

論文要旨等報告書

氏名	大野 充昭
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3353 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	骨髄由来間質細胞の接着, 増殖, 遊走に対するCCN2/CTGFの効果 —新たな骨再生療法の確立に向けて—

論文審査委員 教授 菅原 利夫 教授 窪木 拓男 助教授 吉田 靖弘

学位論文内容の要旨

1. 緒言

近年, 骨再生療法は生物学的, 生体材料学的な研究の発展により飛躍的に進歩し, 様々な新療法が試みられてきた。しかし, まだまだ安定した臨床成果を獲得するに至っていない。その原因の一つとして複雑な再生の場の環境を十分模倣できていないことが考えられる。すなわち, これらの骨再生療法をさらに確実な治療法とするためには, 再生の場で機能している生物学的過程のメカニズムを, より詳細に検討する必要がある。

一方, 長管骨の骨折の治癒過程において, 血管新生を阻害すると骨折の治癒が抑制されること, 骨折や抜歯窩の治癒の現場に, 強い血管新生作用をもつ結合組織成長因子 CCN2/CTGF (CCN2) が多量に発現していることが報告されており, 骨の再生において CCN2 は重要な働きをしているものと推測される。

これまでも, CCN2 は *in vitro* において軟骨細胞, 骨芽細胞, 血管内皮細胞の増殖, 分化を促進するだけでなく, *in vivo* において軟骨再生, 血管新生を促進するという報告がなされ, CCN2 は骨髄由来間葉系間質細胞 (hBMSC: human bone marrow stromal cell) による骨再生過程においても重要な役割を果たしていることが容易に推測される。にもかかわらず, CCN2 の hBMSC に与える細胞生物学的影響を詳細に明らかにした報告はない。

そこで本研究では, CCN2 が hBMSC に与える細胞生物学的影響を明らかにするとともに, それを応用し, 細胞, スキャフォード, 成長因子の三要素を駆使したティッシュエンジニアリング技術に基づく新たな骨再生療法を開発することを試みた。

2. 方法および結果

1) hBMSC の単離, 培養および多分化能の検討

ヒト腸骨骨髄より骨髄液を採取し, Mesenchymal Stem Cell Basal Medium にて骨髄液を 10 倍希釈し, 37°C, 5% CO₂ 気相下で培養した。24 時間後に培地を交換し, 接着細胞を培養し続けた結果, 7 日間でコンフルエントに達した。これらの細胞を培養, 継代し, 4-9 代目の細胞を本実験に使用した。

次に, 単離, 培養した細胞が間葉系幹細胞を含むか否かを確認するため, ヒト未分化間葉系幹細胞の細胞膜表面抗原の一つである STRO-1 の免疫蛍光染色を行った。その結果, STRO-1 陽性の細胞が多く含まれていることを確認した。また, 多分化能を検討したところ, 骨芽細胞, 脂肪細胞, 軟骨細胞に分化をすることをそれぞれアリザリンレッド染色, オイルレッド O 染色, アルシアンブルー染色法にて確認した。また RT-PCR, 定量的 RT-PCR 法でそれぞれの細胞に特異的な遺伝子であるオステオカルシン, *ppar* γ , タイプ II コラーゲンが発現していることを確認した。以上から, 我々が単離, 培養した細胞は間葉系幹細胞を含む細胞群であることが確認できた。

2) CCN2 の hBMSC に与える細胞生物学的影響の検討

CCN2 が hBMSC の細胞接着に与える影響を調べたため、培養プレートおよびハイドロキシアパタイト (HAp) プレート上に CCN2 を吸着させ MTS assay にて検討した。その結果、培養プレート上で 1.9 倍 (100 ng/ml: $p < 0.001$), HAp プレート上でも約 1.8 倍 (100 ng/ml: $p = 0.0017$) の促進がみられた。

さらに、細胞接着促進機構を詳細に検討するため、ウエスタンブロッティング法による MAPK のリン酸化シグナルの検出およびインテグリン-MAPK シグナル経路の阻害実験を行った。その結果、CCN2 を吸着させた場合 p38 MAPK のリン酸化が促進され、さらに抗インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 抗体または p38 MAPK 阻害剤で阻害実験を行ったところ、CCN2 によって促進された細胞接着は有意に抑制された。

細胞増殖は、培養液中に CCN2 を添加し、培養プレートあるいは HAp プレート上で細胞を培養し、MTS 法にて経時的に評価をした。その結果、CCN2 により細胞増殖は培養プレート上で約 1.3 倍、HAp プレート上では 1.2 倍に促進された。

さらに、細胞遊走に与える影響をケモタキセルを用いて検討した結果、24 時間後には対照と比べ約 9.6 倍 ($p < 0.001$) にまで促進された。

また、CCN2 のモジュールの一つである C-末 (CT)-モジュールでも同様の実験を行った結果、CCN2 全長と同等以上の効果があることが明らかとなった。

3) HAp/CCN2 複合体を用いた骨誘導の検討

ウサギ下顎骨に骨欠損を作製し、多孔質 HAp ブロックに CCN2 (25 μg) を含浸させ複合体を作製し、骨欠損部へ埋植した。そして、埋植 4 週後に組織を回収し、CCN2 による HAp ブロック細孔への骨誘導、再生能をマイクロ断層撮影装置 および塩基性フクシン・メチレンブルー染色にて評価した。その結果、CCN2 群においては対照群と比べ、多数の細孔に骨様の X 線不透過像を認め、塩基性フクシン・メチレンブルー染色像から、多孔質 HAp 細孔内部へ骨が誘導、再生している像が観察された。さらに、骨侵入率を算出した結果、対照群の 25 % と比べ、CCN2 群では 57% と有意 ($p = 0.0127$) に骨が再生、誘導されていた。

3. まとめ

本研究において、我々は hBMSC に対する CCN2 の効果、および骨再生への有用性を検討した。その結果、CCN2 および CT-モジュールは *in vitro* において hBMSC の細胞接着、増殖、遊走を促進した。このうち細胞接着促進効果はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ -p38 MAPK 細胞内シグナル経路の活性化によることが示唆された。また、HAp プレート上においても、CCN2 の hBMSC に対する細胞接着、増殖促進効果を認め、さらに多孔質 HAp ブロックを用いた *in vivo* 実験においても、CCN2 により多孔質 HAp ブロックの細孔内部への骨誘導、再生が促進され、CCN2 は多孔質 HAp を用いた骨再生に有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

骨の再生は、口腔インプラントの適応症の拡大や骨結合の促進に欠かせない。

これまでの研究から、CCN2は *in vitro*において軟骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞の増殖、分化を促進するだけでなく、*in vivo*において軟骨再生、血管新生を促進するという報告がなされている。また、抜歯窩の治癒過程においても強く発現していることが明らかになっており、CCN2は骨髄由来間葉系間質細胞 (hBMSC: human bone marrow stromal cell)による骨再生過程においても重要な役割を果たしていることが推測される。

そこで本研究では、CCN2がhBMSCに与える細胞生物学的影響を明らかにするとともに、それを応用し、細胞、スキャフォード、成長因子の三要素を駆使したティッシュエンジニアリング技術に基づく新たな骨再生療法を開発することを試み、以下の結論を得た。

1. ヒト腸骨骨髄から分離、培養した細胞群が、STRO-1陽性、多分化能を有する間葉系幹細胞を含む細胞群であることを確認した。
2. CCN2は骨髄由来間質細胞の細胞接着、増殖、遊走を促進する効果があり、CT-モジュール単独でも同等の効果があることが明らかとなった。
3. CCN2によるhBMSCの接着の亢進は、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を介したp38-MAPKシグナル経路の活性化によると示唆された。
4. CCN2を用いることで、HAp上においても細胞接着や増殖が促進した。
5. 歯槽骨の欠損部にCCN2を含浸させた多孔質HApブロックを埋入すると、CCN2を含浸しないものと比べ、多孔質HAp内部に、より多くの骨が再生された。

これらの知見はCCN2のhBMSCに対する細胞生物学的効果を明らかにし、さらにCCN2を用いた骨再生の有効性を明らかにしたものである。つまり、歯科、整形外科領域における骨再建、骨再生に重要な方向性を示すものとして価値のある研究業績である。したがって、本申請論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと判断した。