44、CD29、CD105、CD73 陽性、CD34、CD45 陰性であった。さらに、これらの細胞は多分化能を有していたことから、MSCs であることが明らかとなった。
2. MSCs と HUVEC の共培養の結果、それぞれの生細胞数が有意に増加した。Direct co-culture を行なった場合、HUVEC により管腔様構造が形成された。共培養とそれぞれの細胞を単独で培養した場合と比較すると、血管新生因子である VEGF-A、PECAM-1、MMP2、MMP9 の RNA 発現量は共培養により増加していた。MSCs の骨芽細胞分化前後で VEGF の RNA 発現量は減少していた。
3. 顎裂部への移植実験において、実験側の移植後の血流の回復が対照側と比較して早く、初期の血流量も多い結果となった。血流量は実験側で 9 日目、対照側において 11 日目で最大となり、最終的に実験側の方が低い値となった。経時的な X 線写真における評価では、実験側において移植 2 週間後より CAP の不透過像が減少し始め、移植 3 週間後には新生骨と思われる不透過像が認められた。

以上の結果より、MSCs が移植部において VEGF-A を発現し、それに伴い増殖した HUVEC により MMP-2、MMP-9、PECAM-1 の発現が亢進することが明らかとなった。MSCs の移植により、血管新生が誘導されることで血流量が増加し、骨再生が早期に生じることが強く示唆された。