

論文要旨等報告書

氏	Rodriguez Andrea Paola
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与の番号	博 甲 第 3 3 4 3 号
学位授与の日付	平成 1 9 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Biological Analysis of a Candidate Stem Cell -KUSA/A1 cell- for Bone Tissue Engineering (骨再生研究に利用する幹細胞候補-KUSA/A1細胞-の生物学的検討)

論文審査委員 教授 永井 教之 教授 山本 敏男 教授 山城 隆

学位論文内容の要旨

BACKGROUND: Bone regeneration is renewal of lost bone tissue. When the bony defect is small, it will usually heal without evidence of previous injury. However, if the bony defect is large, incomplete bone occurs even in the case where tissue grafting is used. Recent progress in tissue engineering has a promising possibility to solve such problem. The basic principle of bone induction for tissue engineering is to use stem cell, growth factor and organic matrix. KUSA/A1 cell is a bone marrow cell, capable of differentiating into osteoblast, chondrocytes and myotubes under inducing condition. It has been reported that mature KUSA/A1 osteoblasts cultured in osteogenic condition, were able to induce bone formation in collagen hybridized PLGP sponge in vivo. This may be due to their low proliferation potential thereby not being able to obtain sufficient number of cells to promote large tissue repair.

OBJECTIVES: In order to use KUSA/A1 cells with high cell proliferation activity to induce large amount of new bone, we evaluated whether KUSA/A1 cells in non-induction condition will maintain their immature stage. We further examined the osteoblastic differentiation under the influence of the host microenvironment in intraperitoneal diffusion chamber. Finally, we evaluated the effect of honeycomb scaffold to induce abundant bone formation using KUSA/A1 cells implanted in subcutaneous tissues of SCID mice.

MATERIALS AND METHODS: KUSA/A1 cells were cultured in non-inducing condition (α -MEM) and in inducing condition (α -MEM+AA+ β -GB). The cells were analyzed at 1, 3, 7, 10 and 14 days by Von Kossa staining and also paraffin embedded cell pellets were also prepared for hematoxylin-eosin (H-E) staining and immunohistochemical studies. Then, the cells were seeded in intraperitoneal diffusion chamber after cultured in non-inducing condition. The chambers were removed at 1, 2, 4 and 6 weeks after implantation, and examined by routine H-E, Von Kossa staining, immunohistochemistry and transmission electron microscope. Finally, 1×10^6 KUSA/A1 cells with atelocollagen and 5×10^6 of KUSA/A1 cells alone cultured in non-inducing condition were implanted in the subcutaneous pockets of 4-week-old male SCID mice. The transplants were subjected to radiographical, histological and immunohistochemical examinations after 1, 2 and 4 weeks of implantation.

RESULTS: KUSA/A1 cells cultured in non-inducing condition maintained their immature stage in vitro. These cells demonstrated osteogenic differentiation under the influence of the host microenvironment seeded in intraperitoneal diffusion chamber and high cell proliferation activity in vivo previously cultured in non-inducing condition. In vivo study, KUSA/A1 cells combined with honeycomb scaffold showed abundant new bone formation as well as cell proliferation. On the other hand, KUSA/A1 cells alone showed few small islands of new bone formation. We also determined the immunolocalization of Collagen type I, CD34, Osteocalcin, Osteopontin and PCNA in this newly formed bone. Interestingly, the mechanism of bone induction by KUSA/A1 cells within honeycomb scaffold was similar to intramembranous ossification. This result indicated that only few KUSA/A1 cells cultured in non-inducing condition are capable to induced large amount of new bone in the whole scaffold within a host microenvironment.

CONCLUSION: This study support that KUSA/A1 cell is a good candidate as stem cell for basic research in bone tissue engineering.

論文審査の結果の要旨

骨の再生工学において、骨誘導能を有する骨髄由来の組織幹細胞が注目されている。組織幹細胞は各組織・臓器に存在し、2種類以上の細胞系統に分化可能であると同時に幹細胞自体にも分裂能を有する細胞である。骨髄由来の組織幹細胞の一つに KUSA/A1 細胞があり、この細胞は骨芽細胞や軟骨細胞への多能性分化能を有している。KUSA/A1 細胞を用いた移植実験において骨形成を認める報告があるものの、その生物学的性状の詳細は不明である。

また、骨再生工学では、細胞/制御因子/基質（支持体）の3つの因子の組み合わせにより骨を誘導するため、それぞれの組み合わせの条件を検討することが必要である。

本研究の目的は、骨髄由来幹細胞である KUSA/A1 細胞の生物学的性状、骨再生に利用する場合の諸条件を組織細胞化学的に検討したものである。

KUSA/A1 細胞を骨再生工学的に利用する場合、 β -glycerophosphate 添加培地を用いた成熟骨芽細胞（分化細胞）状態では骨形成量が少量であることから、KUSA/A1 細胞を未分化な細胞として利用することを検討した。

In vitro の実験から、 α -MEM のみを用いた培地では KUSA/A1 細胞は 10 日間分化を示さず未分化な状態に保たれることが示された。

マウス腹腔内への diffusion chamber を用いた実験において、未分化な KUSA/A1 細胞は経時的に骨芽細胞への分化を示し、骨形成に生体の液性因子が関与していることを示唆していた。骨形成の機序は基質小胞による核形成と細胞破片を核とする石灰化の2タイプの骨形成が観察された。

未分化な KUSA/A1 細胞と蜂巢状支持体（honeycomb scaffold）を組み合わせ用いたマウス背部皮下への移植実験では、少量の KUSA/A1 細胞でも支持体内全体に活発な細胞増殖と骨形成が生じ、形成された骨は支持体の形状に依存することが明らかにされた。また、経時的な観察から支持体の単一蜂巢内の KUSA/A1 細胞の骨形成メカニズムは、細胞破片を核として石灰化が生じ次第に拡大することが明らかとなった。

本研究は、KUSA/A1 細胞の生物学的性状、骨再生工学に用いる幹細胞としての有用性および骨形成メカニズムの詳細を明らかにしたものであり、組織幹細胞を用いた骨再生工学に重要な示唆を与える。本審査委員会は本論文に博士の学位論文としての価値を認める。