

学位論文

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—

沖 奈苗

広島大学大学院医歯薬学総合研究科  
展開医科学専攻

主指導教員：谷本 幸太郎 教授

2015 年

# 目次

緒言.....	1
試料および方法	
I. MSCs の同定	
1. 細胞採取と MSCs の単離および培養.....	7
2. MSCs の表面抗原の解析.....	8
3. 骨芽細胞への分化誘導.....	9
4. 脂肪細胞への分化誘導.....	9
5. 軟骨細胞への分化誘導.....	10
6. 骨芽細胞分化の評価.....	10
7. 脂肪細胞分化の評価.....	11
8. 軟骨細胞分化の評価.....	11
II. MSCs と HUVEC を用いた血管新生についての検討 ( <i>in vitro</i> )	
1. 細胞の培養.....	12
2. MSCs と HUVEC の共培養における生細胞の変化についての検討.....	13
3. MSCs と HUVEC の共培養における生細胞数の検討.....	13
4. MSCs と HUVEC の共培養における血管新生関連遺伝子マーカー発現の 経日的変化.....	15
5. MSCs における骨分化誘導が VEGF-A 遺伝子発現とタンパク質発現に 及ぼす影響.....	18
III. MSCs を用いた再生骨の血流量の検討 ( <i>in vivo</i> )	
1. ビーグル犬を用いた口蓋裂モデルの作製.....	20
2. MSCs を用いた移植体の作製.....	22
3. レーザードップラー血流計測定のためのガイドの作製.....	23
4. 顎裂部への移植.....	25
5. レーザードップラー血流計を用いた顎裂部の血流変化と X 線写真.....	26
IV. 顎骨 MSCs の有用性の検討	
1. 細胞採取と MSCs の抽出および培養.....	27
2. 骨芽細胞への分化誘導.....	28

3. 脂肪細胞への分化誘導.....	28
4. 骨芽細胞分化の評価	
1) ALP 活性の測定.....	29
2) カルシウム沈着量定量.....	29
3) Alizarin Red 染色.....	30
5. 脂肪細胞分化の評価.....	30
6. MSCs の生細胞数および増殖活性の検討	
1) MSCs の生細胞数の測定.....	30
2) MSCs の増殖活性 (DNA 合成量) の測定.....	31
7. 各 MSCs における培養日数と継代数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現量 の変化.....	31
1) jMSCs と iMSCs の培養日数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現量の 変化 .....	31
2) jMSCs と iMSCs の継代数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現量の変化.... .....	32
8. 各 MSCs における骨分化誘導が VEGF-A 遺伝子発現に及ぼす影響.....	33
結果.....	34
I. MSCs の同定	
1. MSCs の表面抗原の解析.....	34
2. 骨芽細胞への分化.....	36
3. 脂肪細胞への分化.....	36
4. 軟骨細胞への分化.....	37
II. MSCs と HUVEC を用いた血管新生	
1. MSCs と HUVEC の共培養における生細胞の変化.....	37
2. MSCs と HUVEC の共培養における生細胞数の変化.....	38
3. MSCs と HUVEC の共培養における血管新生関連遺伝子発現量の経日的 変化 .....	40
1) MSCs と HUVEC の共培養における VEGF-A 遺伝子発現量の変化.....	40
2) MSCs と HUVEC の共培養における MMP-2 遺伝子発現量の変化.....	41
3) MSCs と HUVEC の共培養における MMP-9 遺伝子発現量の変化.....	42
4) MSCs と HUVEC の共培養における PEAM-1 遺伝子発現量の変化.....	43
III. MSCs を用いた再生骨血流量	

1. ビーグル犬を用いた口蓋裂モデル.....	45
2. 移植後のビーグル犬の体重変化.....	46
3. レーザードップラー血流計を用いた移植後の血流量の変化.....	47
4. X 線写真による評価.....	48
IV. jMSCs の有用性	
1. 骨芽細胞への分化.....	50
2. 脂肪細胞への分化.....	52
3. MSCs の生存数および増殖活性.....	53
4. jMSCs と iMSCs における培養日数と継代数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現量の変化.....	54
5. jMSCs と iMSCs において骨分化誘導が VEGF-A 遺伝子発現とタンパク質発現に及ぼす影響.....	55
考察.....	56
総括.....	68
参考文献.....	70
謝辞.....	76

## 緒言

口唇裂・口蓋裂（cleft lip and palate; CLP）は、一つの形質の支配に関与する複数の遺伝子（polygene）と様々な環境因子との相互作用により惹起される多因子性疾患であり、それらが、あるしきい値を越えた時に発症する[1]。そして、胎生期における顔面突起の癒合不全に起因する顎裂を特徴とし、これに伴い歯列の連続性が失われ、上顎歯列弓の狭窄や歯の先天性欠損、位置異常による不正咬合が発現する。

日本人における CLP の発生率については、多くの疫学的研究がなされており、およそ 400 名～ 500 名に 1 名の割合で出生し、その割合は、口唇裂が 34.5 %、口唇口蓋裂が 45 %、口蓋裂が 20.5 %と報告されている[2]。CLP 患者の治療は、哺乳障害や上顎の正常な発育のため、生後可及的早期にホッツ床を装着することより始まる。そして、生後 3 ～ 4 か月で口唇形成術、1 歳半～ 2 歳頃に口蓋形成術が施行される。その後、鼻咽腔閉鎖が不十分な場合は咽頭弁形成術が施行され、口唇・鼻形成、犬歯萌出前の二次骨移植、再口唇・鼻形成と度重なる手術が必要となる[3]。その中でも、二次骨移植術の成否は患者の QOL に大きく影響する。顎裂が残存することにより、矯正歯科治療が制限される、上顎セグメントが不安定な状態におかれ、広範囲な補綴治療が必要となる、鼻翼

基部の骨性のサポートが不十分となり左右非対称となる、口腔前庭粘膜の凹凸が生じ、瘻孔に食渣の滞留や鼻汁が逆流するなどの問題が生じる[4]。このような問題が生じないためにも、移植部において既存骨と同様の骨代謝を有する十分な量の骨を早期に再生させることが必要となる。顎裂部への骨移植は、1914年 Drachter [5]が初めて成功させたものの、1931年 Veau ら[6]が口蓋裂部への脛骨細片移植を試みたところ有効な結果が得られなかったこともあり、骨移植は行われなくなった。しかしながら、1950年代に入り、Axhausen [7]により、骨移植の報告がなされると、再び注目されるようになった。当初は骨移植前に拡大した歯列の後戻りを防ぐ意味合いが強く、ブロック骨が用いられていた。しかし、ブロック骨は血流の無い遊離骨であるため感染に弱い上、血管網の再構築や骨改造機転が遅く、移植された骨の大部分が吸収されることが問題であった。Boyne ら[8]は、これらの問題を解決するために、血流豊富な新鮮自家腸骨海綿骨に着目し、これを用いることにより、移植部への犬歯の萌出や、矯正歯科的な歯の移動による非補綴的顎裂再建が可能であることを報告した。

一方、移植骨が骨に置換する作用機序については、Wolfgang [9]は、まず海綿骨に含まれる骨形成能を持つ細胞により新生骨が形成され、その後、新生骨に骨改造が生じて移植部に類似した骨に置換されると報告した。また、Bruwell ら[10]は、形成された骨が海綿骨に含まれる未分化間葉系幹細胞 (mesenchymal

stem cells; MSCs) に由来することを明らかにしている。また、基礎的・臨床的研究では、腸骨海綿骨移植は骨形成能を有する MSCs の移植により、新生骨形成と骨改造、および母床骨への置換が達成されることが目的であり、移植骨自体の生着を目的とするブロック骨移植とは異なり、自家骨のリモデリングによる “*in vivo tissue engineering*” であると考えている[11, 12]。

近年、MSCs は骨、軟骨、脂肪だけではなく、心筋、肝臓、神経および血管内皮細胞など中胚葉系以外の様々な組織へと分化することが報告されている[13-15]。この MSCs の幅広い多分化能から虚血性疾患や心疾患の細胞治療への応用が注目されている。Guilherme ら[16]は、イヌ慢性虚血性心疾患モデルにおいて MSCs を心筋内注射すると、MSCs は平滑筋や血管内皮細胞に分化し、心血流量が増加し、心機能が亢進したことを報告している。また、心筋梗塞動物モデルを用いた解析では、MSCs が心筋の機能を回復させることが報告されている[17, 18]。すなわち、梗塞部位に移植された MSCs は、パラクライン作用により周囲の血管新生を促進し、局所の血流を改善させたと考えられる。さらに、Lu ら[19]は、糖尿病性重症虚血肢の患者に対し、腸骨骨髓穿刺より採取した MSCs を筋肉内投与すると下肢血流量が増加し、潰瘍の治癒が促進したと報告している。以上のことより、移植部での血管新生においても MSCs が何らかの働きをしていることが推察される。一方、Langer と Vacanti ら[20]により組織工学とい

う概念が確立されて以来、細胞移植において細胞が移植部に留まり機能を発揮するための足場の必要性が論じられている。また、優れた移植材である自家骨は、賦形性や供給量に限界があるという問題もあり、生体親和性に優れ、骨伝導能を有する人工骨が骨移植に利用されるようになってきている。近年では、人工補填材料としてハイドロキシアパタイトセラミックスが注目され、臨床応用もされている[21-24]。さらに、骨に置換されやすいように 1980 年代から吸収性を有するリン酸カルシウム系の骨補填材 ( $\alpha$ -TCP や  $\beta$ -TCP 等) や生体の骨に置換可能なアパタイトとして、ハイドロキシアパタイトの一部が炭酸基に置換された炭酸アパタイトなどが用いられている[25]。なかでも、未焼結炭酸アパタイト (carbonated hydroxyapatite; CAP) は、生体内の歯や骨の主要な無機成分であり、高い生体親和性を有するとともに、未焼結であることから結晶が小さく、酸への溶解性も高いことより、注目されている。しかし、これらの骨補填材は単独で用いた場合、小範囲の骨再生ならば可能であるが、再生領域が大きくなると、循環障害が生じ骨再生は困難となる。これまでの報告でも、厚みのある移植材料を用いる際には、内部に酸素と栄養を供給するための血管新生が必要であることが報告されている [26]。さらに、Maes ら[27]は、骨折部での骨形成においては、初期の血管進入が必要不可欠であると述べている。移植部の骨再生においても、骨再生に先立つ血管新生は必要不可欠と考えられる。



これまで、骨移植の材料として主に用いられてきた腸骨海綿骨細片は、全身麻酔を伴うなどの若年者が多くを占める CLP 患者にとって負担が大きい。特に、移植部に循環障害を生じ骨壊死が生じる可能性がある両側性顎裂や、顎裂幅が大きい場合、年齢が高い場合などにおいて、手術が複数回に及ぶこともあり、さらに患者の負担は増加する。このような負担を伴う二次骨移植の成否は、一般的に骨架橋を X 線写真を用いて二次元的に評価することにより行われてきた [8, 28-36]。また、X 線 CT を用いた三次元的な解析では、術後に中切歯と犬歯の歯軸のコントロールが可能な良好な骨架橋を呈していたのは僅か 21 % であったと報告している [37]。さらに、そのほとんどが月単位での評価であり、骨架橋形成までの経日的な変化を評価した報告は少ない。

そこで、上記の特徴を持つ CAP を足場とし、造血支持能による組織への生着や造血系再構築の促進作用 [38] や、HLA class II 抗原が無く免疫抑制作用を有するとされる自己 MSCs を移植することにより、既存骨と同様の骨代謝を維持した骨再生が期待される。また、MSCs は骨髓液中の細胞成分の 0.001 % ～ 0.01 % と微量であるが、一定期間未分化性を維持した培養が可能であること、さらに穿刺による骨髓の採取法が確立されていることなどの理由から、さまざまな再生治療に応用されている。歯科領域では、人工材料と自己細胞複合体による臨床応用が既に行われている [39] もの、CLP 患者における骨再生治療の

応用例は少数に留まっている。また、CLP 患者の骨移植は、成長発育途中の学童期に行われるため、移植材が速やかに吸収され、新生骨に置換されることにより、既存骨と同様に顎裂部への歯の萌出あるいは移動が可能でなければならないことが挙げられる。

以上の背景より、我々はこれまでにビーグル犬顎裂モデルを用いて MSCs と CAP 担体の移植による骨再生実験を行い、骨再生を誘導するとともに、再生部位への歯の移動が可能であることを明らかにした。その結果、移植 3 か月および 6 か月後の組織切片において、MSCs と CAP を用いた群（実験群）の再生骨における血管数は、CAP のみの群（対照群）に比較して有意に高い値を示した[40]。また、移植 3 か月後の組織像において、再生骨組織中に存在する蛍光標識された骨細胞の割合がおよそ 5.7 % であり、移植した MSCs の一部は移植部に留まり、骨芽細胞へ分化するが、その割合は少数に留まることが明らかとなった。そこで、本研究では移植 MSCs が、血管新生にどのような影響を及ぼしているかを明らかにすることを目的とした。まず、CLP 患者より採取した MSCs の同定を行い、その MSCs と血管内皮細胞（HUVEC）を用いて、*in vitro* にて血管新生の検討を行った。さらに、ビーグル犬顎裂モデルを作製し、移植部における血流量の経時的変化を観察した。

# 試料と方法

## I. MSCs の同定

### 1. 細胞採取と MSCs の単離および培養

3 名の CLP 患者より腸骨海綿骨細片移植時に骨髓液を採取した。その後、基本培地  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 10 % ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS, 第一化学, 東京)、0.24  $\mu$ l/ml カナマイシン (明治製菓, 東京)、0.5  $\mu$ l/ml ペニシリン (Sigma Aldrich)、1 mg/ml アンホテリシン B (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA)、および 400 U/ml ヘパリン (持田製薬, 東京) を添加した溶液に骨髓液を一時保存した。その後、採取した骨髓液を含む  $\alpha$ -MEM を 300 g で遠心分離し、上清を取り除き新たな  $\alpha$ -MEM を加え、直径 10 cm の細胞培養用シャーレ (CORNING, New York, NY, USA) に細胞密度  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> となるように播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にてコンフルエントになるまで 1 週間培養した。なお、本研究は、広島大学病院倫理委員会の承認 (承認番号 第疫-45) を得て行った。

## 2. MSCs の表面抗原の解析

細胞の表現形を検討するため、MSCs の指標として報告されている主な表面抗原について解析を行った。MSCs 陽性マーカーとして、PE mouse anti-human CD 29 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)、APC-H7 mouse anti-human CD 44 (BD Biosciences)、Brilliant Violet<sup>TM</sup> 421 mouse anti-human CD 73 (BD Biosciences)、FITC mouse anti-human CD 105 (BD Biosciences)、FITC mouse anti-human CD 34 (BD Biosciences)、PerCP mouse anti-human CD45 (BD Biosciences)、PE-Cy<sup>TM</sup> 7 Mouse Anti-Human CD 271 (BD Biosciences)、Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 anti-human STRO-1 (BD Biosciences) を用いた。Isotype control として、PE mouse IgG1 (BD Biosciences)、APC-H7 mouse IgG1 (BD Biosciences)、Brilliant Violet<sup>TM</sup> 421 mouse IgG1 (BD Biosciences)、FITC mouse IgG1 (BD Biosciences)、PerCP mouse IgG1 (BD Biosciences)、PE-Cy<sup>TM</sup> 7 mouse IgG1 (BD Biosciences)、Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 mouse IgG1 (BD Biosciences) をそれぞれ用いた。培養細胞（継代数 P4）を 0.25 % トリプシン（ナカライテスク, 京都）と 1 mM EDTA（和光純薬工業, 大阪）を含むリン酸緩衝液（phosphate buffered saline; PBS, 日水製薬）で処理し、調整した細胞浮遊液  $5 \times 10^5$  個の細胞を 300  $\mu$ l の PBS に懸濁し、上記抗体と 20 ～ 30 分間、4 °C で静置した。その後、細胞を 2 % FBS（第一化学）を含む PBS にて洗浄した後、250 g で 5 分間遠心し、上清を取り除き、2%

FBS を含む PBS を加えて総量を 500  $\mu$ l とした。その後、50  $\mu$ m フィルターを通してから測定を行った。なお、検出と解析については、FACS AriaII (BD Biosciences) を用いた。

### 3. 骨芽細胞への分化誘導

6-well dish (FALCON, Flanklin Lakes, NJ, USA) を type I collagen (日本ハム, 大阪) でコーティングした。その後、各ウェルに  $4.8 \times 10^3$  個の細胞を播種し、 $\alpha$ -MEM (Sigma Aldrich) にて 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 20 日間培養を行った。コンフルエントに達した時点で、 $\alpha$ -MEM に 100 nM dexamethasone (Sigma Aldrich)、10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (東京化成工業, 東京)、0.2 mM ascorbic acid 2-phosphate (Sigma Aldrich) を添加した骨芽細胞分化誘導培地 (osteogenetic differentiation medium; ODM) に置換し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 20 日間培養を行った。

### 4. 脂肪細胞への分化誘導

12-well dish (FALCON) の各ウェルに  $3.8 \times 10^4$  個の細胞を播種し、 $\alpha$ -MEM (Sigma Aldrich) にて 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 20 日間培養を行った。コンフルエントに達した後、脂肪細胞分化条件下で培養した。すなわち、 $\alpha$ -MEM に 10

$\mu\text{g/ml}$  insulin (和光純薬工業)、 $1\ \mu\text{M}$  dexamethasone (Sigma Aldrich)、 $200\ \mu\text{M}$  indomethacin (和光純薬工業)、 $500\ \mu\text{M}$  3-isobutyl-1 methylxanthine (和光純薬工業) を添加した脂肪分化誘導培地を 2 日毎に、 $\alpha$ -MEM に  $10\ \mu\text{g/ml}$  insulin (和光純薬工業) を添加した脂肪分化維持培地を 3 日毎に交換し、 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  条件下で 28 日間培養を行った。

## 5. 軟骨細胞への分化誘導

15 ml ファルコンチューブ (BD Biosciences) に  $2.5 \times 10^5$  個となるように MSCs を播種し、 $500\ \text{g}$  で 5 分間遠心後、軟骨分化誘導培地で 3 日おきに培地交換を行いながら、 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  条件下で 28 日間培養した。軟骨分化誘導培地として  $100\ \text{nM}$  dexamethasone (Sigma Aldrich)、 $50\ \mu\text{g/ml}$  ascorbate 2-phosphate (Sigma Aldrich)、 $4.5\ \text{mg/ml}$  D-glucose (Sigma Aldrich)、 $100\ \mu\text{g/ml}$  sodium pyruvate (和光純薬工業)、 $1\%$  ITS-plus ( $6.25\ \mu\text{g/ml}$  insulin,  $6.25\ \mu\text{g/ml}$  transferrin,  $6.25\ \mu\text{g/ml}$  selenous acid,  $5.33\ \mu\text{g/ml}$  linoleic acid,  $1.25\ \text{mg/ml}$  FBS)、(BD Biosciences)、 $10\ \text{ng/ml}$  TGF- $\beta$ 3 (BD Biosciences)、 $2\ \text{mM}$  L-glutamine、 $1\%$  Penicillin-streptomycin (Sigma Aldrich) を添加した  $\alpha$ -MEM (Sigma Aldrich) を用いた。

## 6. 骨芽細胞分化の評価

MSCs の骨芽細胞への分化を評価するために、骨芽細胞分化誘導 20 日目に、Alizarin Red 染色を行った。染色は、培地除去後、PBS（日水製薬）にて細胞層を洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド（和光純薬工業）にて固定し、1% Alizarin red-S solution（キシダ化学、大阪）にて行い、染色された細胞層をデジタルカメラ（Cyber-shot, SONY, 東京）で撮影した。

## 7. 脂肪細胞分化の評価

細胞の脂肪分化への分化誘導を評価するために、分化誘導後 7、14、21、および 28 日目に、Oil Red O 染色を行った。染色液はイソプロパノール 100ml Oil Red O（和光純薬工業）0.3 g を加え、ポリエチレン容器中で 24 時間、70 °C にして保存液を調製した。保存液：イオン交換水 = 6：4 に混合して攪拌後 10 分間室温で静置し、上清をフィルターにて濾過した。培地を吸引後、PBS で 2 回洗浄し、10% ホルマリンで 10 分間固定を行った。その後 PBS で 2 回洗浄を行い、使用液を加え、イオン交換水で 3 回洗浄し、オールインワン蛍光顕微鏡（BZ-8100, KEYENCE、大阪）を用いて観察を行った。

## 8. 軟骨細胞分化の評価

培地を吸引し、4% パラホルムアルデヒド（和光純薬工業）で 24 時間固定

を行った後、PBS にて細胞凝集塊の洗浄を行い、70、90、100 % エタノールにより脱水した後に 100% キシレンにて 1 時間の組織の透徹を 2 回繰り返した。その後パラフィン包埋を行い、厚さ 5  $\mu\text{m}$  の切片を作製後、toluidine blue（和光純薬工業）を用いて染色を行い、オールインワン蛍光顕微鏡（BZ-8100, KEYENCE, 大阪）を用いて観察した。

## II. MSCs と血管内皮細胞（HUVEC）を用いた血管新生についての検討

*(in vitro)*

### 1. 細胞の培養

MSCs は実験 I と同様のものを用いた。HUVEC は CellPlayer<sup>TM</sup> Angiogenesis HUVEC CytoLight Green（ESSEN BIOSCIENCE, Michigan 州, USA）を用いた。

MSCs、HUVEC とともに 2 回の継代を繰り返した後、以下の実験に使用した。

MSCs は実験 I 同様の  $\alpha$ -MEM（Sigma Aldrich）にて培養を行い、HUVEC は EBM-2 basal medium（Lonza, Basel, Switzerland）にて培養を行った。共培養においては、MSCs が EBM-2 basal medium（Lonza）で培養可能であることと、HUVEC が  $\alpha$ -MEM で培養可能であることを確認した上で、1 : 1 の割合で培地を混合したものを用いた。



## 2. MSCs と HUVEC の共培養における生細胞の変化についての検討

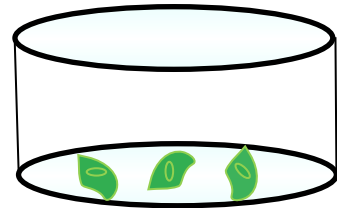
20 mm × 20 mm のチャンバースライド (IWAKI, 大阪) に HUVEC  $5.0 \times 10^3$  個の細胞を播種したもの、HUVEC と MSCs を  $2.5 \times 10^3$  個ずつ同じ割合で混合し播種したもの、HUVEC を  $5.0 \times 10^3$  個の細胞に 40 ng/ml VEGF を添加したものを 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。培養開始 2、3、4 日目にオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-8100, キーエンス) を用いて観察した。

## 3. MSCs と HUVEC の共培養における生細胞数の測定

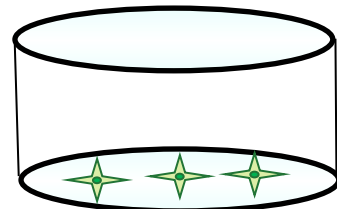
$5.0 \times 10^3$  個の HUVEC と MSCs をそれぞれ 24-well dish (FALCON) に播種し、培養したものを Monoculture 群とした (図 1-①, ②)。また、 $5.0 \times 10^3$  個の HUVEC を 24-well dish (FALCON) に播種し、0.4 μm pore size の culture insert (FALON CELL CULTURE INSERT, BECTON DICKINSON, Flanklin Lakes NJ, USA) に、 $5.0 \times 10^3$  個の MSCs を播種し、24-well plate に重層したものを HUVEC insert with MSCs とした (図 1-③)。一方、 $5.0 \times 10^3$  個の HUVEC を 24-well dish (FALCON) に播種し、0.4 μm pore size の culture insert (BECTON DICKINSON) に  $5.0 \times 10^3$  個の HUVEC を播種し、24-well plate に重層したものを MSCs insert with HUVEC とし (図 1-④)、これらを Indirect coculture 群とした。さらに各  $2.5 \times 10^3$  個の MSCs と HUVEC をそれぞれ 24-well dish

(FALCON) に混合して播種し、培養を行ったものを Direct coculture 群とした (図 1-⑤)。

① HUVEC  $1.0 \times 10^4$  cells/well (Monoculture 群)



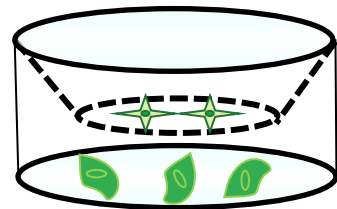
② MSCs  $1.0 \times 10^4$  cells/well (Monoculture 群)



③ HUVEC insert with MSCs (Indirect coculture 群)

HUVEC  $1.0 \times 10^4$  cells/well

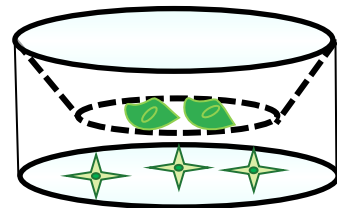
MSCs  $1.0 \times 10^4$  cells/well



④ MSCs insert with HUVEC (Indirect coculture 群)

MSCs  $1.0 \times 10^4$  cells/well

HUVEC  $1.0 \times 10^4$  cells/well



⑤ HUVEC : MSCs = 1:1 (Direct coculture 群)

HUVEC  $5.0 \times 10^3$  cells/well

MSCs  $5.0 \times 10^3$  cells/well

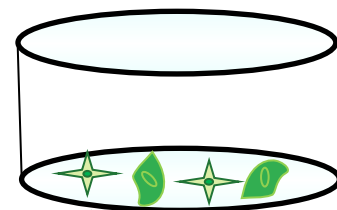


図 1 本研究で用いた培養条件

上記の 5 種の培養系について、いずれも 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。培養開始 1、3、5、7、9 日目の生細胞数を調べるため、Cell Titer®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いた 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 H-tetrazolium, inner salts (MTS) 法による評価を行った。波長 490 nm における吸光度を測定には、マイクロプレートリーダー VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いた。

#### 4. MSCs と HUVEC の共培養における血管新生関連遺伝子マーカー発現の経日的変化

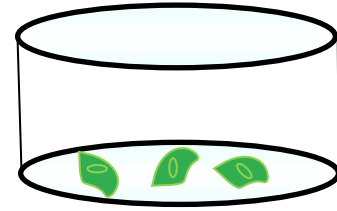
II-3 と同様の 4 種類の培養系について、図 2 に示す濃度で細胞を播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。培養開始 1、3 および 7 日目に Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と RNeasy® Mini Spin Column (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いて下層の細胞層より total RNA を抽出した。RNA は分光光度計 BioSpec-nano (島津製作所, 京都) を用いて、波長 260 nm の吸光度を測定し、定量した。その後、ReverTraAce (東洋紡, 大阪) および Random primer (東洋紡) を用いて、1 µg の total RNA から cDNA を合成し、血管新生因子である vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)、matrix metallo

proteinase-2 (MMP-2)、matrix metallo proteinase-9 (MMP-9)、platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) の発現について、SYBR Green<sup>®</sup> Real-time PCR Master Mix (東洋紡) を用いて、Lyght Cycler<sup>®</sup> 480 II (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) により遺伝子発現量を解析した。用いたプライマーの配列を表 1 に示す。反応条件は、95 °C で 15 秒の変性反応と 55 °C で 30 秒のアニーリング及び 72 °C で 10 秒の伸張反応を 1 サイクルに設定し、45 サイクル行った。

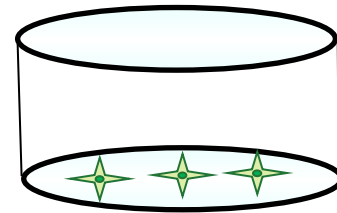
表 1. PCR プライマー塩基配列 (ヒト)

Gene	Sequence (5' → 3')	
GAPDH	forward	GTG AAC CAT GAG AAG TAT GAC AACA
	reverse	GTC CTT CCA CGA TAC CAA AGT
VEGF-A	forward	CCT TGC CTT GCT GCT CTA
	reverse	CAC CAC TTC GTG ATG ATT CTG
MMP-2	forward	ATA ACC TGG ATG CCG TCG TG
	reverse	GCC AGT CGG ATT TGA TGC TT
MMP-9	forward	CCT TGT GCT CTT CCC TGG A
	reverse	TTC GAC TCT CCA CGC ATC TC
PECAM-1	forward	GCA GTG GTT ATC ATC GGA GTG
	reverse	GAC ATC GTC ATT GTG ACC GTA

① HUVEC  $4.8 \times 10^4$  cells/well (Monoculture)



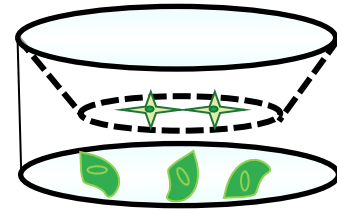
② MSCs  $4.8 \times 10^4$  cells/well (Monoculture)



③ HUVEC insert with MSCs (Indirect coculture)

HUVEC  $4.8 \times 10^4$  cells/well

MSCs  $4.8 \times 10^4$  cells/well



④ MSCs insert with HUVEC (Indirect coculture)

MSCs  $4.8 \times 10^4$  cells/well

HUVEC  $4.8 \times 10^4$  cells/well

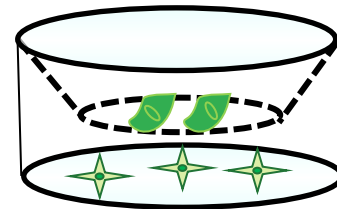


図 2 本研究で行った培養条件



## 5. MSCs における骨分化誘導が VEGF-A 遺伝子発現とタンパク質発現に

及ぼす影響

6-well dish (FALCON) に type I collagen (日本ハム) でコーティングし、 $4.8 \times 10^3$  個の細胞を播種し、 $\alpha$ -MEM にて 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 20 日間培養した。コンフルエントに達した時点の細胞を骨分化 (-) 群とした。一方、コンフルエント後、実験 I-3 同様の方法で骨分化させたものを骨分化 (+) 群とした。骨分化 (+) 群に対しては、実験 I-6 の方法と同様に 1% Alizarin red-S solution (キシダ化学) にて染色を行い、染色された細胞層をデジタルカメラ (Cyber-shot, SONY) で撮影し観察を行うとともに、両群に対して実験 II-4 と同様に Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) と RNeasy<sup>®</sup> Mini Spin Column (QIAGEN) を用いて、それぞれの細胞層より total RNA を抽出した。RNA の定量は、分光光度計 BioSpec-nano (島津製作所) を用いて、波長 260 nm の吸光度を測定し定量した。次いで、ReverTraAce (東洋紡) および Random primer (東洋紡) を用いて、1  $\mu$ g の total RNA から cDNA を合成し、VEGF-A の発現について、SYBR Green<sup>®</sup> Real-time PCR Master Mix (東洋紡) および Lyght Cycler<sup>®</sup> 480 II (Roche Diagnostics) により遺伝子発現量を解析した。用いたプライマーの配列を表 1 に示す。反応条件は、95 °C で 15 秒の変性反応と 55 °C で 30 秒のアニーリング及び 72 °C で 10 秒の伸張反応を 1 サイクルに設定し、45 サイクル行った。

また、両群に対して PBS にて洗浄後、protease inhibitor (Sigma Aldrich) を加え TritonX-buffer (ナカライテスク) を用いて細胞を回収した。得られた蛋白質溶液に SDS 電気泳動用サンプルバッファーを加え、100 °Cで 3 分間加熱して可溶化し、免疫化学的検出のための試料とした。10 % SDS-ポリアクリルアミドゲル e-PAGEL<sup>®</sup> (ATTO, 東京) 上で電気泳動により分離後、iBlot gel transfer system (Invitrogen) を用いて PVDF メンブレン上に転写した。メンブレンをブロッキング処理した後、表 2 に示す一次抗体を Can Get signal<sup>®</sup> Solution 1 (東洋紡) で希釈し、4 °Cで over night 静置した。次に、メンブレンを Wash buffer (0.1 % Tween-20 含有 PBS) にて洗浄の後、二次抗体を Can Get signal<sup>®</sup> Solution 2 (東洋紡) で希釈し、1 時間室温にて振盪した。その後、メンブレンを wash buffer にて十分に洗浄し、近赤外線蛍光検出装置 ODYSSEY (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA) にてタンパク質発現を蛍光検出し評価した。用いたブロッキング剤および抗体を表 2 に示す。

表 2 Western blot 解析に用いたブロッキング剤および抗体

	ブロッキング	一次抗体	二次抗体
<b>VEGF-A</b>	3% milk blocking 25 °C 15 分 (和光純薬工業)	Anti-VEGF antibody (ab1316, abcam, Cambridge, UK ) 1/1000 4°C over night	Goat anti-Mouse IRDye® 800 CW(LI-COR Bioscience) 1/10000 25°C 40 分
<b><math>\beta</math>-actin</b>	3% milk blocking 25 °C 15 分 (和光純薬工業)	Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin(AC-15) (Sigma Aldrich) 1/1000 25°C 120min	Goat anti-Mouse IRDye® 800 CW(LI-COR Bioscience) 1/10000 25°C 40 分

### III. MSC s を用いた再生骨の血流量の検討 (*in vivo*)

#### 1. ビーグル犬を用いた口蓋裂モデルの作製

3 か月齢の雌イヌ (TOYO ビーグル, 北山ラベス) 1 頭を用いた。ドミトール (日本全薬工業, 福島) 0.04 ml/kg を筋肉内投与にて鎮静後、ソムノペンチル (共立製薬, 東京) を等量の生理食塩水に混和した麻酔液 0.5 ml/kg を腹腔内投与し、全身麻酔を行った。そして、2% キシロカイン (デンツプライ三金, 東京) 局所麻酔下にて、左側上顎第三切歯を抜去した。その後、同部位の粘膜を剥離し、歯槽から口蓋にかけて長さ 10 mm、幅 5 mm の顎裂を歯科用フィッシャーバー (モリタ, 東京) を用いて作製し、縫合糸 (ETICON SILK, ジョンソン・エンド・ジョンソン, 東京) を用いて緊密な縫合を行った。術前および術



後 3 日間、抗菌薬（犬猫用バイトリル 2.5 %，バイエル薬品，東京）の投与を行った。約 1 か月の治癒期間を設け、創部が自然治癒しないことを確認したものを口蓋裂モデルとした（図 3）。創部の確認は、照射距離、方向、および照射線量を規格化した X 線写真（ノンスクリーン型歯科画像診断用 X 線フィルム；Kodak Ultra-Speed DF-50，ケアストリームヘルス，東京）を用いて行った（図 4）。



顎裂作製前（左）と顎裂作製後（右）



顎裂作製前の歯槽部（左）と顎裂作製後の歯槽部（右）

点線：顎裂形成部

図 3 作製した顎裂の確認

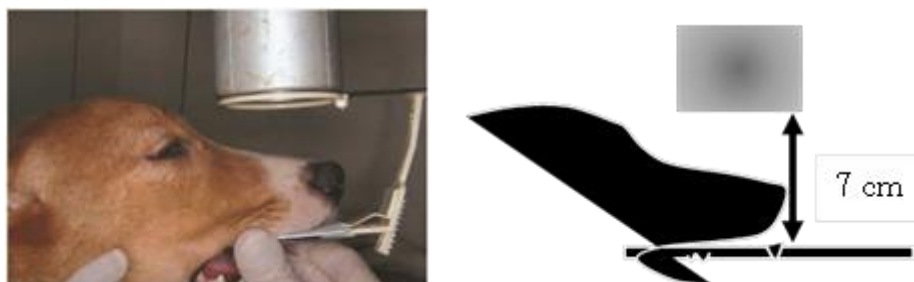


図 4 規格 X 線写真の撮影

## 2. MSCs を用いた移植体の作製

3 か月齢の雌イヌ（TOYO ビーグル）に、ドミツール（日本全薬工業）筋肉内投与にて鎮静後、ソムノペンチル（共立製薬）腹腔内投与による全身麻酔下にて、腸骨稜より小宮式穿刺針およびシリンジで骨髓液を吸引採取し、400 U/ml ヘパリン（持田製薬）を添加した基本培地ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM; 日水製薬）に 10 % FBS（第一化学）、0.24  $\mu\text{l/ml}$  カナマイシン（明治製薬）、0.5  $\mu\text{l/ml}$  ペニシリン（Sigma Aldrich）、1 mg/ml アムホテリシン B（ICN Biomedicals）を含む溶液に一時保存し、次に、採取した骨髓液を含む DMEM を 1,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清を取り除き新たな DMEM を加え、直径 10 cm の細胞培養シャーレに細胞密度  $5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  となるよう播種し、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下にて 7 日間培養した。細胞がコンフルエントに達した後、0.25 % トリプシン（ナカライテスク）と 1 mM EDTA を含む PBS を用いて細胞を分散させた後回収し、再度 10 cm の細胞培養シャーレに細胞密度  $5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  となるように播種した。

MSCs 移植当日に、CAP と培養 MSCs を用いて移植体の調整を行った。180 mg の CAP を 48 well-dish (FALCON) に入れ、DMEM で 2 回洗浄した。培養細胞を 0.25 % トリプシン (ナカライテスク) と 1 mM EDTA を含む PBS を用いて細胞を分散させた後回収し、1,500 rpm で 5 分間遠心分離を行い、cell counter にて算出した  $1 \times 10^8$  個の細胞を 1.5 ml チューブ 4 本に分注した。各チューブに細胞採取時のビーグル犬前肢より採取した末梢血から分離した血漿を 200  $\mu$ l ずつ入れ、ピペッティングを行った。CAP を準備した 24 well-plate (FALCON) に移し、ペレットと混合し、移植体とした (図 5)。作製された移植体は、移植直前まで 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で保管した。

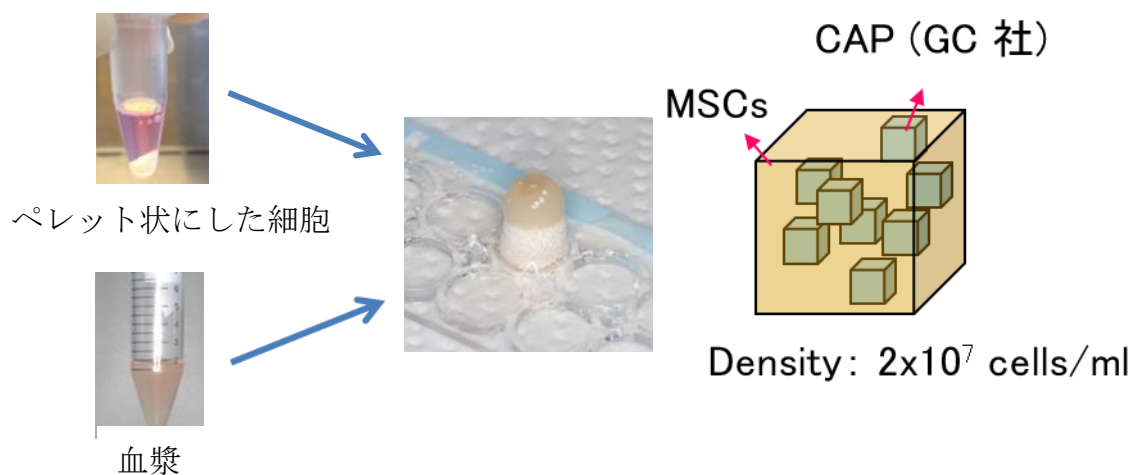


図 5 移植体の構造

### 3. レーザードップラー血流計測定のためのガイドの作製

3 mm ピンキャッチ式カツラ (TOKYU HANDS, 東京) を歯科用フィッシャ

ーバー（モリタ）を用いて筒状に成形し、1.0 mm サンプラチナ矯正線（デンツプライ三金）を上部に巻き付け蝟着し、2 本のワイヤーの断端がそれぞれ左右に来るように調整し、これを血流計のガイドとした（図 6 A-C）。ガイドは作製後、121 °C、20 分間オートクレーブによる滅菌を行った。

移植当日に NS シース（アドバンス，東京）をガイドの底面と一致させて、歯科用コンポジットレジジン（ユニフィルフロー，ジーシー，東京）を用いて固定した。レーザードップラー血流計のプローブをガイドに挿入するとガイド上部より、9.5 mm の高さとなった。

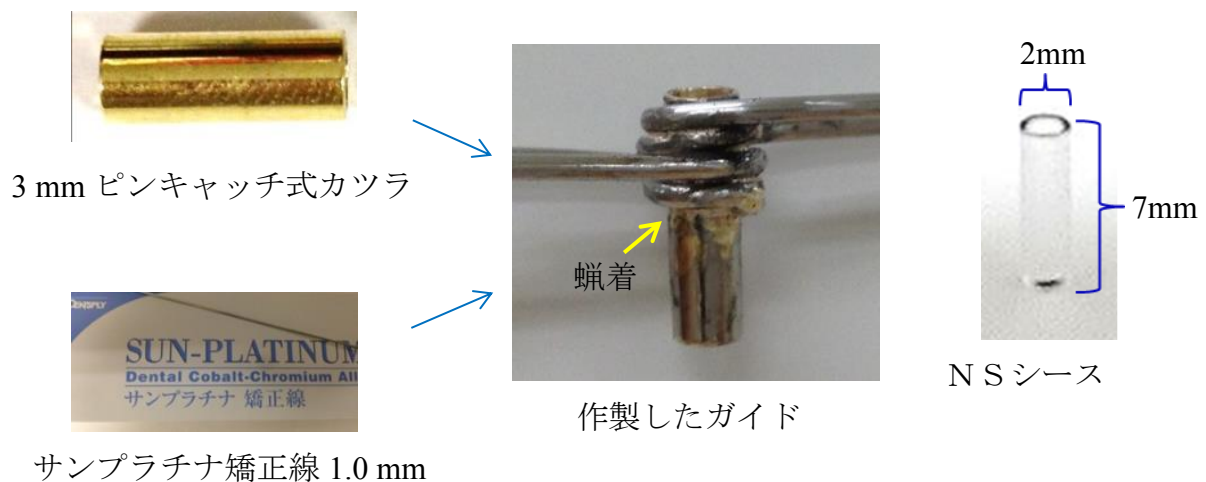
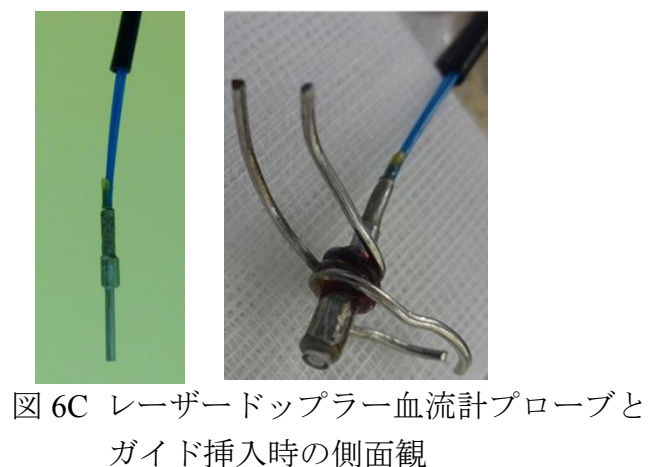


図 6A レーザードップラー血流計のガイド作製手順



#### 4. 顎裂部への移植

作製した口蓋裂モデルビーグル犬を実験Ⅲ-1と同様な手順でドミトール（日本全薬工業）0.04 ml/kg を筋肉内投与にて鎮静後、ソムノペンチル（共立製薬）を等量の生理食塩水に混和した麻酔液 0.5 ml/kg を腹腔内投与し、全身麻酔を行った。その後、2 % キシロカイン（デンツプライ三金）局所麻酔下にて、作製した顎裂部の粘膜を剥離し、骨面を露出した。その後、顎裂の中央にガイドが来るように、ワイヤーの両端をヤングのプライヤーを用いて屈曲し、両隣在歯に沿わせた。作製した CAP と MSCs からなる移植体を、露出させた顎裂部に密に充填し、その上からガイドを挿入し、調整した位置で、両隣在歯とコンポジットレジン（ジーシー）にて固定した（図 7）。固定後、粘膜を緊密に縫合した。術後 7 日間の、抗菌薬（犬猫用バイトリル 2.5 %，バイエル薬品）の投与を行い、術翌日は絶食、術後 2 ヶ月間は軟性食にて管理を行った。



骨面露出



ガイドの位置確認



移植体の埋入



隣在歯に合わせてガイドの屈曲



右側(実験側) : CAP+MSCs  
左側(対照側) : CAP のみ

図 7 顎裂部への移植手順

#### 4. レーザードップラー血流計を用いた顎裂部の血流測定と X 線写真

粘膜の治癒を待ち、移植後 3 日目より血流の測定を開始し、15 日目までは 2 日おきに測定を行った。その後は、4 日おきに 2 回測定した。測定開始 30 日目より 1 週間おきの測定に移行した (図 8)。

顎裂部における CAP の吸収および骨架橋の形成の評価を行うため、照射距離および照射線量の一定化により規格化された X 線写真により行った。

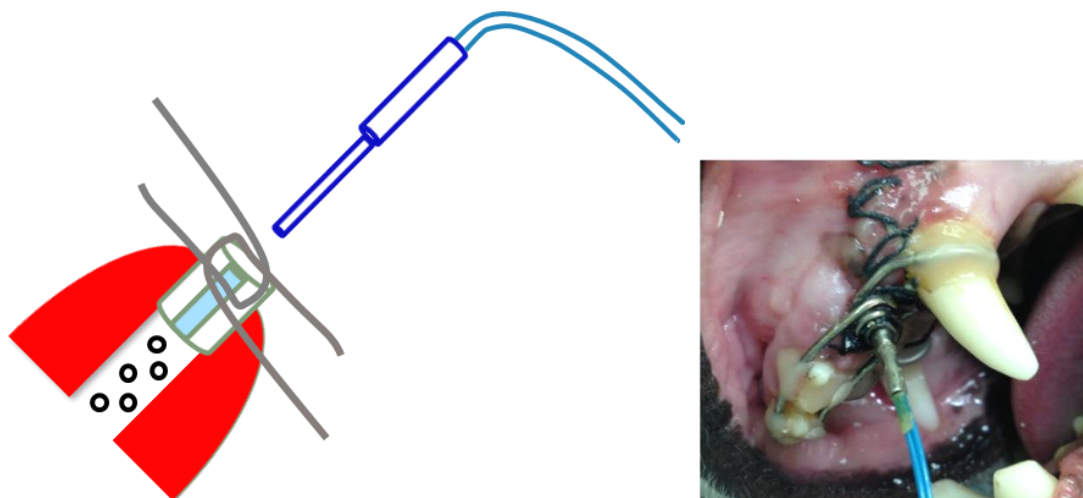


図 8 レーザードップラー血流計測定時の模式図 (断面) と実際測定時の口腔内写真



#### IV. 顎骨 MSCs の有用性の検討

##### 1. 細胞採取と MSCs の抽出および培養 (図 9)

実験Ⅲ-2 同様の方法で全身麻酔し、さらにキシロカイン（デンツプライ三金）を用いて顎骨の手術部位を局所麻酔した。骨髓液の採取部位は口腔内から到達しやすく骨髓腔が広い、ビーグル犬の下顎両側第一大臼歯分岐部歯肉とした。同部の頬側歯肉を含めた口腔内をイソジン（明治製菓）で消毒後、骨膜に達する約 1.5 cm の縦切開を 1 本入れ、剥離子を用いて歯肉と骨膜を同時に切開線の左右を約 3 mm の範囲を剥離して骨面を露出した。直径 1.8 mm のフィッシャーバー（松風、京都）を用いて骨面に垂直に皮質骨を穿孔後、穿孔部に 16 G 留置針（JMS、広島）を挿入後、内筒を抜去し、10 ml ディスポーザブルシリンジ（JMS）を接続し骨髓液を吸引採取した。骨髓液を 400 U/ml ヘパリン（持田製薬）を添加した DMEM（Sigma Aldrich）10 ml の入った 50 ml チューブに採取した。同液を採取した骨髓液が 1 ml の割合となるように調整し、DMEM 25 ml を含有した 50 ml tissue culture flask（BD biosciences）内に懸濁し培養した。培養開始後 7 日目にフラスコに接着していない細胞および血球成分を除去し新しい培地に交換した。コロニーが確認された後、0.25 % トリプシン（ナカライテスク）と 1 mM EDTA を含む PBS を用いて細胞を回収し、10 cm の細胞培養シャーレに播種した。コンフルエントに到達した後、0.25 % ト

リプシン（ナカライテスク）と 1 mM EDTA を含む PBS を用いて細胞を分散させた後回収を行い、再度 10 cm の細胞培養シャーレに細胞密度  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> となるよう播種した。腸骨 MSCs (iMSCs) に関しては実験Ⅲ-2 で採取した細胞を用いた。実験には iMSCs、顎骨 MSCs (jMSCs) とともに 2-6 回継代した細胞を用いた。

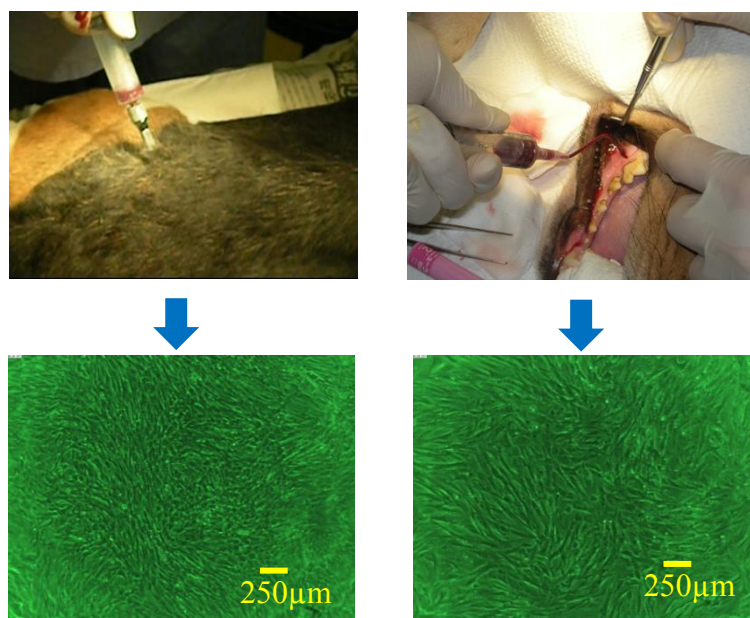


図 9 iMSCs (A) と jMSCs (B) の採取および P<sub>1</sub> 培養 10 日目細胞像

## 2. 骨芽細胞への分化誘導

実験Ⅰ-3 の方法に準じて行った。

## 3. 脂肪細胞への分化誘導

実験Ⅰ-4 の方法に準じて行った。



#### 4. 骨芽細胞分化の評価

MSCs の骨芽細胞への分化を評価するために、骨分化誘導前と骨分化誘導後 20 日目に、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定を行った。また、カルシウム沈着量について Ca 定量を行うとともに石灰化沈着物を確認するため、Alizarin Red 染色を行った。

##### 1) ALP 活性の測定

pNPP Alkaline Phosphatase Assay kit colorimetric (AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA) を用いて ALP 活性の測定を行った。DMEM (Sigma Aldrich) にて 10 日間培養を行い、コンフルエントに達した細胞の培地を除去し、PBS (日水製薬) にて 2 回洗浄後、0.2 % TritonX-100 assay buffer (Roche Diagnostics) で 5 分間室温にて処理し、セルスクレーパーにて細胞の回収を行った。その後、Sonic Vibra Cell (Sonic & Materials Inc., Newtown CT, USA) で細胞を粉砕した。得られた抽出物をマイクロプレートリーダー (Model 550; BIO-RAD) を用い、波長 405 nm にて得られた発色産物の吸光度を測定した。同様の手順で、ODM にて 20 日間骨芽細胞分化誘導を行った培養細胞の吸光度も測定した。

##### 2) カルシウム沈着量定量

DMEM にて 10 日間培養を行い、コンフルエントに達した状態の細胞層の培

地を吸引し、細胞層を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄後、10 % ギ酸 (片山化学工業, 大阪) で 30 分間処理し、カルシウムを抽出した。その後、カルシウム-C テストワコー (和光純薬工業) を用いて、マイクロプレートリーダー (Model 550; BIO-RAD) を用い、波長 570 nm における発色産物の吸光度を測定した。なお、標準曲線の作製には、付属のカルシウム標準液を用いた。

ODM にて 20 日間培養した細胞を回収し、同様の手順を行った。

### 3) Alizarin Red 染色

実験 I-6 の方法に準じて行った。

## 5. 脂肪細胞分化の評価

実験 I-7 の方法に準じて行った。

## 6. MSCs の生細胞数および増殖活性の検討

### 1) MSCs の生細胞数の測定

24-well dish (FALCON) に jMSCs と iMSCs を各  $5.0 \times 10^3$  個を播種し、DMEM (Sigma Aldrich) にて 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。培養開始 2、3、5、7、9 日目に Cell Titer<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いた MTS 法によって生細胞数を測定した。

波長 490 nm における吸光度の測定には、マイクロプレートリーダー VERSAmax (Molecular Devices) を用いた。

## 2) MSCs の増殖活性 (DNA 合成量) の測定

jMSCs と iMSCs を 96 well plate (FALCON) に  $1.6 \times 10^3$  個となるよう細胞を播種し、DMEM (Sigma Aldrich) にて培養を行った。培養開始後 2、3、5、7、9 日目に Cell proliferation ELISA BrdU Kit (Roche Diagnostics) を用いて DNA 合成量を評価した。培地中に 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) を添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。余剰の BrdU を除去した後、抗 BrdU 抗体を加え、得られた発色産物の波長 370 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー VERSAmax (Molecular Devices) を用いて測定した。

## 7. 各 MSCs における培養日数と継代数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現量の変化

### 1) jMSCs と iMSCs の培養日数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現量の変化

jMSCs と iMSCs を 6-well plate (FALCON) に、それぞれ  $4.8 \times 10^4$  個となるよう細胞を播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。培養開始 2、6 日目に Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) と RNeasy<sup>®</sup> Mini Spin Colum (QIAGEN) を

用いて下層の細胞層より total RNA を抽出した。RNA の定量は分光光度計 BioSpec-nano（島津製作所）を用いて、波長 260 nm の吸光度を測定することにより行った。次いで、ReverTraAce（東洋紡）および Random primer（東洋紡）を用いて、1  $\mu$ g の total RNA から cDNA を合成し、血管新生因子である VEGF-A の発現について、SYBR Green<sup>®</sup> Real-time PCR Master Mix（東洋紡）および Lyght Cycler<sup>®</sup>480 II（Roche Diagnostics）を用いて遺伝子発現量を解析した。用いたプライマーの配列を表 3 に示す。反応条件は、95  $^{\circ}$ C で 15 秒の変性反応と 55  $^{\circ}$ C で 30 秒のアニーリング及び 72  $^{\circ}$ C で 10 秒の伸張反応を 1 サイクルに設定し、45 サイクル行った。

表 3. PCR プライマー塩基配列（イヌ）

Gene	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')	
GAPDH	forward	GTG AAC CAT GAG AAG TAT GAC AACA
	reverse	GTC CTT CCA CGA TAC CAA AGT
VEGF-A	forward	CCT TGC CTT GCT GCT CTA
	reverse	CAC CAC TTC GTG ATG ATT CTG

## 2) jMSCs と iMSCs の継代数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現量の変化

継代数がそれぞれ  $P_1$  と  $P_3$  の jMSCs と iMSCs を 6-well plate（FALCON）に、それぞれ  $4.8 \times 10^4$  個となるように播種し、37  $^{\circ}$ C、5 %  $\text{CO}_2$  条件下で培養を行った。コンフルエントに到達する培養開始 10、14 日目において、実験IV-3

-1 と同様の方法で、VEGF-A 遺伝子発現量を解析した。

#### 8. 各 MSCs における骨分化誘導が VEGF-A 遺伝子発現に及ぼす影響

jMSCs と iMSCs を実験 II-5 と同様の方法にて培養を行い、骨分化誘導による VEGF-A 遺伝子発現量への影響を検討した。

# 結果

## I . MSCs の同定

### 1. MSCs の表面抗原の解析

CLP 患者の腸骨骨髓より採取・培養した細胞は、フローサイトメーターによる表面抗原解析により、CD 29、CD 44、CD 73 および CD 105 で陽性、CD 34、CD 45、CD 271、STRO-1 が陰性であることがわかった（図 10-12）。

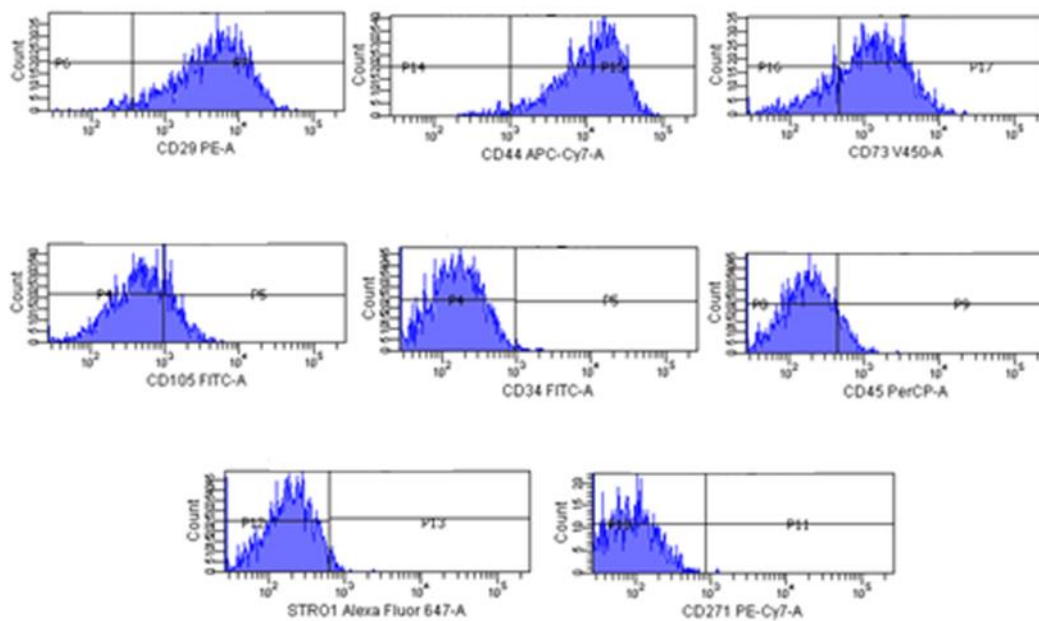


図 10 患者 A のヒストグラム

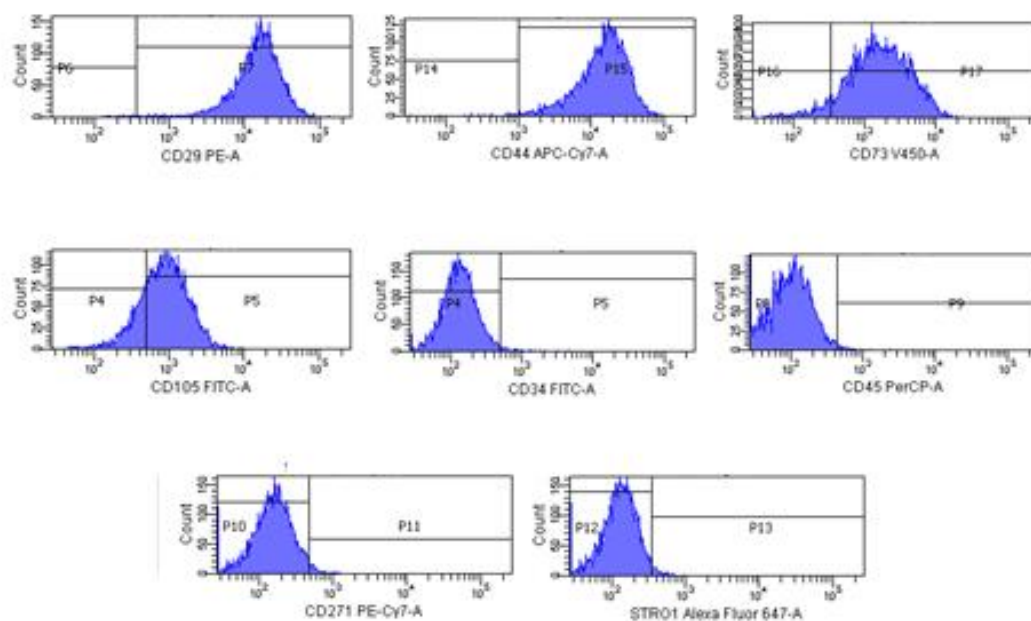


図 11 患者 B のヒストグラム

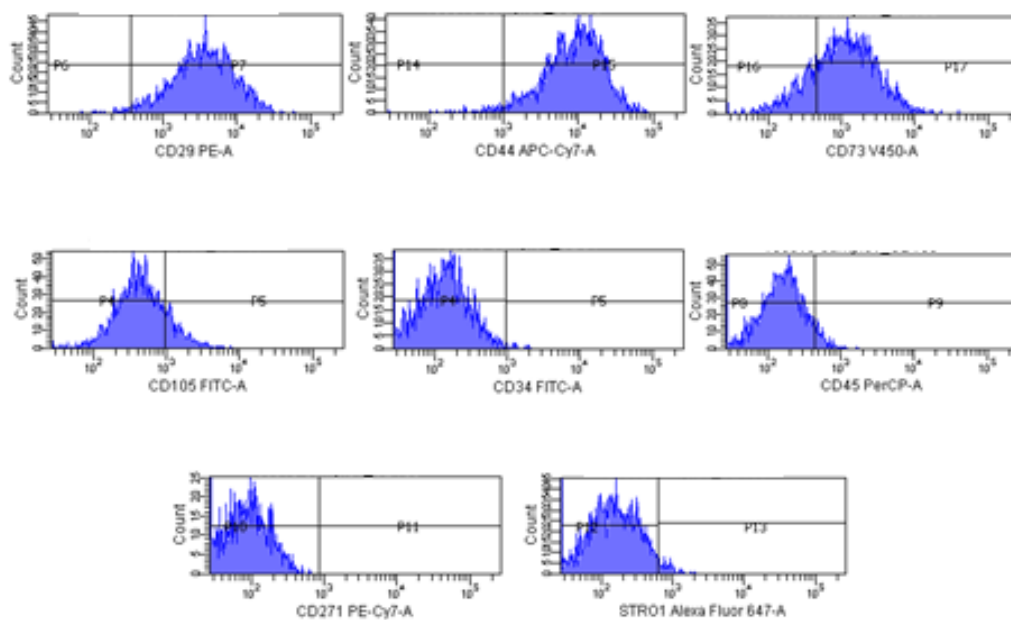
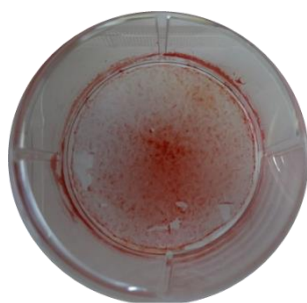


図 12 患者 C のヒストグラム

## 2. 骨芽細胞への分化

Alizarin Red 染色の結果、骨芽細胞分化誘導後に顕著な陽性反応が認められた (図 13)。

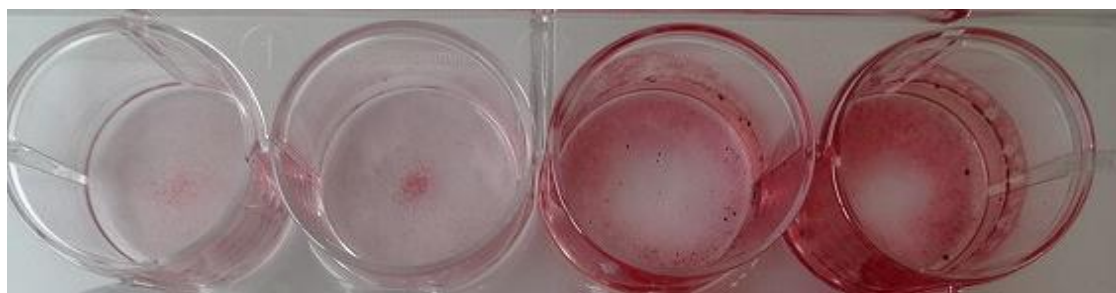


Day 20      N=3

図 13 骨芽細胞分化誘導後の Alizarin Red 染色

## 3. 脂肪細胞への分化

脂肪細胞への分化誘導開始 7、14、21 および 28 日目において、Oil Red O 染色により赤く染色された脂肪滴が確認された (図 14)。



Day 7

Day 14

Day 21

Day 28

N=3

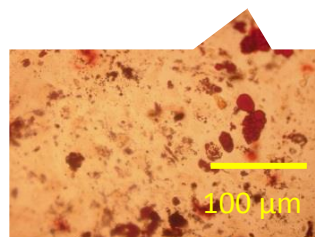


図 14 脂肪細胞分化誘導前後の Oil Red O 染色



### 3. 軟骨細胞への分化

軟骨細胞への分化誘導開始 28 日目において、Toluidine Blue 染色にて青く染色された軟骨基質が確認された（図 15）。

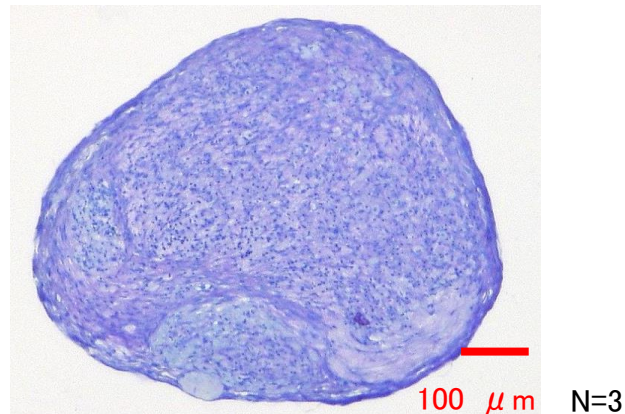


図 15 軟骨細胞分化誘導後の Toluidine Blue 染色

## II. MSCs と HUVEC を用いた血管新生

### 1. MSCs と HUVEC の共培養における生細胞の変化

MSCs と HUVEC の coculture 群において、培養開始 3 日目より管腔様構造が認められた。その後も、複数の管腔様構造の連なりが認められた（図 16）。

一方、HUVEC に VEGF を添加した群と HUVEC の monoculture 群においては、明確な管腔様構造の形成は認められなかった。

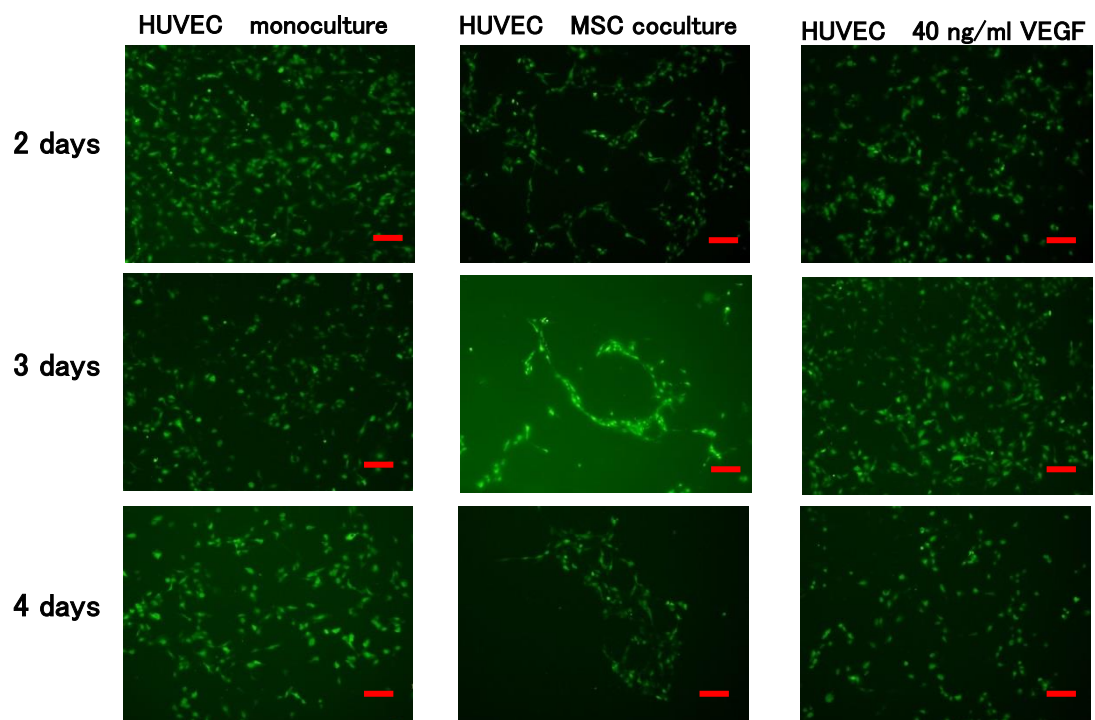


図 16 培養開始 2、3 および 4 日目における蛍光顕微鏡細胞培養像 200  $\mu$ m

## 2. MSCs と HUVEC の共培養における生細胞数の変化

培養 3 日目の細胞像では、MSCs、HUVEC とともに indirect coculture 群では顕著な細胞増殖が認められた（図 17）。一方、direct coculture 群では、HUVEC 形状を呈する細胞は認められず、紡錘形の細胞が多くを占め、管腔様構造を呈した。Monoculture 群では、同様の変化は認められなかった。MSCs と HUVEC の生細胞数は、indirect coculture 群において、monoculture 群に比較して、有意に高い増加が認められた。一方、direct coculture 群では indirect coculture 群ほど高い増加は認められなかった（図 18）。

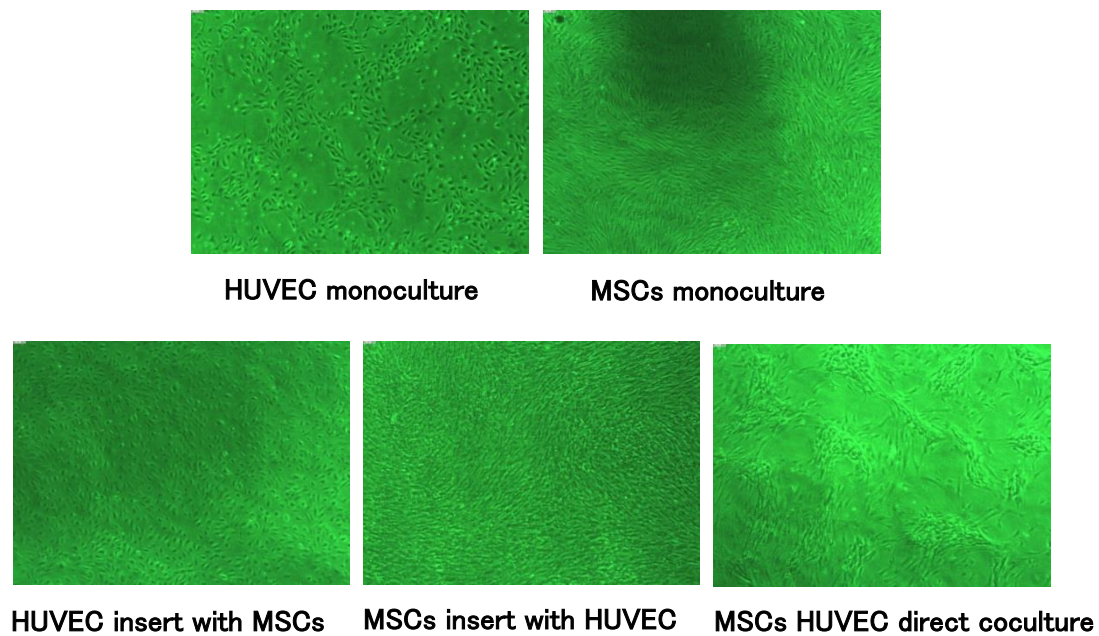


図 17 培養 3 日目の細胞像

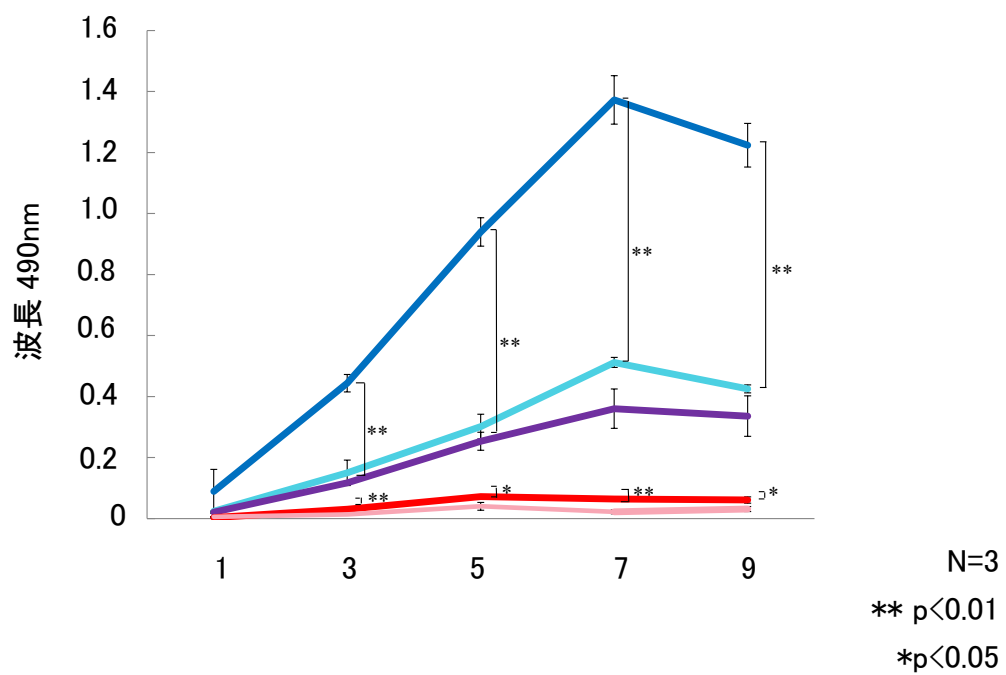


図 18 培養条件の違いによる MSCs と HUVEC の生細胞数の変化

### 3. MSCs と HUVEC の共培養における血管新生関連遺伝子発現量の

経日的変化

#### 1) MSCs と HUVEC の共培養における VEGF-A 遺伝子発現量の変化

MSCs と HUVEC の共培養により、培養開始 3 日目および 7 日目の MSCs における VEGF-A 遺伝子発現は monoculture と比較して有意に亢進し、HUVEC における VEGF-A 遺伝子発現は monoculture と比較して有意な亢進は認められなかった。(図 19)。

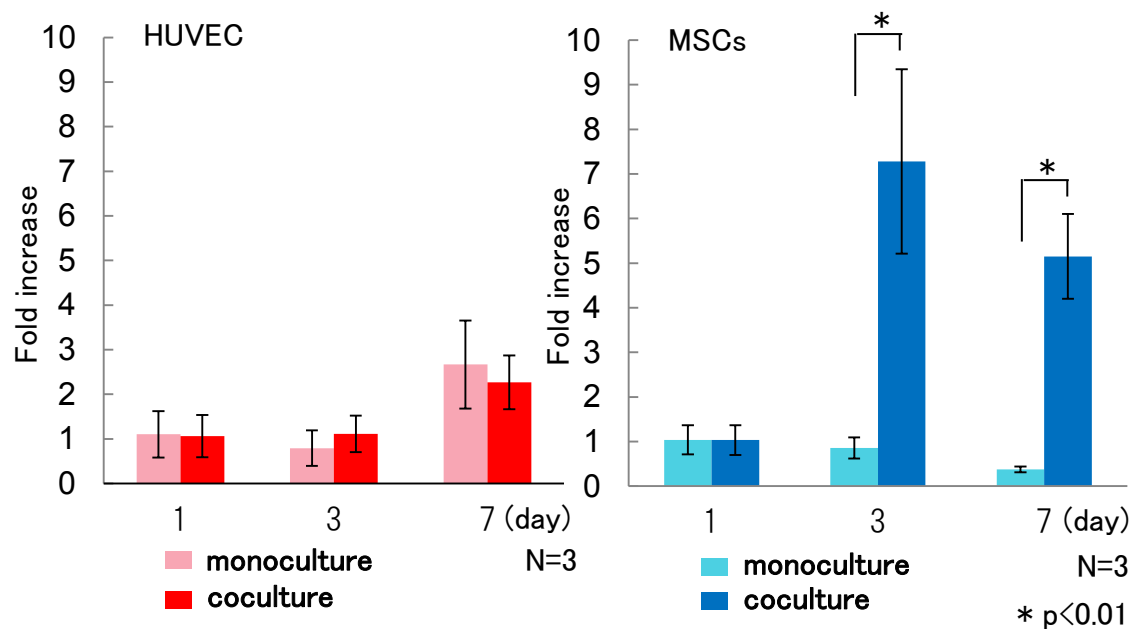


図 19 MSCs と HUVEC における VEGF-A 遺伝子発現量の変化

## 2) MSCs と HUVEC の共培養における MMP-2 遺伝子発現量の変化

HUVEC の MSCs との indirect coculture を行うことにより、7 日目の HUVEC における MMP-2 遺伝子発現は monoculture と比較して有意に亢進した。一方、3 日目および 7 日目の HUVEC における MMP-2 遺伝子発現は monoculture と比較して有意に抑制した (図 20)。

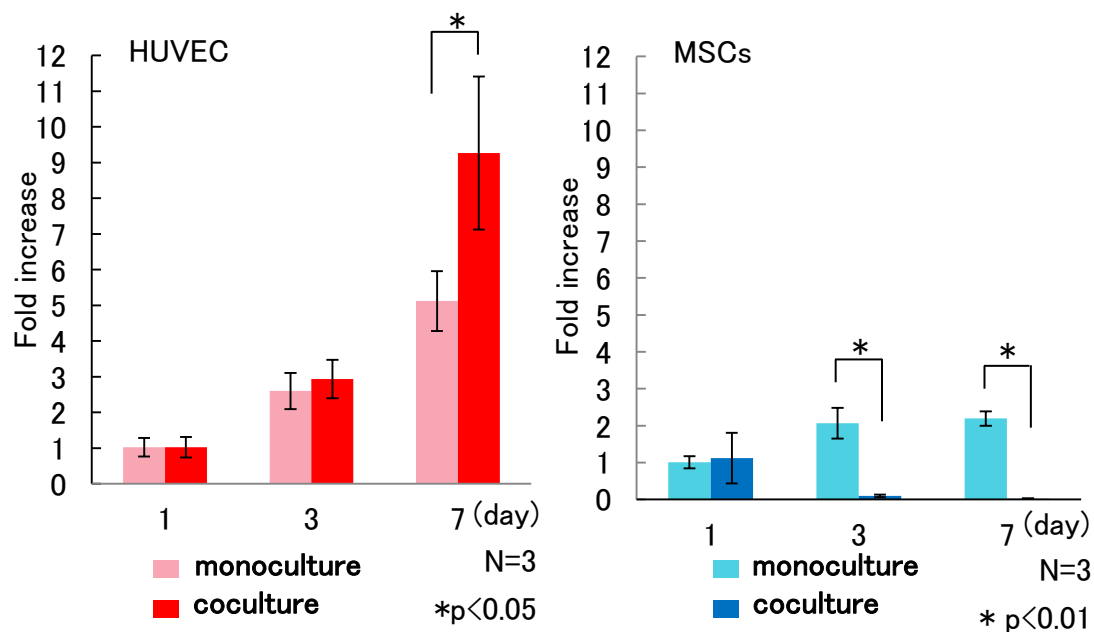


図 20 MSCs と HUVEC における MMP-2 遺伝子発現量の変化

### 3) MSCs と HUVEC の共培養における MMP-9 遺伝子発現量の変化

HUVEC と MSCs との indirect coculture を行うことにより、3 日目および 7 日目の HUVEC における MMP-2 遺伝子発現は monoculture と比較し、有意に亢進した。一方、3 日目および 7 日目の MSCs における MMP-2 遺伝子発現は monoculture と比較し、有意に抑制された。(図 21)

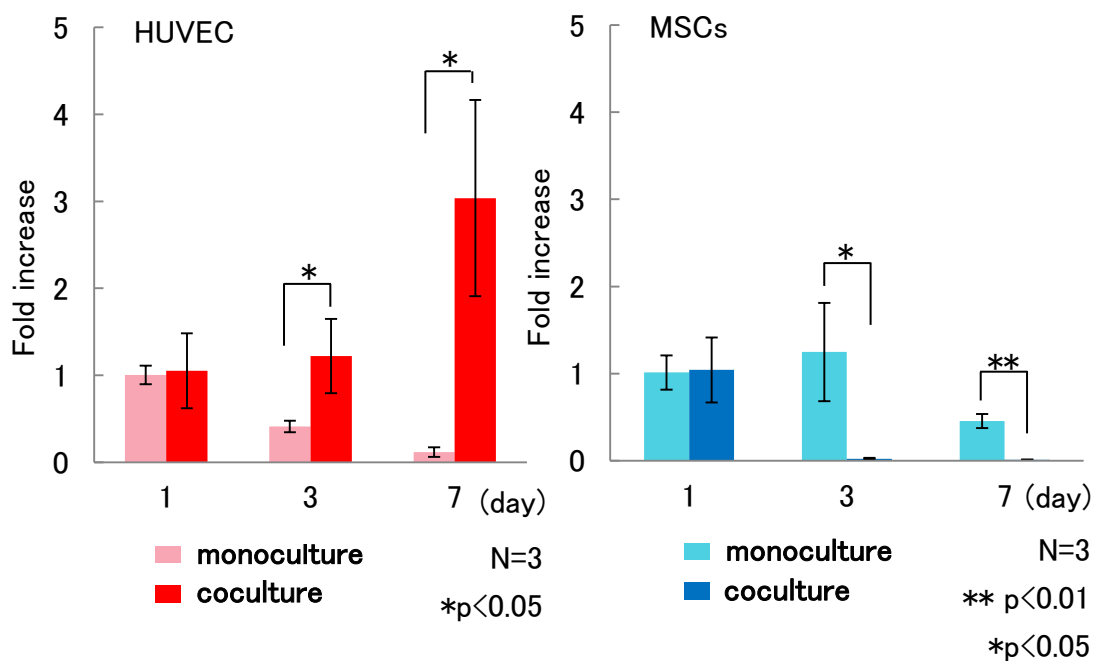


図 21 MSCs と HUVEC における MMP-9 遺伝子発現量の変化

### 3) MSCs と HUVEC の共培養における PECAM-1 遺伝子発現量の変化

HUVEC と MSCs との indirect coculture を行うことにより、3 日目における HUVEC の PECAM-1 遺伝子発現は monoculture と比較して有意に抑制され、7 日目における PECAM-1 遺伝子発現は monoculture と比較して有意に亢進した。一方、3 日目および 7 日目の MSCs における PECAM-1 遺伝子発現は monoculture と比較し、有意に抑制された (図 22)。

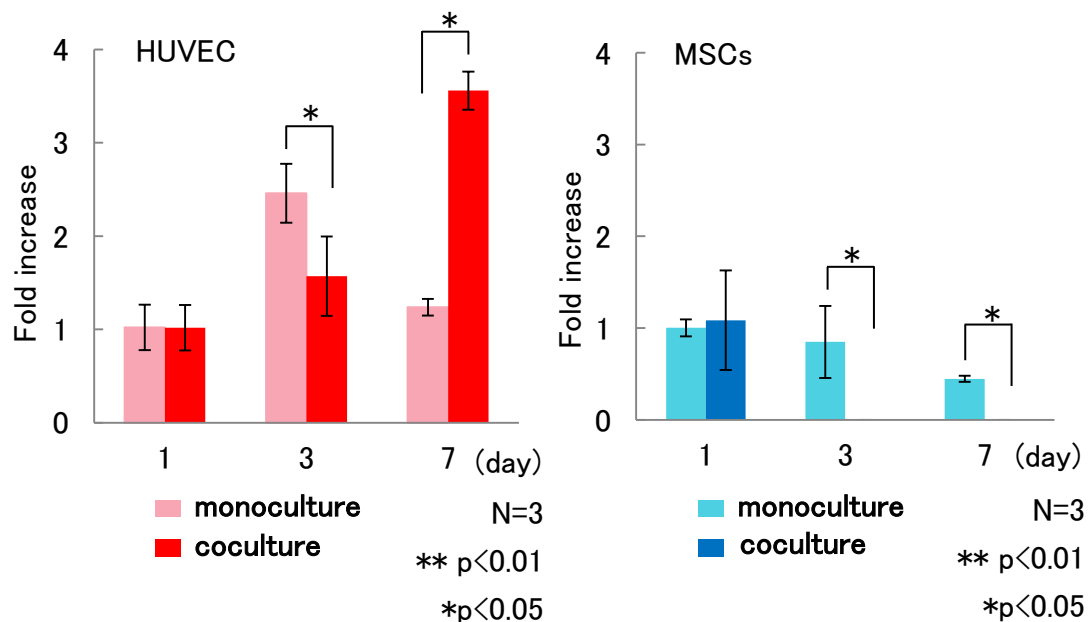


図 22 MSCs と HUVEC における PECAM-1 遺伝子発現量の変化

#### 4. MSCs における骨分化誘導が遺伝子発現とタンパク質発現に及ぼす影響

MSCs 培養開始 20 日後の Alizarin Red 染色において、骨分化が確認された (図 23)。また、骨分化誘導した MSCs では、VEGF-A の遺伝子発現は、有意に低下した (図 24)。さらに、ウェスタンブロット解析により VEGF-A のタンパク質発現が減少することが示された (図 25)。



図 23 骨分化誘導開始後 20 日目の Arizarin Red 染色

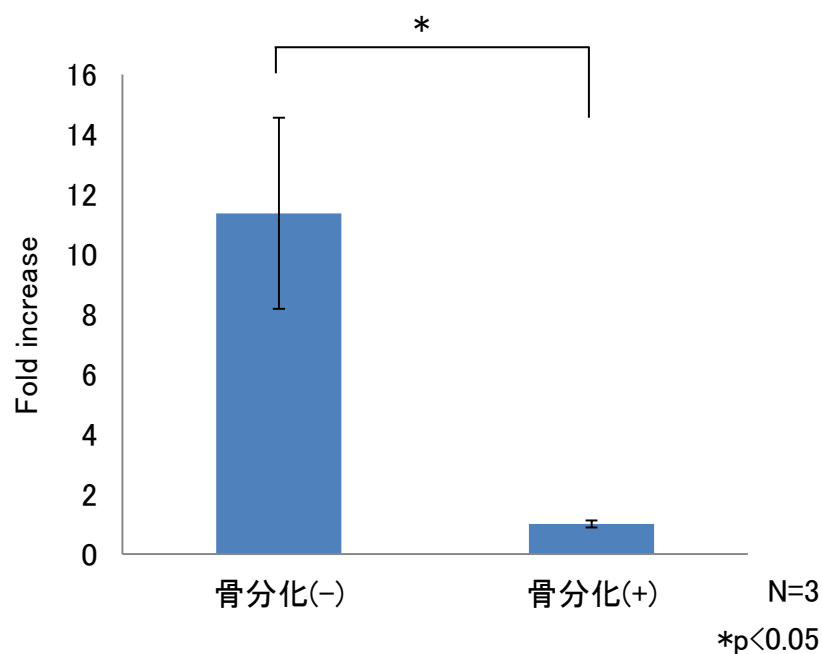


図 24 骨分化誘導の有無による VEGF-A 遺伝子発現



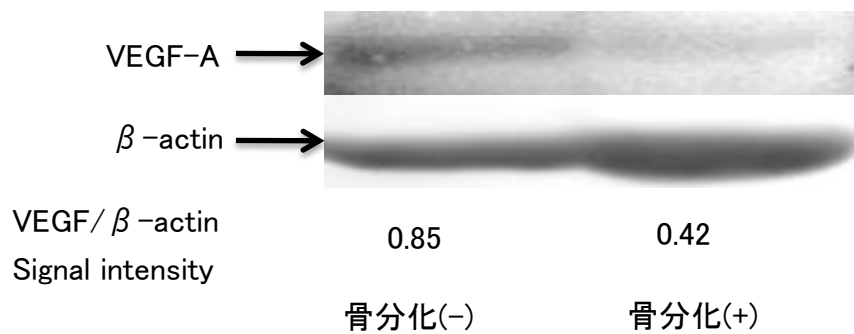


図 25 骨分化誘導による VEGF-A 蛋白発現の変化

### III. MSCs を用いた再生骨血流量

#### 1. ビーグル犬を用いた口蓋裂モデル（図 26）

顎裂形成後 1 か月目の評価において、両側の創部ともに自然治癒が生じていないことが X 線写真により確認された（図 27）。また口腔内に炎症所見は認められなかった。



図 26 顎裂作製直後の口腔内写真



図 27 顎裂作製後 1 か月目の評価

## 2. 移植後のビーグル犬の体重変化

移植後、ビーグル犬の著名な体重変化は認められなかった（図 28）。

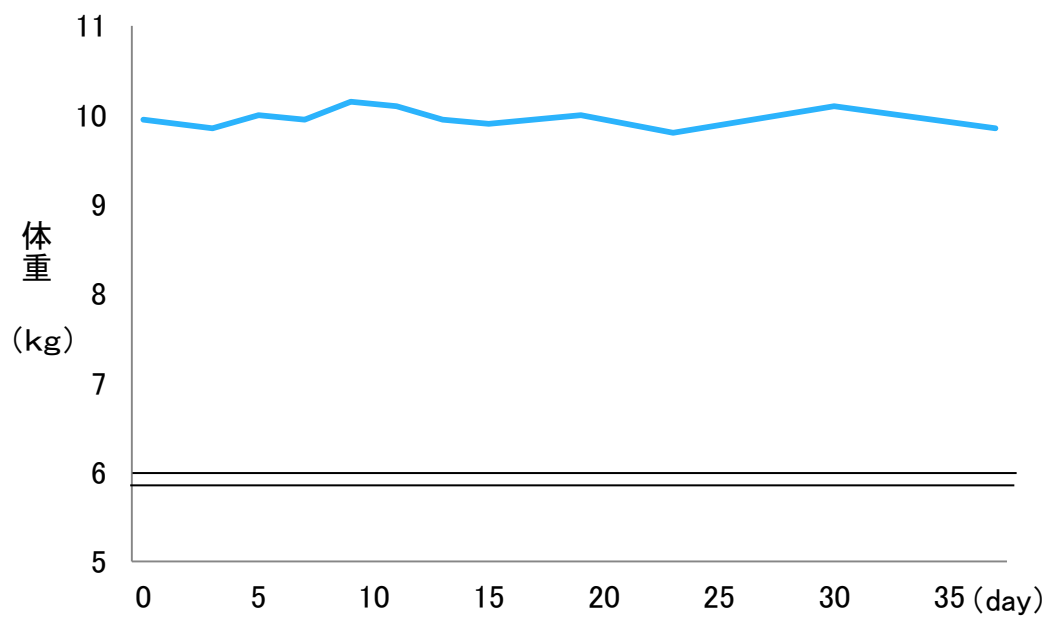


図 28 移植後のビーグル犬の体重変化

### 3. レーザードップラー血流計を用いた移植後の血流量の変化

実験側、対照側ともに 3 日目、5 日目ではほぼ血流は計測されず、7 日目に両側ともに血流が認められ、実験側は 9 日目にピークを迎えた。一方、対照側は 11 日目にピークを迎えた。その後、両側ともに血流は減少したが、実験側では著しい血流の減少が起こり、MSCs を用いた実験側では、対照側と比較して計測部における血流の回復と減少が早いことが示された。その後、血流は、実験側は移植後 23 日目より、対照側は移植後 47 日目よりともにプラトーとなったが、実験側においては移植後 54 日目より再び血流の増加が認められた(図 29)。

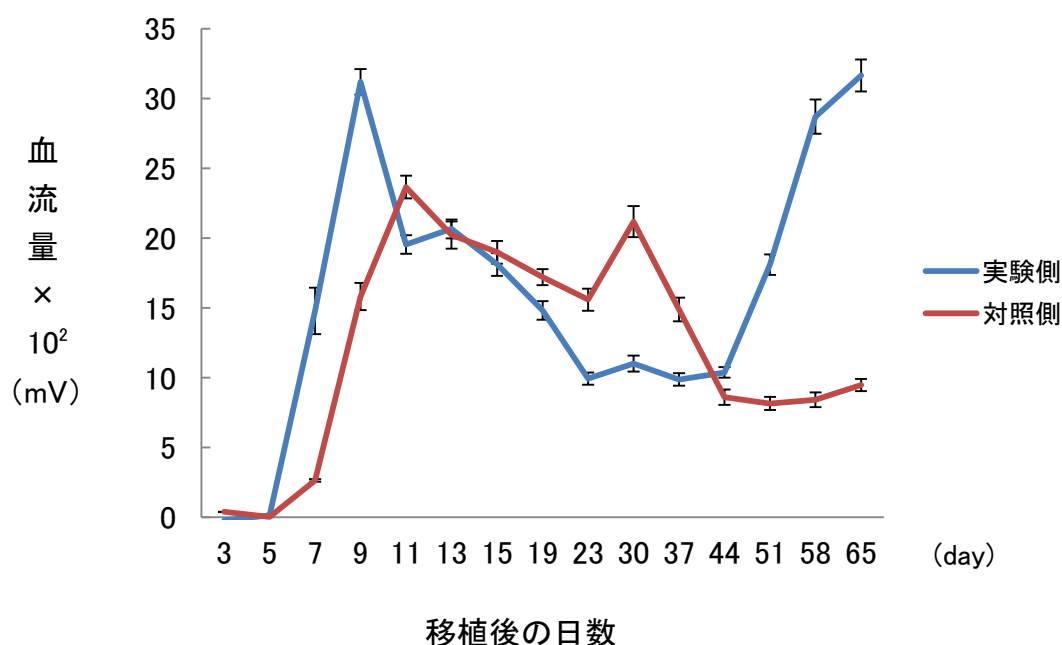
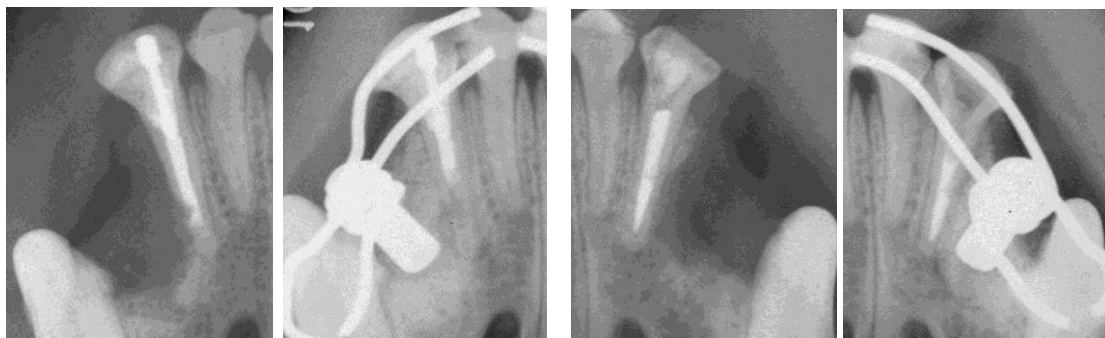


図 29 移植後のビーグル犬血流変化

#### 4. X 線写真による評価

X 線写真による評価では、移植直後において、実験側、対照側ともに移植体が緊密に充填されているのが確認された（図 30）。移植 1 週間後より、実験側では既存骨との境界に透過像が出現した。2 週間には実験側では透過像が広がり、対照側においても透過像が認められるようになった。移植 3 週間後、4 週間および 5 週間には実験側では顎裂部の鼻腔側底面に不透過像が出現し、骨化が開始した様子が観察された。一方、対照側ではさらに透過像が広がり、CAP 顆粒の存在が確認された。実験側において移植 8 週間には歯冠側に明らかな骨架橋が認められた（図 31, 32）。



実験側

対照側

図 30 移植前（右側）と移植直後（左側）における X 線写真

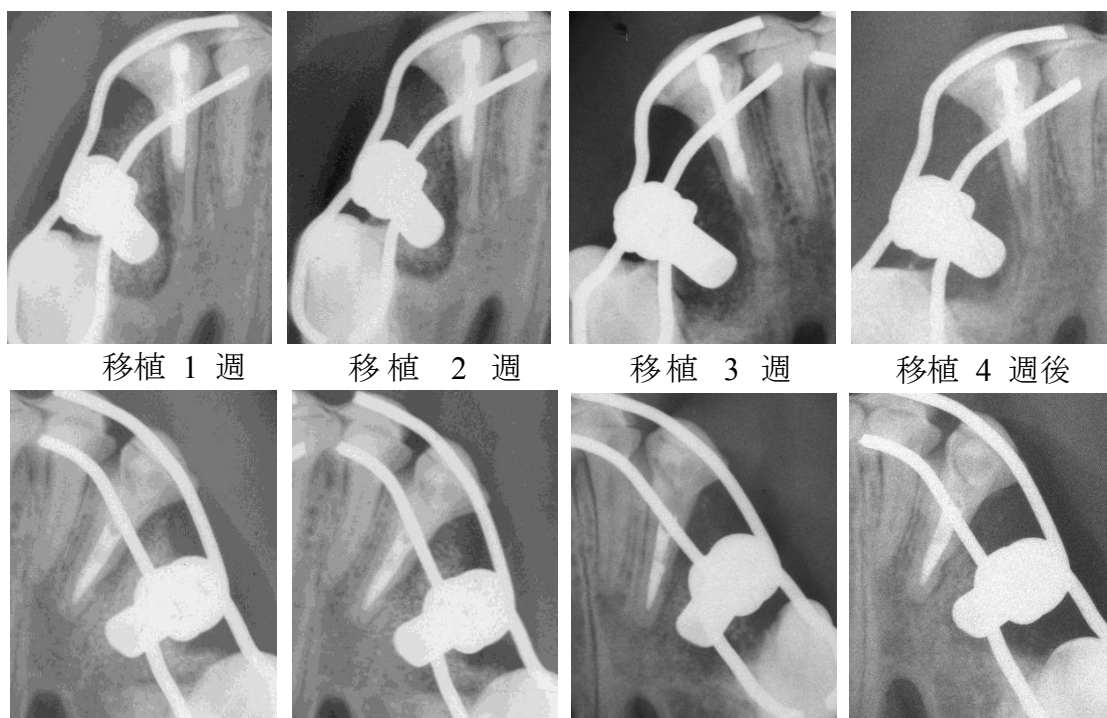


図 31 移植後 1-4 週の X 線写真 上段：実験側 下段：対照側

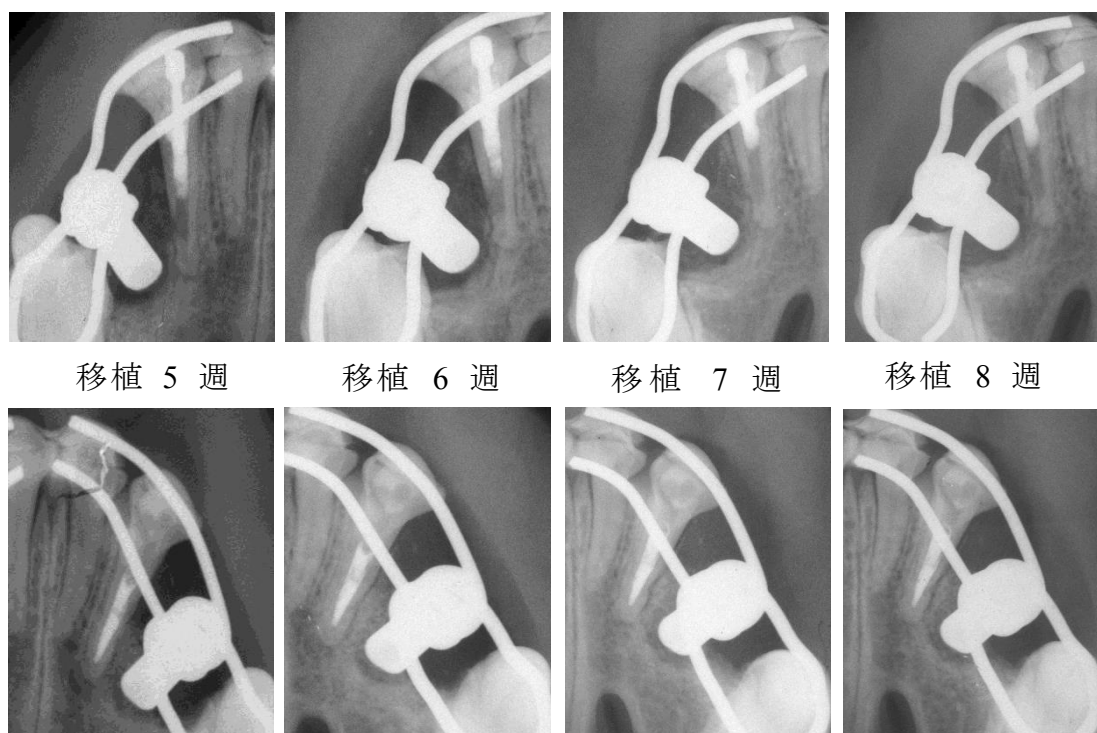


図 32 移植後 5-8 週の X 線写真 上段：実験側 下段：対照側

#### IV. jMSCs の有用性

##### 1. 骨芽細胞への分化

jMSCs、iMSCs とともに骨芽細胞分化誘導前と比較し、誘導後に ALP 染色により陽性顆粒が多く認められ（図 33）、ALP 活性が有意に増加したことが確認された（図 34）。また、jMSCs、iMSCs とともに Ca 沈着量においても骨芽細胞分化誘導後に有意な上昇を認めた（図 35）。さらに、jMSCs と iMSCs とともに Alizarin Red 染色の結果、骨芽細胞分化誘導後に顕著な陽性反応が認められた（図 36）。

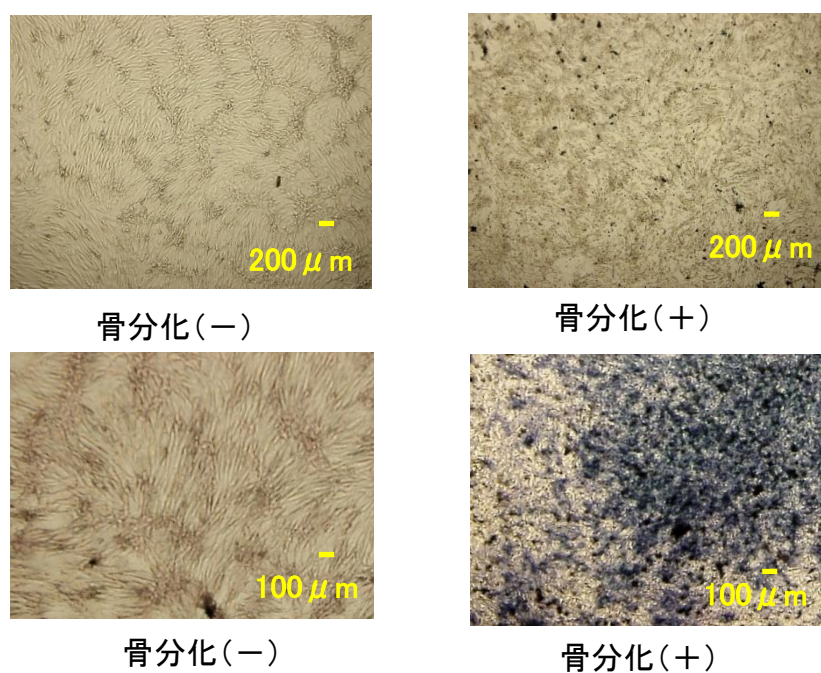


図 33 骨分化誘導前後の ALP 染色

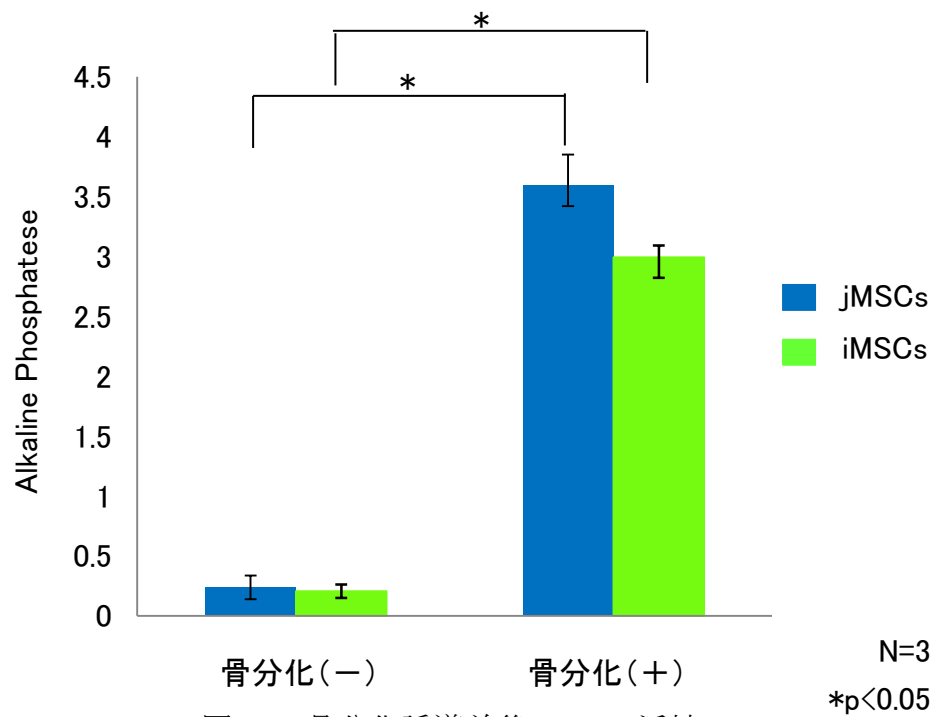


図 34 骨分化誘導前後の ALP 活性

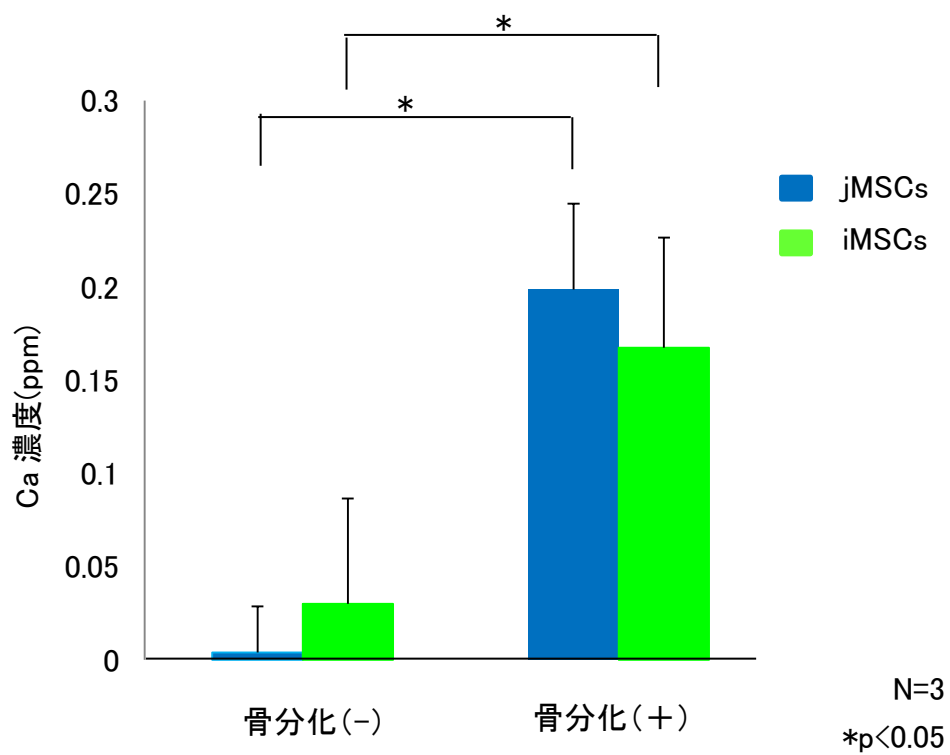


図 35 骨分化誘導前後の Ca 量の変化



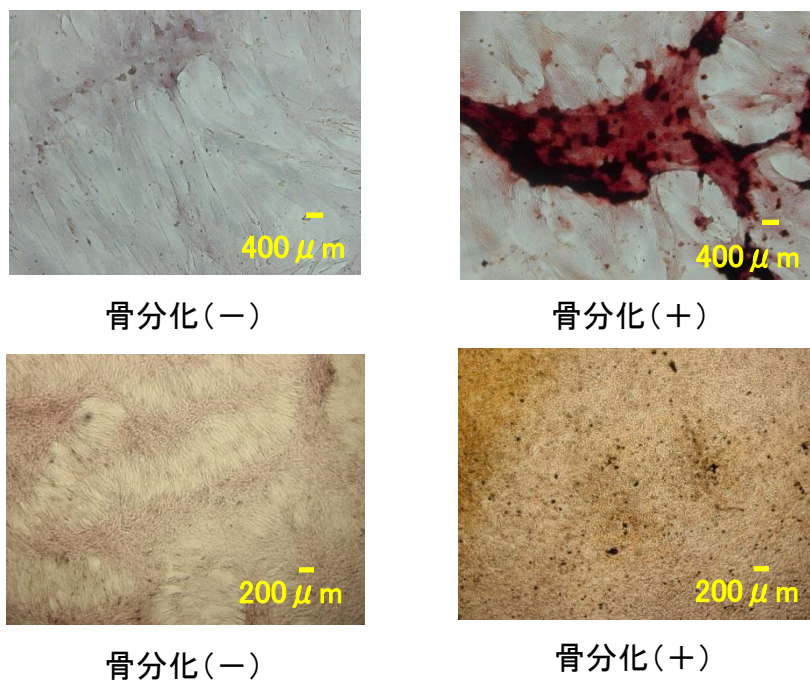


図 36 骨分化誘導前後の Alizarin Red 染色

## 2. 脂肪細胞への分化

jMSCs、iMSCs とともに、脂肪分化誘導開始 28 日において、Oil Red O 染色により赤く染色された脂肪滴が確認された（図 37）。

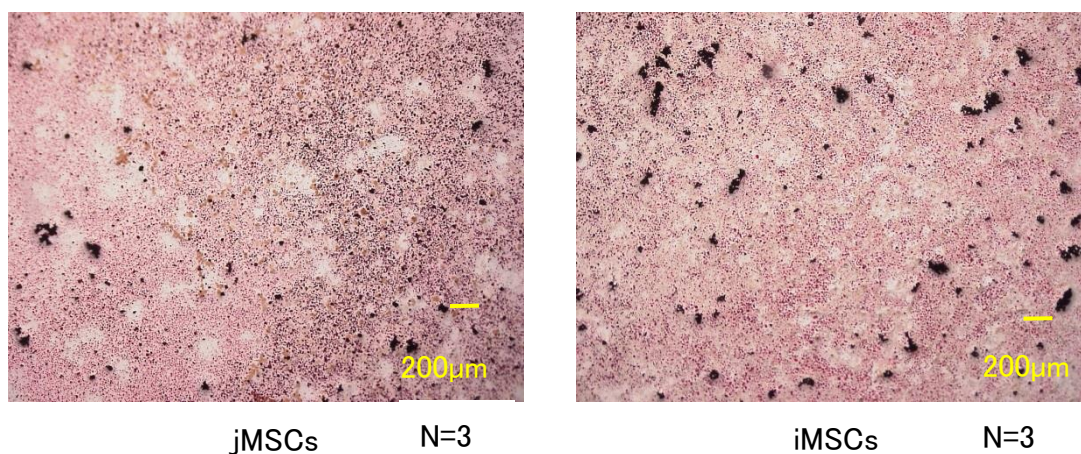


図 37 脂肪細胞分化誘導前後の Oil Red O 染色



### 3. MSCs の生存数および増殖活性

MTS assay の結果より、培養開始後 7 日目までは、jMSCs、iMSCs 共に増加し、生細胞数に有意な差は認められなかった（図 38）。jMSCs と iMSCs の増殖活性は、5 日目まで有意差なく共に亢進傾向を認め、7 日目に iMSCs が jMSCs と比較すると有意に高い値となった（図 39）。

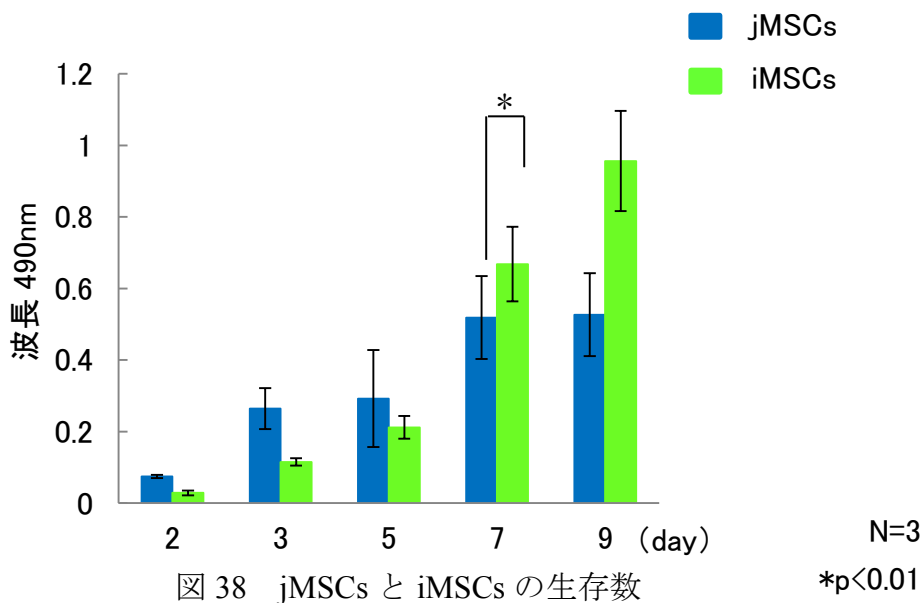


図 38 jMSCs と iMSCs の生存数

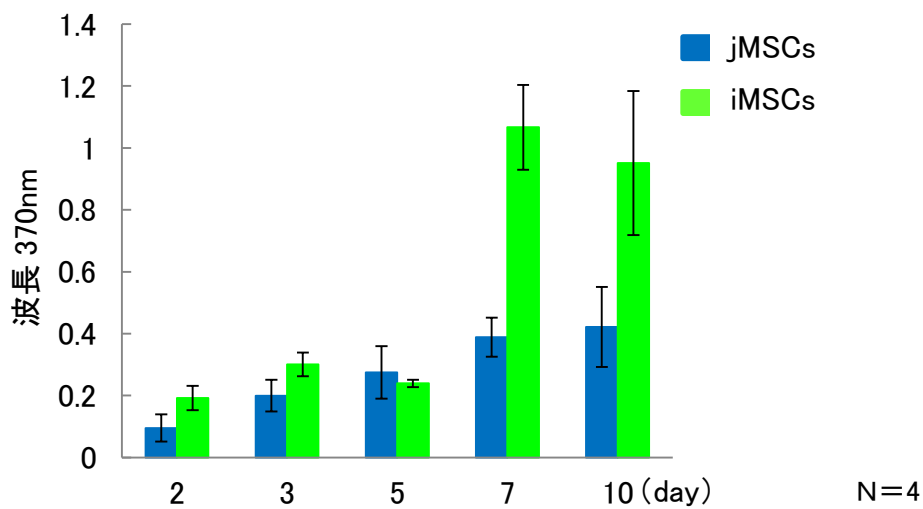


図 39 jMSCs と iMSCs の細胞増殖能

#### 4. jMSCs と iMSCs における培養日数と継代数の違いが VEGF-A 遺伝子発現に及ぼす影響

培養日数による VEGF-A 遺伝子発現量は jMSCs、iMSCs とともに増加し、jMSCs においては 2 日と 6 日において有意な差が認められた (図 40)。また、jMSCs は、継代数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現量の有意差は認められなかったが、iMSCs は、10 日目において  $P_1$  と比較して  $P_3$  が有意に増加した (図 41)。

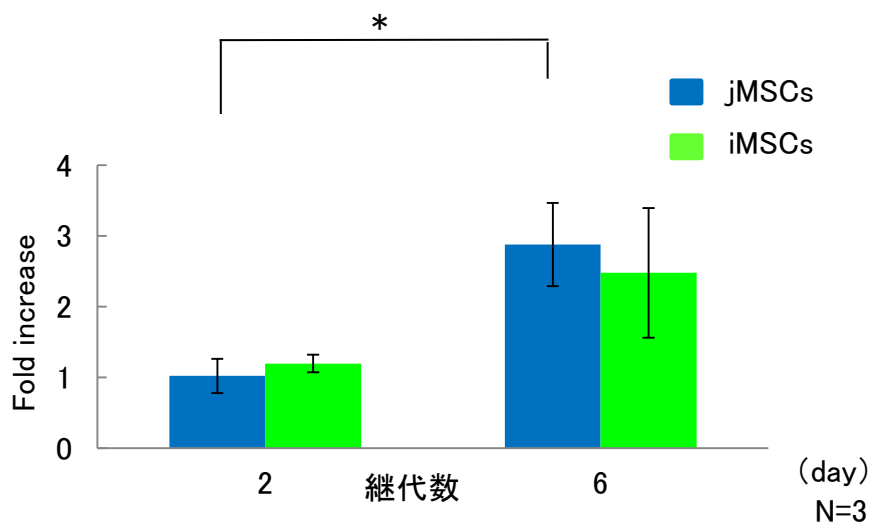


図 40 培養日数による VEGF-A 発現量の変化 \* $p < 0.05$

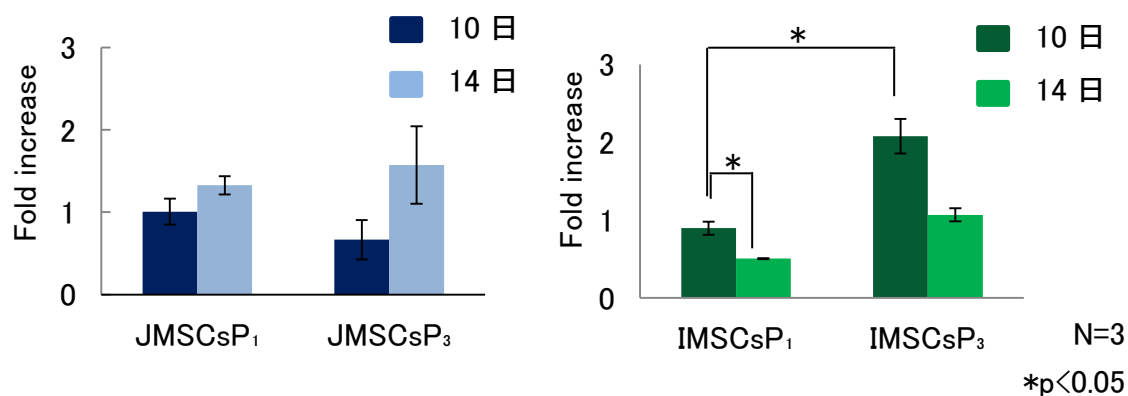


図 41 継代数の違いによる VEGF-A 遺伝子発現の変化 \* $p < 0.05$

## 5. jMSCs と iMSCs において骨分化誘導が VEGF-A 遺伝子発現とタンパク質

発現に及ぼす影響

jMSCs において、骨分化誘導によって VEGF-A 遺伝子発現は、有意に抑制された。一方、iMSCs においては、骨分化誘導によって VEGF-A 遺伝子発現に有意な変化は認められなかった（図 42）。

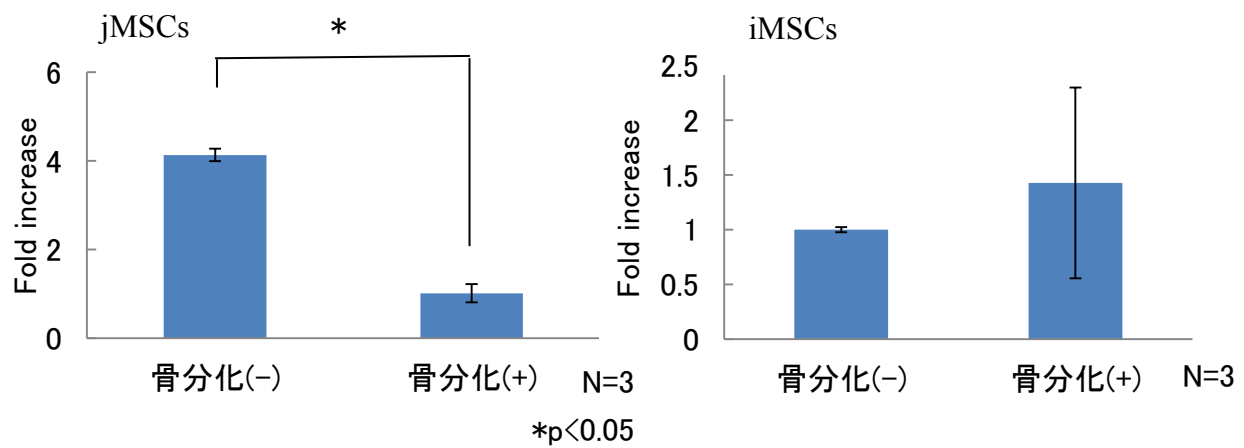


図 42 骨分化誘導前後の VEGF-A 発現量の変化

## 考察

MSCs は、骨髓から採取され、プラスチック容器に接着するものと定義されているが、その培養において細胞は不均質であり、様々な分化段階の前駆細胞も含まれることが示唆されている[41, 42]。 *In vitro* では、MSCs は軟骨・骨・脂肪・骨髓間質細胞への分化能を有している[43]が、線維芽細胞にも同様の性質を呈するものが存在するため、自己複製能と多分化能を持つ MSCs のみを単離できたことを確実に確認する手段が未だ存在しない。現在、広く行われているのは、細胞表面抗原を確認する方法である。MSCs に特異的ではないが、造血幹細胞の表面マーカーである CD 45、血管内皮細胞の表面マーカーである CD 34 は陰性、CD 90、CD 105、CD 73 、CD 63、STRO-1 は陽性とされる[44, 45]。今回、解析を行った 3 名の CLP 患者においても、これまで報告されている通り、CD 45 と CD 34 はともに陰性で、CD 73、CD 105 で陽性であった。他に今回陽性であった CD 29[46, 47]や、CD 44[48]に関しても MSCs のマーカーとして報告されている。以上のことより、本実験で採取した細胞は MSCs であると言える。また、CD 271 は、上皮系幹細胞のマーカーとして報告されており、MSCs においては第 4 継代まで発現が維持されるとの報告があり[49]、また STRO-1 は、MSCs を骨髓から採取した場合は 65 % が陽性、臍帯血より採取した場合は 25 % が陽性との報告[48] があるが、今回解析した 3 名の MSCs いずれにお

いても、陰性であった。STRO-1 は赤血球前駆細胞においても発現が確認されており、*in vivo* 実験において STRO-1 陽性 MSCs を移植しても、生着の亢進は認められなかったとの報告がある[50]。このように表面抗原によりソーティングされた MSCs は、様々な特徴を有しており、さらに継代数や培養環境により表面抗原や性質が変化することが示唆されている[51]。将来的に血管新生に有利な MSCs、骨芽細胞分化に有利な MSCs など、より多くの表面抗原によるソーティングされることが出来れば、さらに骨再生に有利に機能する移植体を作製できる可能性があると考えられた。

近年、MSCs と HUVEC の共培養による報告は多い。Leszczynska[52] らは、HUVEC と MSCs を 4:1 の割合で培養すると、CD 31 陽性である HUVEC により管腔様構造を形成したと報告した。また Rouwkema ら[53]は、MSCs は、HUVEC の血管新生や新生した血管の安定化に優位に働いていると述べている。予備実験において、In Vitro Angiogenesis Assay Kit (Cayman) を用いて、Extracellular Matrix Gel 上で MSCs と HUVEC の共培養を行い、培養開始 1 日目に管腔構造が形成されたが、HUVEC のみ培養した場合は形成されなかった。しかし、期間を延長して本法で培養すると HUVEC がゲル上で小塊を形成してしまい、管腔様構造を確認することは困難であった。そこで、ゲルのコーティングを必要としない共培養に関する報告[52]を参考に実験

を行うこととした。通常、HUVEC はコラーゲンまたは fibrin clot でコートしたディッシュ上で成長因子を添加し培養することにより、数日後に管腔が形成される。本研究では、コーティングしていないディッシュ上で HUVEC 単独培養、MSCs と HUVEC の共培養、および 40 ng/ml VEGF 存在下で HUVEC 単独培養した場合の生細胞形態の観察を行った。VEGF の濃度は、Aguirre [54] らの実験を参考にした。本文献では、Matrigel (Sigma) を培地と 1 : 1 で混合したものをコーティング後、血管内皮細胞前駆細胞と (EPC) と MSCs にそれぞれ VEGF を 40 ng/ml 添加した群は共に管腔様構造を形成し、さらに共培養した群では、成長因子を添加することなく、40 ng/ml の VEGF を添加した群の 2 倍の管腔様構造を形成したと述べている。本実験では、蛍光標識された HUVEC のみ観察すると MSCs との direct coculture 群では、HUVEC の増加はほぼ認められず、3 日目より管腔様構造を形成し、その後も複数の管腔様構造が形成された。一方、HUVEC 単独培養における VEGF 添加/非添加群では、いずれも 9 日目においても管腔様構造は認められなかった。このことより、MSCs は細胞外マトリックスの存在しない状態で、早期の管腔様構造構築に何らかの影響を与えていることが示唆された。また、実験 II-2 の HUVEC insert with MSCs 群では、3 日目の管腔様構造は確認されなかった。生細胞数は、indirect coculture を行うことにより両細胞とも有意に増加したが、HUVEC の生細胞数はどの群におい

ても MSCs と比較して明らかに少なかった。その理由として、今回共培養を行うにあたり、HUVEC に対する MSCs の影響を検討する目的から、HUVEC の培養に通常用いられる成長因子を添加しなかったため、HUVEC の接着、増殖能が低下したためと考えられる。Bidarra ら[55] は共培養を行うにあたり、4 種類のメディウム（monoculture に用いるメディウム 2 種、それぞれを 1 : 1 で混合したもの、Iscove's Modified Dulbecco's Medium）を用いて、代謝活性とタンパク質産生量と細胞の動態についての比較検討を行い、それぞれの項目において最適な培地が異なっていたと述べており、培地に関しては今後、条件検討が必要である。また、これまでの共培養についての報告[55] では HUVEC と MSCs の indirect coculture と direct coculture いずれも MSCs のアポトーシスが有意に抑制されると述べている。また、Wang ら[56] は、MSCs 培地の上清が HUVEC の増殖を促進し、HUVEC 培地の上清が MSCs の増殖を促進すると述べている。本実験では、direct coculture 群では、indirect coculture 群ほど両細胞の増殖が亢進していないが、これは細胞同士が直接コンタクトすることにより、増殖よりも分化が活性化されたためと考えられる。実験 II-3 においては、monoculture 群と indirect coculture 群の遺伝子発現の比較を行った。MSCs において、monoculture 群と比較して、coculture 群で VEGF-A 遺伝子発現が有意に増加したことにより、coculture を行うことで HUVEC が産生する液性因子が MSCs の VEGF-A

遺伝子発現を亢進させる可能性が示唆された。HUVEC において、monoculture 群と比較して、coculture 群で MMP - 2、MMP - 9 遺伝子発現が有意に増加したことより、coculture を行うことで、MSCs が産生する液性因子が、HUVEC の MMP - 2、MMP - 9 遺伝子発現を亢進させる可能性が示唆された。また、MSCs において、monoculture 群と比較して、coculture 群の MMP - 2、MMP - 9 遺伝子発現が有意に減少したのは、HUVEC によるこれらの因子の産生が増加したことにより、MSCs による MMP - 2、MMP - 9 遺伝子発現に対して抑制的に働いたためと考えられる。HUVEC における PECAM-1 の遺伝子発現は、培養開始 3 日目で monoculture 群が coculture 群と比較して有意に亢進したものの、7 日目には有意に低下したのは、この接着タンパクが、サブコンフルエントの HUVEC 表面に分散して発現するが、細胞同士が接触するようになると非接触部分には発現されず、接触面に強く発現するという性質がある[57] ためと考える。これまでに、EPC と MSCs との direct coculture により、monoculture と比較して、PECAM - 1、MMP - 9 が有意に増加したとの報告[54]があるが、いずれの monoculture 群と比較したのか記載はされていない。また、この実験においては VEGF-A の遺伝子発現には有意差が認められなかったと述べられている。

本実験ではこれに加え、MMP - 9 同様に、血管新生において既存血管を裏打ちしている基底膜を構成する IV 型コラーゲンを分解するゼラチナーゼ群である



MMP-2 についても検討を行った。本実験結果より、coculture を行うことにより、VEGF-A などの血管新生促進因子が増加する一方、HUVEC が何らかの液性因子の誘導を介して MMP-2、MMP-9 を多く産生し、基底膜の分解を促進する可能性が示唆された。生体内で移植された MSCs の多くは CAP と混在されており、レシピエント側の HUVEC と direct または indirect な関係で存在していると考えられる。今後は、direct coculture による培養後、フローサイトメーターによりセルソートを行い、さらに他の血管新生因子についても網羅的検討する必要がある。近年、direct coculture を行い、フローサイトメーターを用いて、CD31 陽性細胞を HUVEC としてセルソートした報告[52]もなされている。実験 II - 4 において、骨分化誘導により、VEGF-A 遺伝子発現とタンパク質発現の減少が認められたことにより、未分化な MSCs の方が血管新生に関して、優位に働く可能性が示唆された。Agata ら[58]は、MSCs を骨分化誘導して移植する方が、非誘導の MSCs を移植するよりも *in vivo* での骨形成能が高いことを報告する一方、Ikeda ら[59]は、骨分化誘導を行った細胞の移植は *in vivo* での異所性骨化を認め、未分化状態の細胞を移植しても異所化は認めなかったと述べている。また、成長の旺盛な時期に未分化 MSCs の移植を行うと、骨分化誘導した MSCs を移植するよりも骨再生量が多いとの報告もある[60]。このことから、骨形成が起こるだけではなく、既存骨と同様な骨代謝を有する骨の再生が重要である

と考えられる。そのためには、骨形成に先立つ血管網の再構築が必要となるため、血管新生に関与する VEGF - A を多く産生する未分化な MSCs を利用することは意義があると考えられる。

一般的な骨再生過程では、結合組織が形成された部分に血管が侵入し、栄養と酸素の供給が整った時点で、宿主由来の MSCs から骨芽細胞への分化、増殖、ならびに類骨の形成と石灰化の誘導が行われる[61]。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[38]。MSCs の移植後の局在を検討した報告によると、MSCs は移植後経時的に減少することは明らかである[62-64]。Oshima ら[62]はラット骨軟骨性の欠損に移植した MSCs のおよそ 40 %が 4 週間まで残存したと述べ、Leiker ら[63]はブタ心臓に移植した MSCs のおよそ 1.7%が 2 週間まで残存したと報告している。以上のことを踏まえると、移植した多くの MSCs が早期の段階で組織形成に何らかの影響を与えていると考えられる。本実験では、作製したガイドとレーザードップラー血流計を使用することにより、ガイドの固定が困難な口腔内において、毎回同じ部位を安定して測定することが可能であった。使用した血流計は、ALF21(アドバンス)であり、原理としては、半導体レーザー波長 780nm のレーザー光が移動する赤血球に当たると、ドップラー偏位を呈する。その偏位したレーザー光を

感受し、電圧として換算することにより測定値を算出し、生体組織の血流情報を得ることができるものである。算出の式を以下に示す。

血流速度成分 (Velocity) : 照射した光の周波数変調

組織血流量 (Flow) に相当する赤血球量成分 (Mass) : 変調成分の光量 (パワー  
スペクトルの積分値)

組織血流量 (Flow) = 赤血球量成分 (Mass) × 血流速度成分 (Velocity)

これまで、レーザードップラー血流計を用いた骨の血流計測に関する報告は少なく、その多くが骨折の治癒過程における血流変化の観察である[65-67]。口腔内では歯髓の血流を測定した報告が多く、青木[68]は、ビーグル犬顎裂モデルを用い、上顎歯槽骨延長術が移植骨片内の歯髓血流量に及ぼす影響をレーザードップラー血流計により測定し、上顎歯における歯髓の血流は、上歯槽動脈により周辺部歯槽骨を経由して供給されていることから、歯髓の血流量回復は周辺骨組織の回復を評価するパラメーターになると考察を加えている。

一般的に、血流量とは1つの血管のある断面を単位時間に通過する血液の容積のことであり、断面積を  $S$  とすると血流量  $Q$  は血流速度  $V$  と、断面積  $S$  の積である  $V \cdot S$  となる。 $Q$  の値は、太い血管では  $V$  が小さくなり、細い血管では大

きくなるため一定となると言われており、組織の血流量は血管数に依存すると考えられることから、本実験での移植部における血流量が、新生血管の評価として用いることが出来ると考える。

再生骨血管新生に関する Lexer[69] による報告では、骨の再生には必ず局所充血の存在が必要であり、これによって移植骨への新生血管の侵入と早期の栄養供給が行われ、骨修復機転完了後には、移植骨内の血管はその数および大きさともに減少するとされる。また、Kiehn ら[70] は、マウス背部皮下に煮沸自家腸骨骨片移植を行うと、血管は骨に集中するが、骨内には侵入せず、15 日後には充血は著明となって、骨周辺部より新生血管に包囲されると述べている。さらに、道岡[71] は、犬の下肢に自家海綿骨移植を行ったところ、X 線所見にて、移植 7 日目で移植骨と移植床間の肉芽組織形成により明瞭な空隙ができ、微細血管の発生が認められ、移植後 25 日には、空隙が不鮮明となり、肉芽組織の骨化が認められたことを明らかにしている。そして、南部[72] は、ウサギに下顎骨下縁に骨欠損を作製し、人工材料であるハイドロキシアパタイトを移植したところ、7 日目に旺盛な新生血管が認められたと報告している。本実験では、移植 3 日目より血流の測定を開始したが、3 日目および 5 日目において血流はほぼ計測されず、実験側と対照側において南部の報告と同様に、7 日目において血流の回復が認められた。また、道岡の報告と同様に、移植 7 日目において、

X 線写真上で移植骨と移植床間に明瞭な空隙が形成された。その後も実験側では、透過像が増加し、不透過性の CAP が徐々に吸収されている様子が見えてきた。歯冠側にも透過性の像が拡大し始める移植 7 週間後には、再び血流が増加した。一方、対照側は、移植 3 週間後より徐々に透過像は増すものの、CAP は吸収されず残存しているものと思われた。また、移植 5 週間後から 7 週間後において、血流の変化は認められなかった。以上のことから、実験側では、対照側と比較して、速やかな CAP の吸収とそれにかわる骨組織の再生が確認され、再生骨の成熟度に明らかな差が認められた。このことから、実験側においては、通常の骨再生に加え、破骨細胞による移植体の吸収とそれに続く骨形成が生じていることが推察される。すなわち、通常では線維性骨形成後に起こるはずの骨吸収が、実験側では CAP の吸収とともに早期に生じ、これに伴い成熟骨が迅速に形成されたものと考えられる。本実験は、最初、ビーグル犬の顎裂部に位置する第 3 側切歯を再植歯し、ガイドして用いていたが、この場合、ガイドが動きやすく固定用のワイヤー自体が外れることも多く、特に、一度脱離した実験側において、血流は大きな値を示し、プラトーに達することはなかった。この場合、再生した組織は、ほぼ肉芽組織であった。一方、脱離せずに測定できた対照側において血流は、一度プラトーに達し、測定 3 ヶ月の時点では、増加は認めなかったものの、顎裂部底部に骨再生が生じていた。以上のことから、再生骨が

出来る前の肉芽組織で血管新生が旺盛になり血流が増加し、骨再生が進行するのに伴い、新生された血管が減少すると考えられる。本実験において、実験側で移植 7 週後に再び血流が増加するのは、再生部にハーバース管のような太い血管が伸びてきた可能性が考えられる。今後は、血流の変化が実際の組織変化とリンクしていることを確認するために、組織学的観察を行う必要がある。

顎骨 MSCs は、腸骨 MSCs 同様に多分化能を有し、VEGF-A 産生能を有していた。我々の実験では、顎骨 MSCs は、採取・培養において、腸骨 MSCs と比較し、成功率が低く、ビーグル犬の顎裂移植実験に必要な細胞数まで増殖できたのは、十数回採取したうちの 2 回だけであった。採取・培養方法が確立されれば、腸骨に代わる移植材料となり得ると考える。採取部位も口腔内であるのため、我々歯科医師による局所麻酔下での施術が可能であり、腸骨骨髓穿刺と比較して、より簡便であると思われる。現在、再生医学の進歩は目覚ましく、歯槽骨と軟組織に対してコラーゲンや PLGA、VEGF や FGF などを用いた組織再生を用いた取り組みが多くなされ[73]、少数ではあるが MSCs を担体とともに顎裂部に移植した報告[74, 75]もなされている。

今後はさらなる研究を進め、骨再生治療の臨床応用を成し遂げることで、CLP 患者の治療の負担を軽減できることはきわめて大きな意義を持つと考えられる。

## 総括

我々は、CLP 患者への腸骨移植に伴う外科的侵襲の低減を目的として、CAP と MSCs を用いた骨再生治療について検討を行った。本研究では特に骨再生に必須である血管新生に着目し、*in vitro* では 3 名の CLP 患者より採取した MSCs を用いて、*in vivo* ではビーグル犬顎裂モデルを用いて、MSCs の血管新生における影響について一連の検討を行い、以下の結果を得た。

1. 3 名 CLP 患者より採取した 細胞は、CD 29、CD 44、CD 73、CD 105 陽性であり、CD 34、CD 45、CD 271、STRO - 1 陰性であった。また、それらの細胞は、骨分化能、脂肪分化能、軟骨分化能を有した。以上のことから、本実験で採取した細胞は MSCs である。
2. MSCs と HUVEC を共培養した群は、HUVEC 単独培養群と比較して、早期に管腔構造を呈し、その後も複数の管腔の連なりが確認された。また、MSCs と HUVEC を共培養した群は、MSCs 単独培養群における VEGF - A、HUVEC 単独培養群における MMP - 2、MMP - 9、PECAM - 1 の遺伝子発現と比較して、有意に亢進した。そして、MSCs において、骨分化誘導により、VEGF - A の遺伝子発現は、有意に抑制され、VEGF - A のタンパク質発現は減少した。以上のことから、MSCs は血管新生において有意に働いていることが示唆された。

3. ビーグル犬顎裂モデルにおける骨再生部の血流量について、実験群 (MSCs +CAP)は、対照群 (CAP のみ)と比較して、初期血流の回復・減少、それに続く血流量の増加が早期に見られた。

以上の結果より、MSCs は、直接的に HUVEC による血管新生に影響を及ぼすとともに HUVEC にパラクライン的に作用して血管新生因子の産生を亢進させる可能性が示唆された。また、移植部において、血管新生を亢進し、初期血流量が増加し、それに伴い運ばれた破骨細胞により、CAP が吸収され、早期に骨形成がおこると考えられた。

これらのことより、本術式が CLP 患者の顎裂部の骨再生に有用であることが明確に示され、臨床応用の可能性が強く示唆された。



## 参考文献

1. 佐藤和則, 口唇裂および口蓋裂の遺伝学的研究, とくに多因子遺伝を中心として. Journal of Japanese Cleft Palate Association, 1988. **13**(2): p. 157-181.
2. 宮崎正, et al., 我が国における口唇裂口蓋裂の発生率について. Journal of Japanese Cleft Palate Association, 1985. **10**(2): p. 191-195.
3. 村松裕之, 赤松正, and 清水典佳, 顎裂部骨移植. 小児口腔外科, 2011. **21**(1): p. 1-24.
4. Bergland, O., G. Semb, and F.E. Abyholm, *Elimination of the residual alveolar cleft by secondary bone grafting and subsequent orthodontic treatment*. The Cleft palate journal, 1986. **23**(3): p. 175-205.
5. Drachter, R., *Die Gaumenspalte und deren operative Behandlung*. Langenbeck's Archives of Surgery, 1914. **131**(1): p. 1-89.
6. Veau, V. and S. Borel, *Division palatine: anatomie, chirurgie, phonetique; avec la collaboration de S. Borel*. 1931: Masson.
7. Axhausen, G., *Technik und Ergebnisse der Spaltplastiken*. 1952: C. Hanser.
8. Boyne, P.J. and N.R. Sands, *Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts*. Journal of oral surgery (American Dental Association: 1965), 1972. **30**(2): p. 87.
9. WOLFGANG, D., *The osteogenetic phases of regeneration of bone*. 1956.
10. Burwell, R.G., *STUDIES IN THE TRANSPLANTATION OF BONE VII. The Fresh Composite Homograft-Autograft of Cancellous Bone*. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume, 1964. **46**(1): p. 110-140.
11. 飯野光喜, 森良之, and 近津大地, *In Vivo tissue engineering* による顎骨再建の実際. Clinical Calcium, 2008. **18**: p. 1757-1766.
12. 飯野光喜, 森良之, and 近津大地, 再生医学のいま--基礎研究から臨床への展開に向けて (29) *In vivo tissue engineering* による下顎骨再建. 治療, 2009. **91**(9): p. 2311-2315.
13. Theise, N.D., et al., *Liver from bone marrow in humans*. Hepatology, 2000. **32**(1): p. 11-16.
14. Dezawa, M., et al., *Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation*. The Journal of clinical investigation, 2004. **113**(12): p. 1701-1710.
15. Ikeda, E., et al., *Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell - based therapy for liver disease*. Differentiation, 2008. **76**(5): p. 495-505.

16. Silva, G.V., et al., *Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model*. Circulation, 2005. **111**(2): p. 150-156.
17. Ranganath, S.H., et al., *Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease*. Cell stem cell, 2012. **10**(3): p. 244-258.
18. Williams, A.R. and J.M. Hare, *Mesenchymal stem cells biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease*. Circulation research, 2011. **109**(8): p. 923-940.
19. Lu, D., et al., *Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial*. Diabetes research and clinical practice, 2011. **92**(1): p. 26-36.
20. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
21. Zeller, S.D., et al., *Use of preformed hydroxylapatite blocks for grafting in genioplasty procedures*. International journal of oral and maxillofacial surgery, 1986. **15**(6): p. 665-668.
22. 大西正俊, アパタイトセラミックスの外科的応用に関する問題点. 日歯医師会誌, 1983. **36**: p. 803-810.
23. 若月達也, 多孔性 Hydroxyapatite 顆粒の臨床応用. 口科誌, 1987. **36**: p. 82-95.
24. 大西正俊, 人工骨としての多孔質アパタイト-臨床応用例を中心として. 歯科ジャーナル, 1983. **17**: p. 623-633.
25. Zaman, C.T., et al., *Fabrication of B-type carbonate apatite blocks by the phosphorization of free-molding gypsum-calcite composite*. Dental materials journal, 2008. **27**(5): p. 710-715.
26. Ko, H., C. Mcfarland, and B. Milthorpe, *Engineering thick tissues-the vascularisation problem*. 2007.
27. Maes, C., et al., *Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels*. Developmental cell, 2010. **19**(2): p. 329-344.
28. Enemark, H., S. Sindet-Pedersen, and M. Bundgaard, *Long-term results after secondary bone grafting of alveolar clefts*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1987. **45**(11): p. 913-918.
29. Helms, J.A., T. Michael Speidel, and K.L. Denis, *Effect of timing on long-term clinical success of alveolar cleft bone grafts*. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 1987. **92**(3): p. 232-240.
30. Kindelan, J.D., R.R. Nashed, and M.R. Bromige, *Radiographic assessment of*

- secondary autogenous alveolar bone grafting in cleft lip and palate patients*. The Cleft palate-craniofacial journal, 1997. **34**(3): p. 195-198.
31. Lilja, J., et al., *Bone grafting at the stage of mixed dentition in cleft lip and palate patients*. Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery, 1987. **21**(1): p. 73-79.
  32. Long Jr, R.E., B.E. Spangler, and M. Yow, *Cleft width and secondary alveolar bone graft success*. The Cleft palate-craniofacial journal, 1995. **32**(5): p. 420-427.
  33. 幸地省子, et al., 顎裂部に対する自家腸骨海綿骨細片移植 第 2 報 骨架橋形成について. 日本口腔外科学会雑誌, 1987. **33**(11): p. 2152-2158.
  34. 大河内孝子, 唇顎口蓋裂患者に対する顎裂部自家腸骨海綿骨移植の術後成績評価. Journal of Japanese Cleft Palate Association, 2001. **26**(1): p. 55-67.
  35. Åbyholm, F.E., O. Bergland, and G. Semb, *Secondary bone grafting of alveolar clefts: a surgical/orthodontic treatment enabling a non-prosthetic rehabilitation in cleft lip and palate patients*. Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery, 1981. **15**(2): p. 127-140.
  36. Witherow, H., et al., *A new scale to assess radiographic success of secondary alveolar bone grafts*. The Cleft palate-craniofacial journal, 2002. **39**(3): p. 255-260.
  37. 飯野光喜, et al., 顎裂部に対する自家腸骨海綿骨細片移植術. Journal of Japanese Cleft Palate Association, 1994. **19**(1): p. 22-31.
  38. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. science, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
  39. Egusa, H., et al., *Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications*. J Prosthodont Res, 2012. **56**(4): p. 229-48.
  40. Yoshioka, M., et al., *Bone regeneration in artificial jaw cleft by use of carbonated hydroxyapatite particles and mesenchymal stem cells derived from iliac bone*. International journal of dentistry, 2012. **2012**.
  41. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-74.
  42. Post, S., et al., *Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Bone, 2008. **43**(1): p. 32-39.
  43. Owen, M., *Marrow stromal stem cells*. Journal of Cell Science, 1988. **1988**(Supplement 10): p. 63-76.
  44. Haynesworth, S., M. Barer, and A. Caplan, *Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies*. Bone, 1992. **13**(1): p. 69-80.

45. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*. Blood, 1991. **78**(1): p. 55-62.
46. Nasef, A., et al., *Identification of IL-10 and TGF- $\beta$  Transcripts Involved in the Inhibition of T-Lymphocyte Proliferation During Cell Contact With Human Mesenchymal Stem Cells*. Gene expression, 2006. **13**(4-5): p. 217-226.
47. De Schauwer, C., et al., *Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity*. Theriogenology, 2011. **75**(8): p. 1431-1443.
48. Musina, R., E. Bekchanova, and G. Sukhikh, *Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues*. Bulletin of experimental biology and medicine, 2005. **139**(4): p. 504-509.
49. 石村, 大., et al., マウス脂肪由来培養細胞から軟骨細胞への分化誘導. 組織培養研究 (0912-3636), 2007. **26**(4): p. 185-192.
50. Chapel, A., et al., *Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co - infused with hematopoietic cells to treat a radiation - induced multi - organ failure syndrome*. The journal of gene medicine, 2003. **5**(12): p. 1028-1038.
51. Bellantuono, I., A. Aldahmash, and M. Kassem, *Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2009. **1792**(4): p. 364-370.
52. Leszczynska, J., et al., *Contribution of endothelial cells to human bone-derived cells expansion in coculture*. Tissue Engineering Part A, 2012. **19**(3-4): p. 393-402.
53. Rouwkema, J., J.D. Boer, and C.A.V. Blitterswijk, *Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct*. Tissue engineering, 2006. **12**(9): p. 2685-2693.
54. Aguirre, A., J. Planell, and E. Engel, *Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis*. Biochemical and biophysical research communications, 2010. **400**(2): p. 284-291.
55. Bidarra, S.J., et al., *Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells*. Stem Cell Res, 2011. **7**(3): p. 186-97.
56. Wang, D.S., et al., *Anabolic Effects of 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on Osteoblasts Are Enhanced by Vascular Endothelial Growth Factor Produced by Osteoblasts and by Growth Factors Produced by Endothelial Cells 1*. Endocrinology, 1997. **138**(7): p. 2953-2962.
57. Baldwin, H.S., et al., *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

- (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development*, 1994. **120**(9): p. 2539-2553.
58. Agata, H., et al., *Effective bone engineering with periosteum-derived cells*. *Journal of dental research*, 2007. **86**(1): p. 79-83.
  59. Ikeda, H., et al., *Engineering bone formation from human dental pulp-and periodontal ligament-derived cells*. *Annals of biomedical engineering*, 2011. **39**(1): p. 26-34.
  60. Kaku, M., et al., *Mesenchymal stem cell-induced cranial suture-like gap in rats*. *Plastic and reconstructive surgery*, 2011. **127**(1): p. 69-77.
  61. Aukhil, I., *Biology of wound healing*. *Periodontology 2000*, 2000. **22**(1): p. 44-50.
  62. Oshima, Y., et al., *Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2005. **53**(2): p. 207-216.
  63. Leiker, M., et al., *Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells*. *Cell transplantation*, 2008. **17**(8): p. 911.
  64. Hasegawa, N., et al., *Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects*. *Journal of periodontology*, 2006. **77**(6): p. 1003-1007.
  65. 菅本一臣, et al., レーザードップラー装置による大腿骨頸部骨折に対する大腿骨頭内血行動態測定. 日本整形外科学会雑誌= The Journal of the Japanese Orthopaedic Association, 1998. **72**(3): p. S809.
  66. 松岡孝志, et al., レーザードップラー血流計を用いた骨内血流測定: 骨折治療への応用. 骨折, 1999. **21**(2): p. 646-650.
  67. Schemitsch, E., et al., *Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep*. *Journal of orthopaedic trauma*, 1994. **8**(5): p. 373-382.
  68. 青木朝里, イヌ顎裂モデルを用いた上顎歯槽骨延長術後の歯髓血流量および硬組織変化の観察. 口腔病学会雑誌, 2009. **76**(1): p. 37-44.
  69. Lexer, E., *Die freie Transplantationen*, in von Bruns. P.: *Neue deutsche Chirurgie*, Stuttgart, Ferdinand Enke, 1924. **2**: p. 286-369.
  70. Kiehn, C.L., et al., *A study of the vascularization of experimental bone grafts by means of radioactive phosphorus and the transparent chamber*. *Annals of surgery*, 1952. **136**(3): p. 404.
  71. 道岡博, 骨移植の血管新生に関する実験的研究. 岡山医学会雑誌, 1953. **65**(8): p.

1293-1310.

72. 南部淑文, ヒドロキシアパタイトの顎骨欠損部への応用に関する実験的研究-特にアパタイト界面部の血管像と骨形成について. 日本口腔外科学会雑誌, 1990. **36**(11): p. 2437-2446.
73. Moreau, J.L., et al., *Tissue engineering solutions for cleft palates*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2007. **65**(12): p. 2503-2511.
74. Behnia, H., et al., *Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2009. **108**(2): p. e1-e6.
75. Paganelli, C., et al., *Indications on suitable scaffold as carrier of stem cells in the alveoloplasty of cleft palate*. Journal of oral rehabilitation, 2006. **33**(8): p. 625-629.

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻ならびに御支援を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門（歯科矯正学）谷本幸太郎教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文作成にあたり、御助言、御校閲を賜りまし同研究院統合健康科学部門（公衆口腔保健学）杉山勝教授、ならびに同研究院基礎生命科学部門（生体材料学）加藤 功一教授、同研究院応用生命科学部門（先端歯科補綴学）津賀一弘教授に深謝申し上げます。

本研究の計画、遂行において貴重な御助言を頂くとともに、直接御指導を賜りました医歯薬保健学研究院応用生命科学部門（歯科矯正学）丹根一夫名誉教授、鷺見圭輔助教、國松亮助教、松田弥生博士、同研究院先端医療開発科学部門（歯周病態学）上田武博士ならびに本研究に御理解、御協力を頂いた応用生命科学部門（歯科矯正学）の皆様ならびに関係各位に厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えるとともに、常に私を支えてくれた家族や友人に心から感謝します。