

ラット頭蓋骨骨膜挙上モデルにおける骨形成に関する研究

-ヒト歯嚢由来細胞および plasma rich in growth factors の移植について-

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

枝 卓志

(指導: 近藤 壽郎 教授)

**Study of bone formation using periosteal elevation model on rat calvaria
-transplantation of human dental follicle cells and plasma rich in growth factors-**

Takashi Eda

**Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo,
Department of Oral and Maxillofacial Surgery**

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficacy for bone formation in transplantation of graft materials. The osteogenic potential was evaluated by histological and immunohistochemical findings and micro-computed tomography (micro-CT) analysis.

The dental follicle is the fibrous tissue that surrounds the developing tooth germ, and it is believed to contain osteogenic precursor cells. Human dental follicle cells (hDFC) were obtained from wisdom teeth extracted from patients aged 14 years. hDFC from the 5th to 8th passage were grown in three-dimensional (3D) culture using gelatin sponges. Then, hDFC subjected to 3D culture osteogenic induced medium (OIM) without dexamethasone (DEX) or growth medium (GM) were transplanted onto the calvarias of F344/NJcl-rnu/rnu male rats (immunodeficient rats). Hematoxylin-eosin (H-E) staining showed newly formed bone. Result of immunohistochemistry showed BMP-2, Runx2 and Osterix positive cells in areas with newly formed bone. Furthermore, micro-CT showed that, in comparison to controls, transplanted hDFC promoted better bone quality and bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and bone volume (BV).

Next, Plasma rich in growth factors (PRGF), which is autologous constituents obtained from blood, has been known high concentrations of platelets containing various growth factors. PRGF was prepared by centrifugation of rat (male Sprague-Dawley rat) whole blood (WB), and then was activated using 10% calcium chloride solution. The activated PRGF transplanted onto the calvarias of rats. Histological observation demonstrated that PRGF group showed newly formed bone in a wide range. Result of immunohistochemistry showed Runx2 and Osterix expressed osteoblasts around newly formed bone in both groups at 2weeks. Osteoblasts positive for Bone Alkaline Phosphatase (BAP) and Osteocalcin were seen around newly formed bone in PRGF group at 2weeks. However, BAP and Osteocalcin staining was negative in the control group at 2 weeks. Micro-CT showed that PRGF group promoted an increase in BV which compared to control group. In addition, result of immunohistochemistry for Runx2, Osterix, BAP and osteocalcin was positive reaction in

both groups at 8 weeks.

These findings suggest that hDFC will be useful as a new cell source and the transplantation of PRGF is bioactive scaffold for bone formation. These transplantation may be useful in bone regeneration therapy.

緒言

口腔外科領域において、外傷や腫瘍により広範囲な顎骨欠損が生じた場合や、歯科インプラント埋入部の骨量不足を補う場合に、自家骨、他家骨または人工材料を用いた骨造成が行われている^{1, 2)}。自家骨は移植組織に対する拒絶反応がなく、最も治療効果が期待できるが³⁾、骨採取部位への手術侵襲は回避できず、採骨量にも制限がある⁴⁾。他家骨は凍結貯蔵した骨を用いるため、広範囲の欠損にも十分な量を確保でき、採骨を必要としないため健常部への侵襲を必要としないが、感染や宿主反応など合併症の懸念もある^{5, 6)}。人工材料は工業製品であるため、品質、量ともに安定的に供給することができる反面、組織親和性が低いなどの問題点が存在する^{5, 7)}。近年、現在の骨造成法が有するこれらの問題点を考慮し、患者自身から採取可能な細胞や血液を用いた再生治療が注目されるようになった^{8, 9)}。

組織再生には、細胞、足場および増殖因子の3要素が重要であると考えられている^{5, 6)}。未分化間葉系幹細胞は、脂肪細胞および骨芽細胞などの複数の細胞に分化可能であるため、組織再生に用いる細胞として注目され、既に臨床応用されている¹⁰⁾。また、未分化間葉系幹細胞は、様々な成体組織に存在することが明らかになったことから、侵襲が少なく、安全で、十分な細胞数を得られる細胞供給源の検索が行われている^{10, 11)}。歯嚢は歯科治療過程で破棄される神経堤由来の外胚葉性間葉からなる結合組織である。歯嚢には未分化間葉系幹細胞が存在し、歯嚢から分離したヒト歯嚢細胞 (human dental follicle cells; hDFC) は、骨芽細胞誘導培地 (osteogenic induced medium; OIM) で培養すると石灰化することが報告されている¹²⁾。従来、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導する際には、培地中に dexamethasone (DEX) の添加が必要とされるが¹³⁾、hDFCは *in vitro* にて DEX を含まない OIM [OIM (D-)] で培養しても骨芽細胞に分化すると報告されている¹⁴⁾。DEX は多様な副作用を有するステロイドであるため、再生医療用材料には用いないことが望ましい^{15, 16)}。

血漿は患者の血液から作製可能であり、種々の成長因子を含み、足場となるフィブリンを含むことから臨床応用されている⁹⁾。Marx らは、血液を遠心分離し血漿成分を濃縮して作

製した濃縮血小板血漿を Platelet-rich plasma (PRP) として、自家移植材料を併用した臨床研究を行い、レントゲン及び組織形態計測において骨密度の向上を認め、骨芽細胞の増殖に影響を与えると考察している⁹⁾。他にも PRP を用いた研究が散見されるが¹⁷⁻¹⁹⁾、PRP の作製方法は、プロトコールが均一化されていないため、過去の報告は画一的でないと言える。加えて、PRP には血漿成分、血小板成分とともに白血球が含まれているため、生体内で白血球から炎症生サイトカインが放出される可能性は否定できない²⁰⁾。濃縮血小板血漿の一つである Plasma rich in growth factors (PRGF) は血小板の濃縮を調製するための方法や遠心分離機が規格・統一化されており^{21,22)}、一回の遠心分離で血漿ならびに血小板成分のみを抽出することが可能で、白血球を含まない特徴を有する²³⁾。さらに、PRGF は、新生骨形成に関連する TGF- β 及び VEGF のような増殖因子を高濃度に含むため^{21, 24)}、骨再生および迅速な軟組織の治癒の促進が認められている²⁵⁾。PRGF を用いた軟組織の治癒促進や神経損傷に関する臨床的、基礎的研究はいくつか行われているが、骨形成効果についての基礎研究はほとんどない²¹⁾。

本研究では、生体への付加的侵襲の少ない移植材料である hDFC の骨形成効果、ならびに組織再生において必要不可欠な増殖因子および足場としての PRGF の骨形成能を検討することを目的とした。hDFC の骨形成効果については、ラット頭頂骨上に OIM (D-) で三次元培養した hDFC を移植した時の骨形成を組織学および免疫組織化学的に観察した。さらに、形成された新生骨の構造解析を Micro-CT を用いて三次元骨梁構造計測を行い検討した。PRGF の骨形成能については、PRGF をラット頭頂骨上に移植し、経時的な骨形成を組織学的所見、免疫組織化学的検索および Micro-CT 解析を用いて検討した。

材料および方法

1) 歯嚢細胞の分離および培養

十分なインフォームドコンセントの得られた 14 才の女性から下顎埋伏智歯を抜去し、その歯冠に付着した歯嚢を分離採取した。歯嚢を PBS で洗浄し血液成分を取り除いた後、メスを用いて細切し、0.1 U/ml collagenase type I と 1 U/ml dispase (Roche, Germany) を用いて 37°C、1 時間酵素処理し hDFC を分離した。分離した hDFC は GM (Mesenchymal stem cell growth medium; Lonza, USA) を用い、37°C、5% CO₂、95% air 条件下で初代および継代培養を行った。GM の組成は Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (Lonza) に MSCGM Single Quots® (L-glutamine, penicillin/streptomycin, FBS 10%; Lonza) を加えたものとした。培地は 3 日ごとに交換した。本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (認証番号: EC05-025, EC10-036) の指針に従って行った。

2) hDFC の三次元培養

β-TCP 強化型ゼラチンスポンジ (直径 3 mm×高さ 2 mm, pore size: 100-300 μm; MedGel Scaffold, MedGel, Japan) をスキャホールドとして用いた²⁶⁾。5.0×10⁵ cells/ml に調整した hDFC 懸濁液 25 μl を 96 well plate 内でスキャホールドに滴下し、CO₂ インキュベーター中で 1 時間静置し、スキャホールドに hDFC を定着させた。実験には継代数 5~8 の hDFC を使用した。その後、GM または OIM (D-) を 0.2 ml/well 加え、CO₂ インキュベーター中で 4 日間培養した。OIM (D-) は Osteogenic Basal Medium (Lonza) に DEX を除いた Osteogenic Single Quots® (FBS 10%, Ascorbate, β-glycerophosphate, L-glutamine, penicillin/streptomycin) (Lonza) を加えたものとした。

3) hDFC のラット頭頂骨上への移植

ラット頭頂骨上における hDFC の骨形成効果を検討するため、動物を用いた移植実験をお

こなつた。実験動物は生後 9 週齢 F344/NJcl- rnu/rnu 免疫不全雄性ラット (215 ± 15g, 日本クレア株式会社, Japan) 計 6 匹を用いた。GM 群 (GM に 3 次元培養した hDFC を移植した群) と OIM (D-) 群 [OIM (D-) に 3 次元培養した hDFC を移植した群] の 2 群 (各群 3 匹) に分けた。

全ての行程はペントバルビタールナトリウム (25 mg/kg) を腹腔内投与し、全身麻酔下で施行した。GM 群および OIM (D-) 群は頭頂部を剃毛し、頭蓋骨側縁に沿って皮膚切開を行い、皮下組織は解剖鋏により剥離・挙上した。上皮・皮下組織および骨膜を挙上し、頭頂骨と骨膜との間に、スキャホールドが内部に挿入された PTFE チューブを埋入設置し閉鎖した。チューブの内径は 3.0 mm, 外径 4.0 mm, 高さ 2.0 mm とし、埋入前に 121°C で 20 分間の高圧蒸気滅菌を行った²⁷⁾。埋入設置後、骨膜をナイロン糸により縫合し、つづいて創部皮膚を縫合閉鎖した。観察期間は、各群いずれも 4 週間とした。本実験は日本大学松戸歯学部動物倫理に関する指針に基づき、動物実験は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認 (承認番号: AP10-MD001) に従って行った。

4) PRGF 作製方法

実験動物は生後 16 週齢 Sprague- Dawley 系雄性ラット (435 ± 15g, 三協ラボサービス, Japan) 計 12 匹を用いた。抗凝固剤 3.8%クエン酸ナトリウム入りの真空採血管を用いてラット外頸静脈より血液を 5 ml 採取した。BTI システム III 遠心機[®] (BTI Biotechnology Institute, Spain) を用いて、室温下にて 8 分間、460×g で遠心分離を行い、PRGF を採取した^{21, 22, 28)}。白血球層より約 1.0 ml 上方の血漿成分を PRGF F2 とした。ラット移植用 PRGF は PRGF F2 に PRGF- Endoret[®] Activator (BTI Biotechnology Institute) である 10%塩化カルシウムを加え、37°C で 40 分間放置し、ゲル状のフィブリンクロット (以下クロット) とした (Fig. 1A)^{21, 28)}。

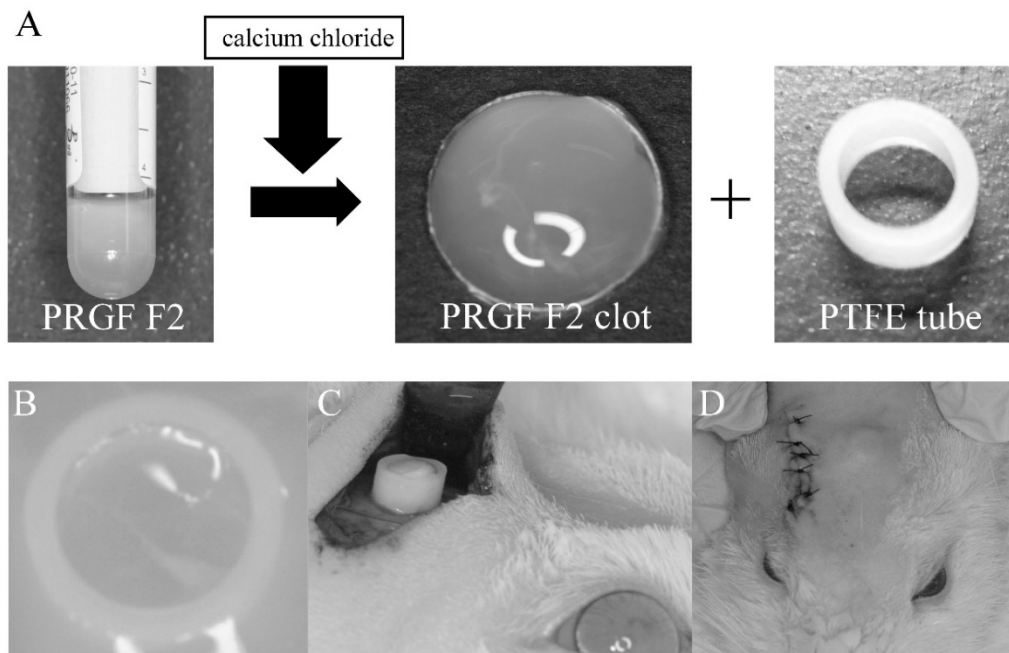


Figure 1. PRGF preparation for transplantation; Platelets in PRGF F2 were activated using 10% calcium chloride solution just prior to use (A). PRGF inserted into a PTFE tube (B). PRGF transplanted onto the calvarial bone (C). The periosteal flap was closed after placement of PRGF into the PTFE tube (D).

5) PRGF のラット頭頂骨上への移植

対照群 (PTFE チューブのみ移植した群) と PRGF 群 (PRGF F2 クロット挿入 PTFE チューブを移植した群) の 2 群 (各群 6 匹) に分けた。

全ての行程は吸入麻酔薬 2% セボフルランを用いて、全身麻酔下で施行した。対照群および PRGF 群は頭頂部を剃毛し、頭蓋骨側縁に沿って皮膚切開を行い、皮下組織は解剖鋏により剥離・挙上した。上皮・皮下組織および骨膜を挙上し、頭頂骨と骨膜との間に、対照群は PTFE チューブのみ、PRGF 群は PRGF が内部に挿入された PTFE チューブ (Fig. 1B) を埋入設置し、閉創した。埋入設置後 (Fig. 1C)、骨膜をナイロン糸により縫合し、つづいて創部皮膚を縫合閉鎖した (Fig. 1D)^{24, 26}。観察期間は、各群いずれも 2 週および 8 週間とした。本実験は日本大学松戸歯学部動物倫理に関する指針に基づき、動物実験は日本大学松戸歯学部

動物実験委員会の承認 (承認番号: AP12-018) に従って行った。

6) 組織学的観察

ラットの屠殺は、各群とも移植時と同様の手法で全身麻酔を行った後、心臓よりへパリン含有生理食塩水を灌流、脱血させた後 10%中性ホルマリン水溶液にて灌流固定を行い、PTFE チューブを含む頭蓋骨を一塊に摘出した。10%中性ホルマリン水溶液に 3 日間室温下で浸漬した後、10%EDTA で 2 週間脱灰、その後矢状断に切断しパラフィン包埋を行い、厚さ 4 μm で薄切した。切片は通法に従い hematoxylin-eosin (H-E) 染色を施し観察した。

7) 免疫組織化学的観察

全群の頭頂骨切片に対して免疫組織化学染色を行った。1 次抗体は、骨芽細胞分化について検索する目的で、hDFC 移植実験では、マウス monoclonal 抗 BMP-2 抗体 (65529. 111; 1:500; Abcam, Japan), ラビット polyclonal 抗 Runx2 抗体 (1:500; Abcam), ラビット polyclonal 抗 Osterix 抗体 (1:500; Abcam) およびラビット polyclonal 抗 VEGF-A20 (1:50; Santa Cruz, Japan) を用いた。PRGF 移植実験では、ラビット polyclonal 抗 Runx2 抗体 (1:500; Abcam), ラビット polyclonal 抗 Osterix 抗体 (1:500; Abcam), ラビット polyclonal 抗 Bone Alkaline Phosphatase (BAP) (1:100; Takara, Japan) およびラビット polyclonal 抗 Osteocalcin (1:100; Cosmo Bio, Japan) を用いた。各切片は脱パラフィン後、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を用い、温浴法で 95°C, 40 分間加熱処理により賦活化を行い、室温下で 12 時間反応させた。1 次抗体反応後、内因性ペルオキシダーゼ反応防止のため、3%過酸化水素エタノールに室温下 15 分間反応させた。さらに PBS で洗浄後、2 次抗体として ChemMate ENVISION kit/ HRP (DAB) (Dako, Gloustrup, Denmark) を使用しプロトコールに従って処理した。各切片は PBS で洗浄し、DAB (Merck, Germany) にて発色後、マイヤーヘマトキシリン水溶液で対比染色を行い観察した。各抗原に対する陽性対照として、正常な骨の組織切片を用いた。陰性対照

として1次抗体を用いずに2次抗体を作用させた²⁹⁾.

8) Micro-CTによる解析

ラット頭頂骨上にチューブを設置した各群における新生骨量をMicro-CTを用いて定量的に骨梁構造計測した。動物をペントバルビタールによる全身麻酔後、頭頂骨上のチューブ埋入部をMicro-CT (R-mCT[®], Rigaku Corporation, Japan) を用い撮影した。hDFC移植実験の撮影条件は、管電圧90 kv, 管電流88 μ A, 撮影倍率10倍, 撮影時間17秒で360度回転し撮影した。撮影は移植後4週目で行った。PRGF移植実験の撮影条件は、管電圧90 kv, 管電流150 μ A, 撮影倍率10倍, 撮影時間2分で360度回転し撮影した。撮影は移植後2週および8週間目で行った。それぞれ画像のボクセル解像度は $20 \times 20 \times 20 \mu$ mで、三次元骨梁構造計測ソフトTRI/3D-BON (Ratoc System engineering, Japan) を用いて、骨の微細構造を観察した。

形成された新生骨を定量的に評価するために、骨量 (BV, cm^3) および骨塩量 (BMC, mg) を計測した。骨梁体積率 (BV/TV, %), BMC/TV と骨密度 (BMD=BMC/BV, mg/cm^3) はBV, BMC およびチューブ内部の総体積 (TV, cm^3) から算出した。

9) 統計的解析

全ての解析結果は、平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm standard deviation) で表した。全結果の値の比較には、Welchのt-testを行った。危険率5% ($p < 0.05$) 未満を統計的に有意差ありと判定した。

結果

1. OIM (D-)で培養した hDFC 移植による骨形成効果の検討

1) 組織学的所見

スキャホールドを用いて三次元培養した hDFC を PTFE チューブに挿入し、骨膜と頭頂骨との間に移植した。移植後 4 週目に両群ともに新生骨が観察された (Fig. 2A-D)。OIM (D-) 群は GM 群と比較して、スキャホールド内に広範囲の新生骨が形成された。また両群ともに、新生骨周囲の結合組織には拡張した毛細血管が認められ、新生骨辺縁には骨芽細胞の配列が観察された (Fig. 2C, D)。

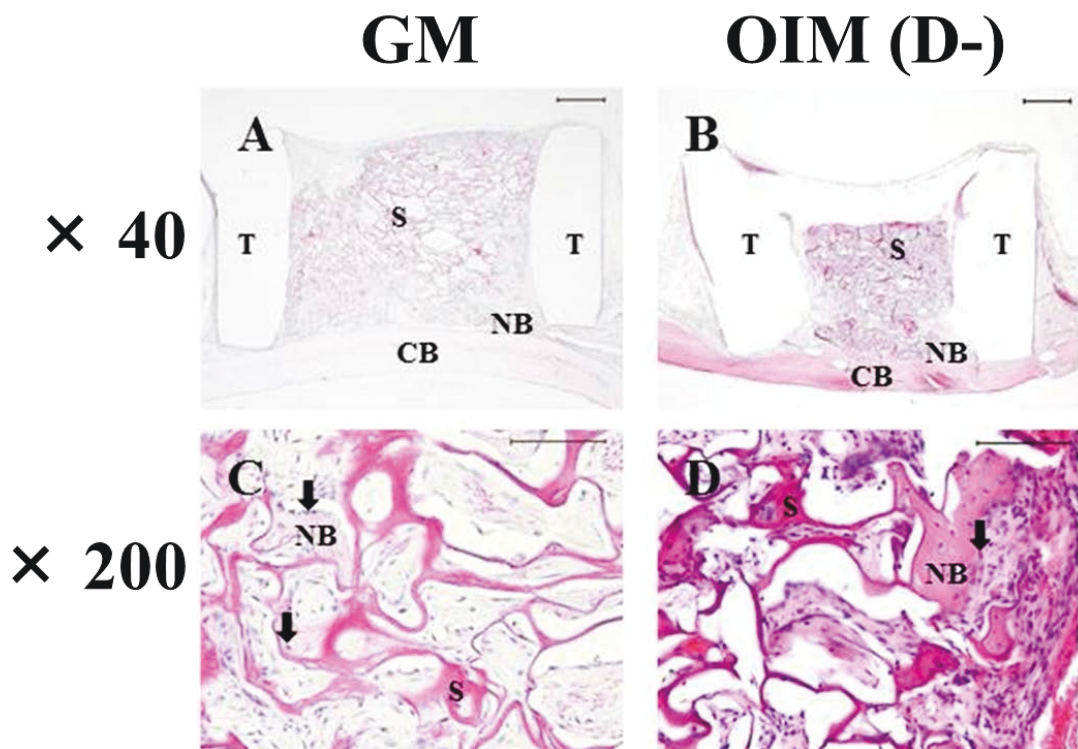


Figure2. Histological findings with H-E staining; New bone formation was observed at 4 weeks. Higher magnification images of A, B ($\times 40$) are shown in C, D ($\times 200$), respectively. (A, B): Bars = 500 μm , (C, D): Bars = 100 μm (NB: new bone; CB: calvarias bone; S: scaffold; T: tube; black arrows: osteoblast).

2) 免疫組織化学的所見

免疫組織化学的染色の結果は Fig. 3 に示した。BMP-2, Runx2 および Osterix は両群ともに、結合組織内の新生骨辺縁に配列した骨芽細胞で陽性反応が観察された。両群ともに VEGF は、血管内皮細胞および新生骨の辺縁に配列した骨芽細胞において陽性所見を認めた。

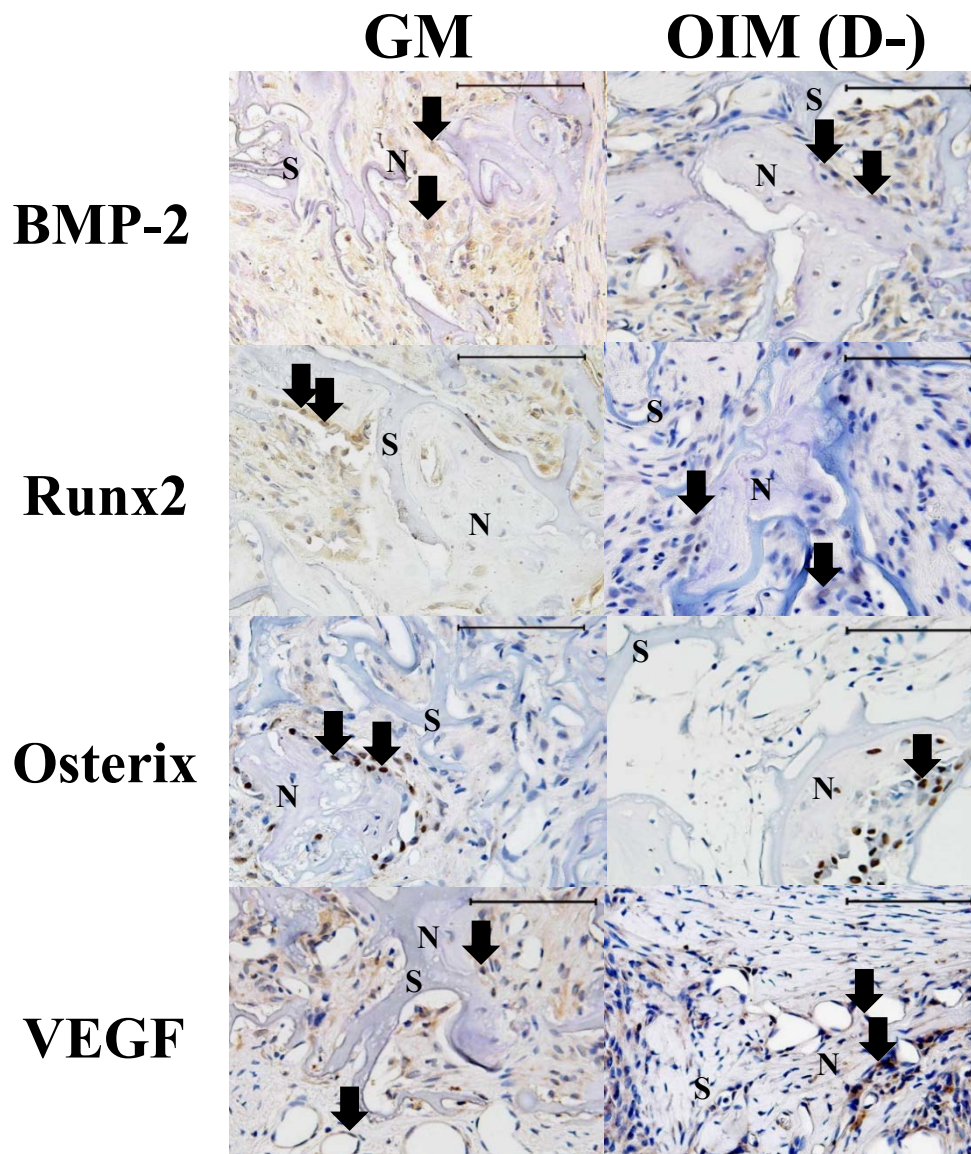


Figure 3. Immunohistochemical staining; BMP-2, Runx2, Osterix and VEGF at 4 weeks ($\times 400$). Bars= 100 μ m, (NB: new bone; S: scaffold). Arrows indicate to positive reactions.

3) Micro-CT による解析

Micro-CT による骨梁構造の解析後, BMD 値を擬似カラーで 3D 画像表示したところ, GM

群および OIM (D-) 群ともに頭頂骨側から新生骨形成を認めた (Fig. 4). GM 群と比較して, OIM (D-) 群は広範囲に新生骨の形成が観察された (Fig. 4B).

形成された新生骨を定量的に評価するために, 骨梁構造計測を行ったところ, OIM (D-) 群は GM 群と比較して計測した全ての値において高値を示した (Fig. 5). この結果から, OIM (D-) 群はより成熟した新生骨の形成を認めた.

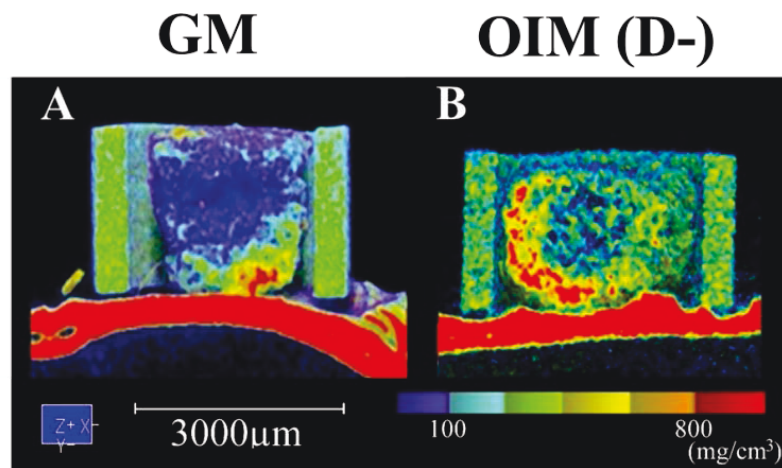


Figure 4. Color images showing bone mineral density by TRI/3D-BON; A small amount of newly formed bone was seen on the inner side of the PTFE tube in the GM group at 28 days (A). New bone formation had progressed into the PTFE tube in the OIM (D-) group (B). Bars = 3000 μm .

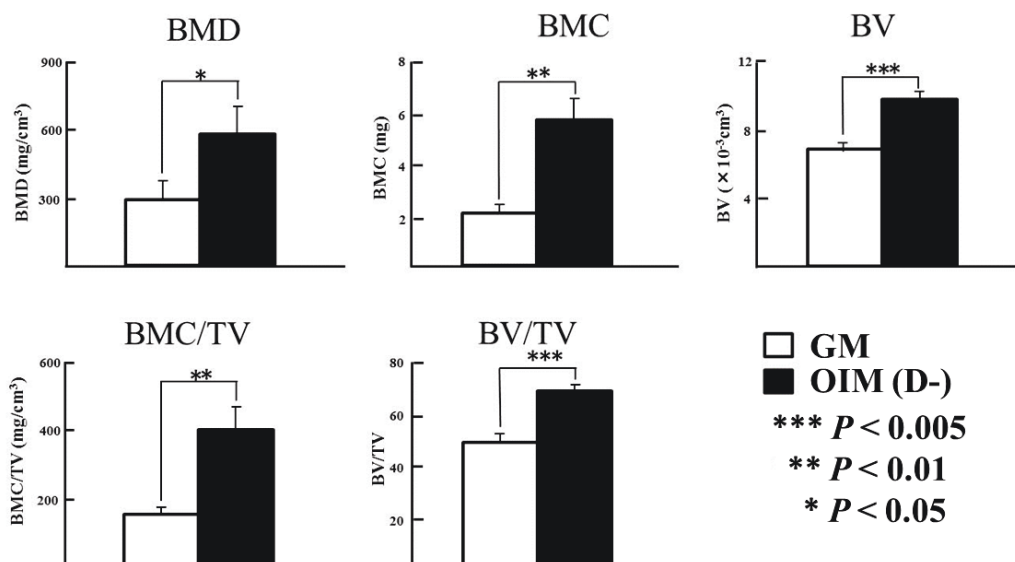


Figure 5. Micro-CT analysis; Quantitative measurement of bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), bone volume (BV), BMC/total volume (BMC/TV), and BV/TV. Columns represent means \pm standard deviation (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.005$).

2. PRGF 移植による骨形成効果の検討

1) 組織学的所見

PRGF 群は、術後 2 週目より、骨膜と頭頂骨の間で新生骨の形成を認めた (Fig. 6B, D). しかし、対照群はほとんど新生骨の形成を認めなかった (Fig. 6A, C). 術後 8 週目において PRGF 群は、対照群と比べて、広範囲に新生骨の形成が観察された (Fig. 6F, H). 加えて、新生骨辺縁には、比較的規則的な骨芽細胞の配列を認めた (Fig. 6D, G, H).

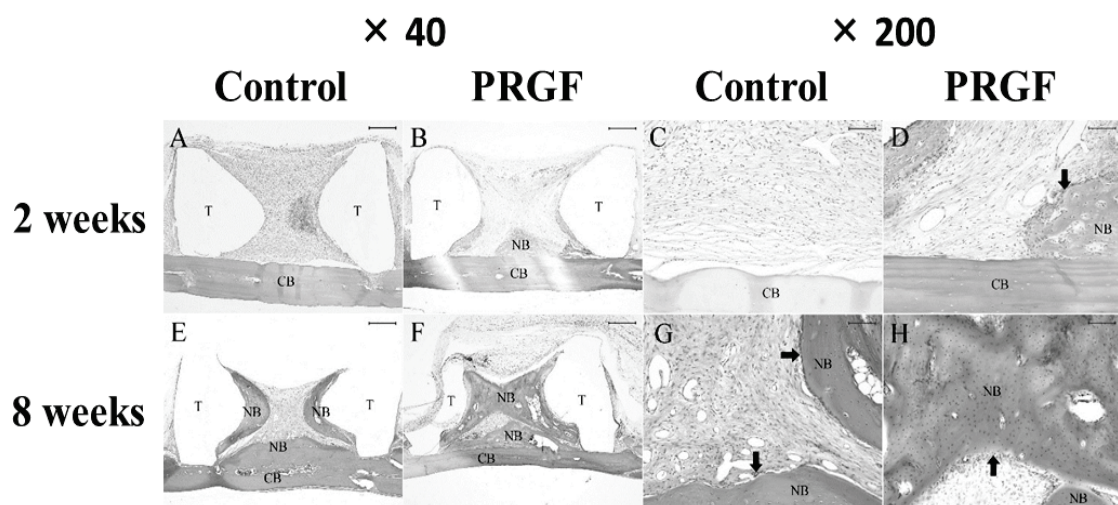
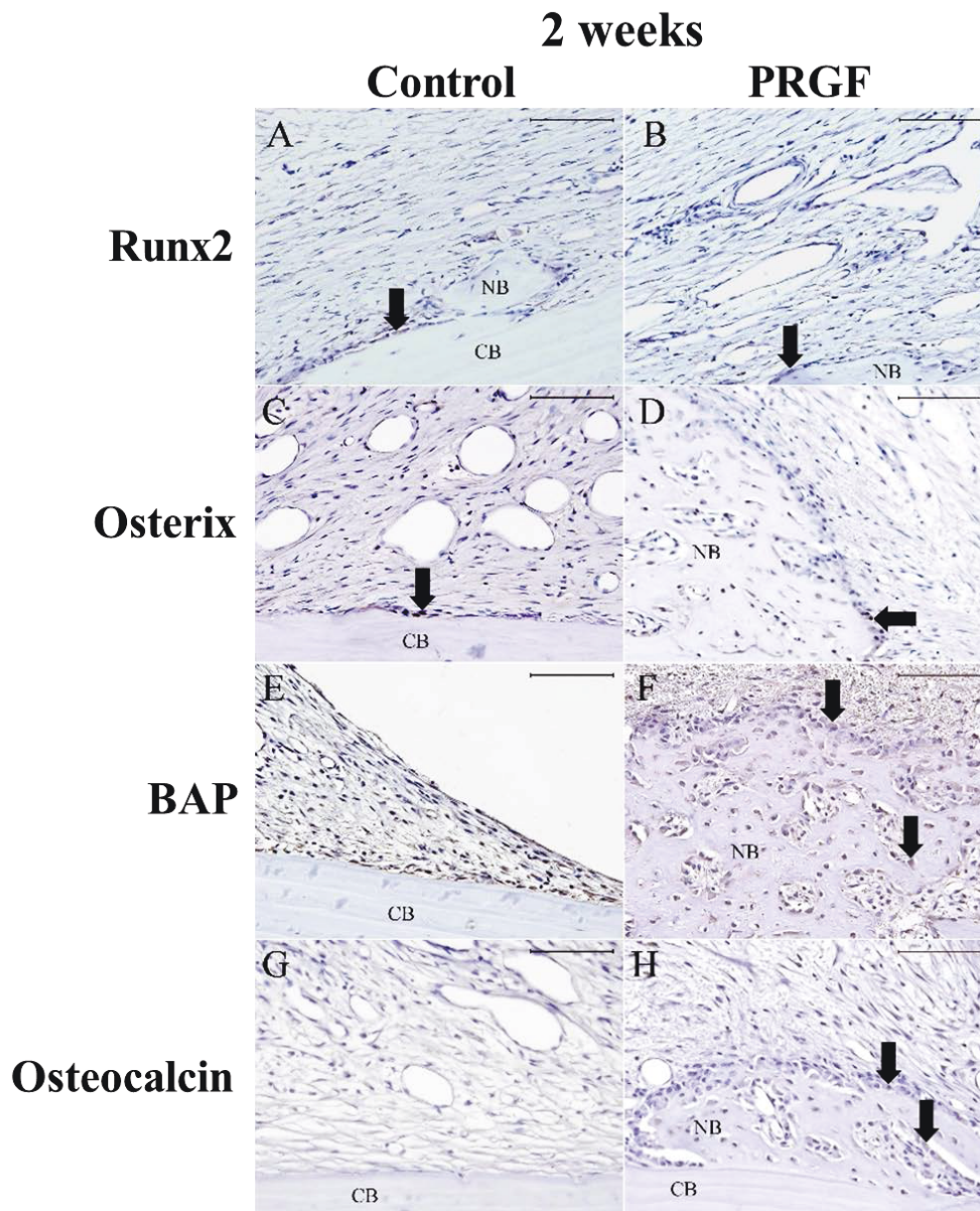


Figure 6. Histological findings with H-E staining; New bone formation was observed at 2 weeks and 8 weeks (A-D, E-H, respectively). Higher magnification images of A, B, E, F ($\times 40$) are shown in C, D, G, H ($\times 200$), respectively. (A, B, E, F): Bars = 500 μm , (C, D, G, H): Bars = 100 μm (NB: new bone; CB: calvarias bone; T: tube; black arrows: osteoblast).

2) 免疫組織化学的所見

免疫組織化学的染色像を Fig. 7 に示す。術後 2 週目, Runx2 と Osterix は対照群で頭頂骨辺縁に骨芽細胞の陽性所見を認め (Fig. 7A, C), PRGF 群では, 特に新生骨内の骨芽細胞で陽性所見が観察された (Fig. 7B, D). BAP および Osteocalcin は, PRGF 群において新生骨辺縁の骨芽細胞および新生骨内の骨芽細胞に陽性所見を認めた (Fig. 7F, H). しかし, 対照群は BAP および Osteocalcin に陰性であった (Fig. 7E, G). 術後 8 週目において Runx2, Osterix, BAP および Osteocalcin は両群において陽性所見を認めた (Fig. 7I-P).



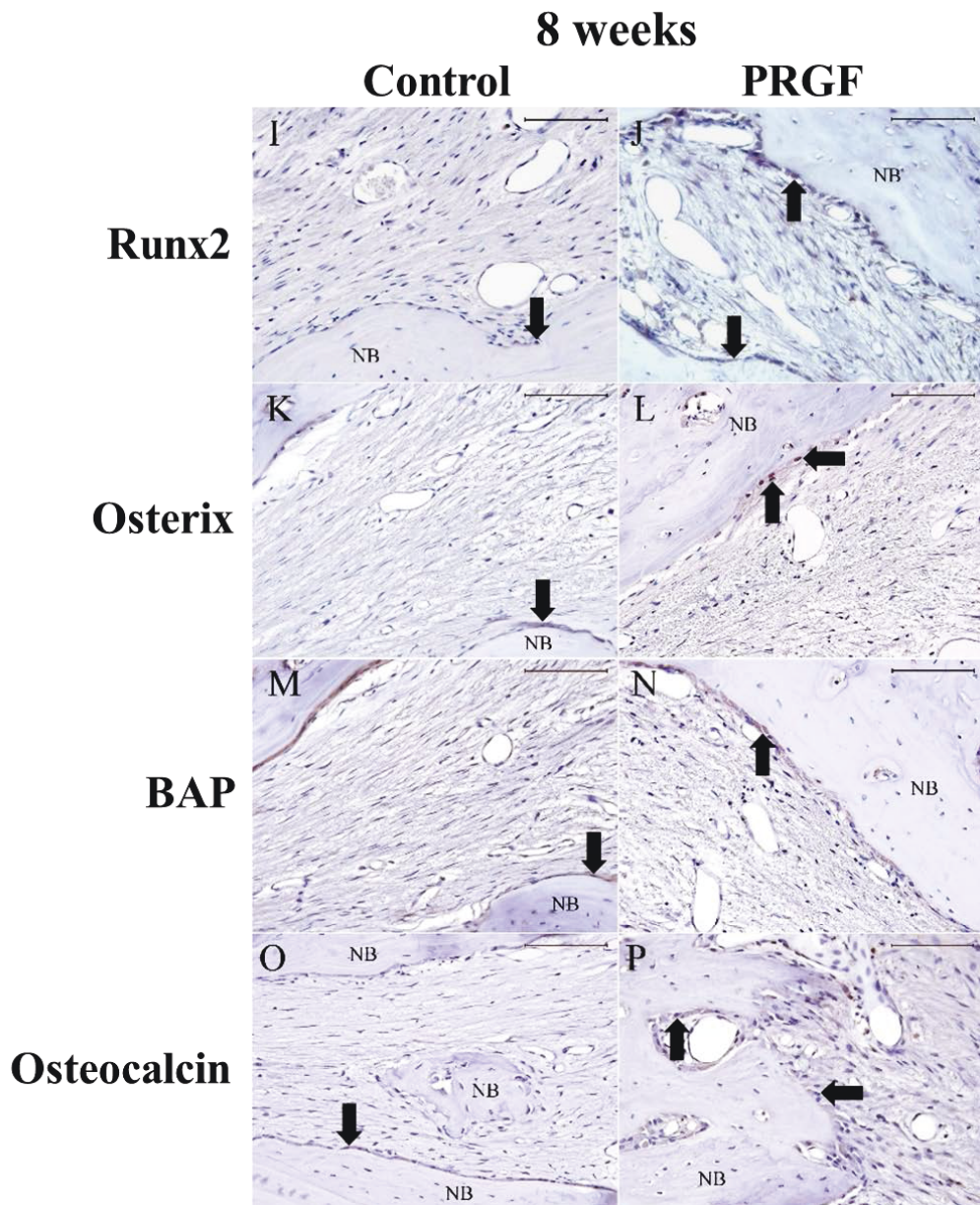


Figure 7. Immunohistochemical staining; Runx2 (A, B, I, J), Osterix (C, D, K, L), BAP (Bone Alkaline Phosphatase) (E, F, M, N) and Osteocalcin (G, H, O, P) at 2 weeks (A-H) and 8 weeks (I-P) ($\times 400$). (A-P): Bars = 100 μ m, (NB: new bone; CB: calvarias bone). Arrows indicate to positive reactions.

3) Micro-CT による解析

Micro-CTによる骨梁構造の解析後、BMD値を擬似カラーで3D画像表示したところ、術後2週目にてPRGF群は対照群と比べて、頭頂骨上に少量の新生骨形成を認めた (Fig. 8A, B). 術後8週目では術後2週目と比較して新生骨の形成範囲が増加した. 術後8週目においてPRGF群は対照群と比べて、チューブ内の新生骨形成範囲の増加を認めた (Fig. 8C, D). PRGF群は術後8週目のPTFEチューブの中央部まで、ほとんど新生骨で満たされていた (Fig. 8D).

骨梁構造計測においてBMDは術後2週目および8週目の両群間で有意差を認めなかった (Fig. 9A, D). BMCとBVについて、PRGF群と対照群を比較すると、いずれもPRGF群の方が高値であったが (Fig. 9B, C), 特に8週間にて有意差が認められた (Fig. 9E, F).

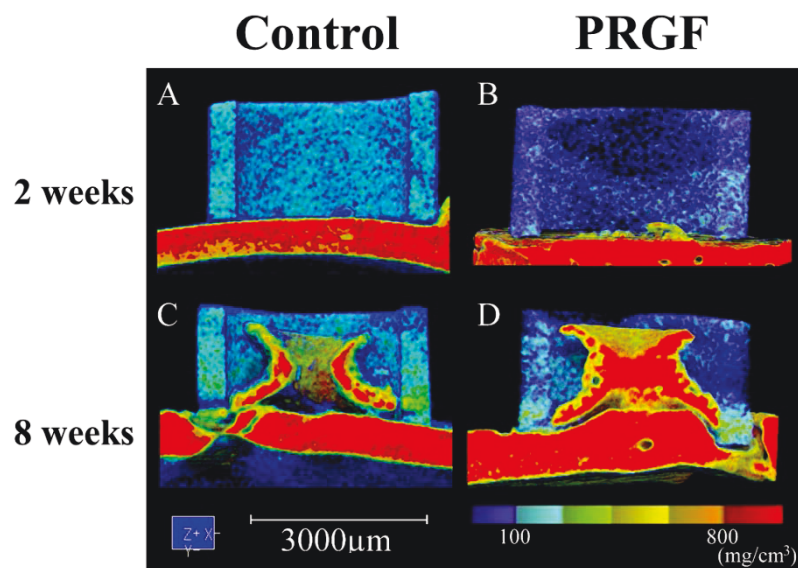


Figure 8. Color images showing bone mineral density by TRI/3D-BON; The inner PTFE tube contained a small amount of newly formed bone on the calvaria side at 2 weeks (A, B). Area of new bone formation progressed into the tube in both groups at 8 weeks (C, D). The images show the control (A, C), PRGF (B, D) groups. Bars = 3000 μm .

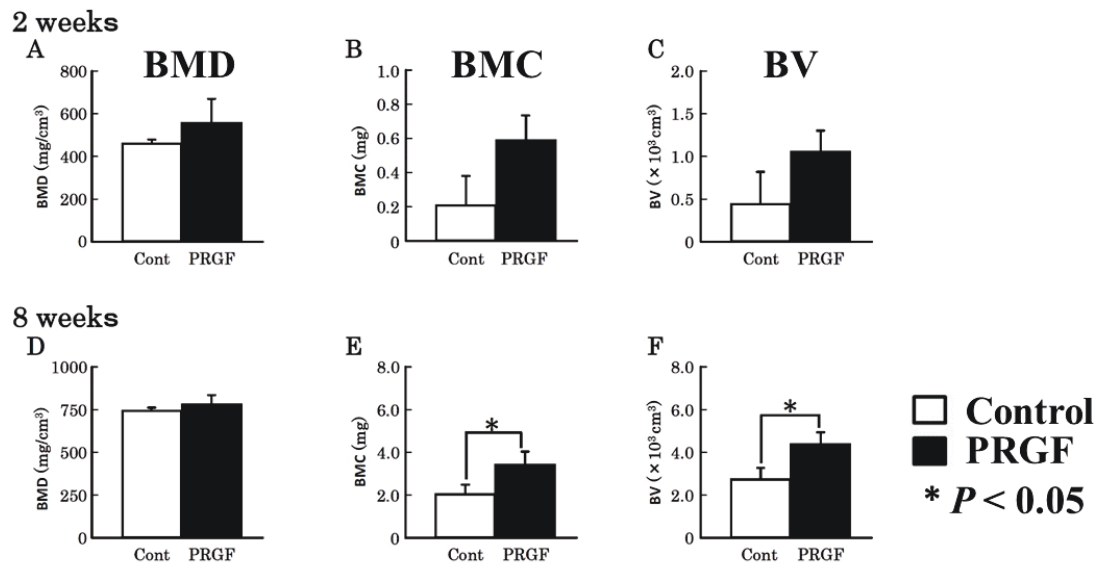


Figure 9. Micro-CT analysis; BMD (A), BMC (B) and BV (C) at 2 weeks; and BMD (D), BMC (E) and BV (F) at 8 weeks. (BMD: bone mineral density; BMC: bone mineral content; BV: bone volume). Columns represent means \pm standard deviation (*: $P < 0.05$).

考察

組織再生に用いられる未分化間葉系幹細胞は、限定的ではあるが様々な細胞へ分化誘導することが可能である。hDFC は脂肪細胞、セメント芽細胞および歯根膜線維芽細胞などに分化することが知られており³⁰⁻³²⁾、DEX を含んだ OIM で培養すると石灰化し、ラット頭頂骨上に移植すると骨を形成することが報告されている²⁶⁾。しかし、DEX は、長期投与による骨粗鬆症発症のリスクや³³⁾、骨芽細胞の増殖を抑制し、破骨細胞を増加させることが報告されている^{34,35)}。従って、骨再生医療においては、DEX の使用を極力避けることが望ましいと考えられる。hDFC は、*in vitro* で DEX を含まない OIM でも石灰化することが報告されていることから¹⁴⁾、骨再生医療用細胞として有用であると考えられる。そこで、本研究では、OIM (D-) または GM で三次元培養した hDFC をそれぞれラット頭頂骨上に移植し、培養条件の異なる hDFC の骨形成効果について比較検討を行った。

ラット頭頂骨に hDFC を移植後 4 週目の組織学的所見では、OIM (D-) 群は対照である GM 群と比較して、より多くの新生骨形成を認めた (Fig. 2B)。また新生骨周囲には、骨芽細胞の配列や拡張した毛細血管が観察された (Fig. 2C, D)。Micro-CT による骨梁構造計測の結果、OIM (D-) 群は GM 群よりも、BMC、BMD、BV、BMC/TV および BV/TV のいずれにおいても高値を示した (Fig. 5)。骨粗鬆症患者の病態評価基準である BMD³⁶⁾ および BV が高値を示したことから、OIM (D-) で培養した hDFC を移植すると、骨量も多く、より成熟した新生骨が形成されることが示唆された。免疫組織化学的観察では、BMP2、Runx2 および Osterix は、新生骨辺縁部の骨芽細胞に陽性所見が認められた (Fig. 3)。BMP2 は未分化間葉系幹細胞に対し骨芽細胞分化を促進する³⁷⁾。Runx2 と Osterix は骨芽細胞の分化に必須の転写因子である³⁸⁻⁴⁰⁾。Runx2 または Osterix の欠損マウスは成熟した骨芽細胞が認められず、骨を欠失することからは骨形成に必須の転写因子と報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。VEGF は骨芽細胞および血管内皮細胞に発現が認められた (Fig. 3)。VEGF は血管新生を促進作用することで、骨形成および骨修復に関与すること⁴³⁾、また内因性 VEGF の作用を遮断すると骨形成を阻害されること

が報告されている⁴⁴⁾。OIM (D-) で培養した hDFC は GM で培養した hDFC と比べ、VEGF の遺伝子発現およびタンパク質産生が上昇することが確認されている (結果は示していない)。これらのことから hDFC は OIM (D-) で培養しても骨芽細胞の分化促進、また VEGF の発現上昇により、新生骨を形成する可能性が示唆された。

hDFC は OIM (D-) で培養しても石灰化することが報告されており¹⁴⁾、さらに本研究の結果から、生体内へ移植すると新生骨形成を促進することが明らかとなった。したがって歯嚢は骨再生医療の細胞源として有用であると考えられた。

濃縮血小板血漿は、患者の血液から採取可能な自家移植材料であり、免疫反応を生じる可能性が極めて低く、再生医療に用いる際の安全性は高いといえる⁴⁵⁾。本研究では、ラットから採取した血液から濃縮血小板血漿の一種である PRGF を作製し、ラット頭頂骨上に移植した (Fig. 1)。組織学的所見では、術後 2 週目に PRGF 群では皮質骨側から形成された新生骨が認められたが、対照群では、ほとんど新生骨の形成が認められなかった (Fig. 6A, C)。術後 2 週目の免疫組織化学的所見では、対照群で既存の頭頂骨側に存在する骨芽細胞にのみ Runx2 および Osterix 陽性細胞が観察された (Fig. 7A, C)。PRGF 群では、既存骨と新生骨周囲の骨芽細胞に陽性所見が認められた (Fig. 7B, D)。Runx2 および Osterix は骨形成に重要な転写因子で、骨芽細胞の分化に重要な役割を担っているとされる³⁹⁻⁴¹⁾。一方で、BAP および Osteocalcin は、術後 2 週目に PRGF 群にのみ陽性所見が認められた (Fig. 7E, H)。BAP は石灰化に関与し、骨芽細胞の分化の指標である⁴⁶⁾。Osteocalcin は、骨芽細胞の分化後期に発現が認められる細胞外マトリックスタンパク質であり、石灰化に関与する⁴⁷⁾。従って、PRGF 群は対照群よりも早く石灰化を開始すると考えられた。

Micro-CT 分析では、術後 2 週目において BMD, BMC, BV の値は対照群と比較し、有意な差を認めないが、PRGF 群の方が高い傾向を示した (Fig. 9A-C)。術後 8 週目において、BMC および BV で PRGF 群の方が対照群と比較して有意に高値を示した (Fig. 9E, F)。過去の報告では、PRGF 中に存在する血小板は様々な増殖因子を放出し、従来から知られてい

る止血作用のみでなく、血管新生及び組織修復を促進させることが報告されている²⁶⁾。それらの中心的役割を果たす増殖因子としてTGF- β , VEGFが知られている^{10,13)}。TGF- β は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に関与し、骨形成を促進する^{27, 28)}。また、PRGFには多量のフィブリンが含まれており、組織再生の足場として有効であることが報告されている^{48,49)}。よって、PRGF群では、PRGF中に含まれる増殖因子、ならびに細胞が接着するための足場が供給されたことにより、新生骨形成が対照群よりも早く生じ、新生骨も多く形成されたと考えられた。しかし、本研究では、移植後2週目および8週目の観察のみに留まったため、今後より詳細な検討が必要であると考えられた。

本研究では、DEXを含まないOIMで培養したhDFC、およびPRGFをラット頭頂骨に移植し新生骨形成能を検討した。その結果、歯嚢は骨再生の細胞供給源として有用であり、PRGFは、骨再生において増殖因子および足場として有用な自家移植材料であることが示唆された。

結語

本研究では、生体への付加的侵襲が少ない移植材料である hDFC の骨形成効果、ならびに組織再生に必要な足場および増殖因子としての PRGF の骨形成能を検討することを目的とし、hDFC または PRGF をラット頭頂骨上に移植し、組織学的、免疫組織化学的検索および Micro-CT 解析を用いて検討した。

結果は次の通りである。

1. hDFC をラット頭頂骨上へ移植すると、組織学的所見として移植後 4 週目に両群ともに新生骨が観察された。OIM (D-) 群は GM 群と比較して、スキャホールド内に広範囲の新生骨が形成された。また両群ともに、新生骨周囲の結合組織には拡張した毛細血管が認められ、新生骨辺縁には骨芽細胞の配列が観察された。
2. 免疫組織化学的所見では、hDFC 移植後 4 週目において BMP-2, Runx2 および Osterix は両群ともに、結合組織内の新生骨辺縁に配列した骨芽細胞で陽性反応が観察された。両群ともに VEGF は、血管内皮細胞および新生骨の辺縁に配列した骨芽細胞において陽性所見を認めた。
3. hDFC 移植後 4 週目、Micro-CT による骨梁構造の解析後、BMD 値を擬似カラーで 3D 画像表示したところ、GM 群および OIM (D-) 群ともに頭頂骨側から新生骨形成を認めた。GM 群と比較して、OIM (D-) 群は広範囲に新生骨の形成が観察された。また、骨梁構造計測を行ったところ、OIM (D-) 群は GM 群と比較して計測した全ての値において高値を示した。この結果から、OIM (D-) 群はより成熟した新生骨の形成を認めた。
4. 組織学的所見にて術後 2 週目より、PRGF 群は骨膜と頭頂骨の間で新生骨の形成を認めた。しかし、対照群はほとんど新生骨の形成を認めなかった。術後 8 週目において PRGF 群は、対照群と比べて、広範囲に新生骨の形成が観察された。加えて、新生骨辺縁には、比較的規則的な骨芽細胞の配列を認めた。
5. 術後 2 週目の免疫組織化学的所見において、Runx2 と Osterix は対照群で頭頂骨辺縁に骨

芽細胞の陽性所見を認め、PRGF 群では、特に新生骨内の骨芽細胞で陽性所見が観察された。BAP および Osteocalcin は、PRGF 群において新生骨辺縁の骨芽細胞および新生骨内の骨芽細胞に陽性所見を認めた。しかし、対照群は BAP および Osteocalcin に陰性であった。術後 8 週目において Runx2, Osterix, BAP および Osteocalcin は両群において陽性所見を認めた。

6. PRGF 移植後 2 および 8 週目に Micro-CT による骨梁構造の解析および計測を行った。BMD 値を擬似カラーで 3D 画像表示したところ、術後 2 週目にて PRGF 群は対照群と比べて、頭頂骨上に少量の新生骨形成を認めた。術後 8 週目では、術後 2 週目と比較して新生骨の形成範囲が増加した。術後 8 週目において PRGF 群は対照群と比べて、骨膜と頭頂骨の間で新生骨形成範囲の増加を認めた。骨梁構造計測において BMD は術後 2 週目および 8 週目の両群間で有意差を認めなかった。BMC と BV について、PRGF 群と対照群を比較すると、いずれも PRGF 群の方が高値であったが、特に 8 週間にて有意差が認められた。

本研究では、DEX を含まない OIM で培養した hDFC、および PRGF をラット頭頂骨に移植し新生骨形成能を検討した。その結果、歯嚢は骨再生の細胞供給源として有用であり、PRGF は、骨再生において増殖因子および足場として有用な自家移植材料であることが示唆された。

本論文は、参考文献1「Applicability of human dental follicle cells to bone regeneration without dexamethasone: an in vivo pilot study」 International journal of oral & Maxillofacial Surgery [掲載予定] および参考文献2「Effects of plasema rich in Growth Factors on Bone Formation in rat calvaria」 Journal of Hard Tissue Biology [掲載予定] をまとめたものである。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました日本大学松戸歯学部顎顔面外科学講座の近藤壽郎に謹んで感謝の意を表するとともに、ご指導、ご校閲の労を賜りました口腔病理学講座 久山佳代教授、歯周病学講座 小方頼昌教授に深く御礼申し上げます。

また本研究に際し、適切なご指導ならびに助言をいただきました日本大学客員教授 久保山昇先生、日本大学客員教授 山本浩嗣先生、口腔病理学講座 末光正昌助手(専任扱)、顎顔面外科学講座 小倉直美講師に感謝いたします。さらに、本研究を進めるにあたり終始ご協力いただいた顎顔面外科学講座および口腔病理学講座の諸先生方に感謝いたします。

引用文献

- 1) Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, et al: Biomaterials for Craniofacial Bone Engineering. *J Dent Res*, 93: 1187-1195, 2014.
- 2) Jung GU, Jeon JY, Hwang KG, et al: Preliminary evaluation of a three-dimensional, customized, and preformed titanium mesh in peri-implant alveolar bone regeneration. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 40: 181-187, 2014.
- 3) Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, et al: Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33: 157-163, 2004.
- 4) Kang SH, Chung YG, Oh IH, et al: Bone regeneration potential of allogeneic or autogeneic mesenchymal stem cells loaded onto cancellous bone granules in a rabbit radial defect model. *Cell Tissue Res*, 355: 81-88, 2014.
- 5) 山田陽一: 口腔外科領域における再生医療、その後の進歩 体性幹細胞を用いた顎顔面骨の再生医療. *日本口腔外科学会雑誌*, 55: 532-544, 2009.
- 6) Alhag M, Farrell E, Toner M, et al: Evaluation of early healing events around mesenchymal stem cell-seeded collagen-glycosaminoglycan scaffold. An experimental study in Wistar rats. *Oral Maxillofac Surg*, 15: 31-39, 2011.
- 7) Bahmad F Jr, Merchant SN: Histopathology of ossicular grafts and implants in chronic otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 116: 181-191, 2007.
- 8) Grimm WD, Dannan A, Giesenhagen B, et al: Translational Research: Palatal-derived Ecto-mesenchymal Stem Cells from Human Palate: A New Hope for Alveolar Bone and Cranio-Facial Bone Reconstruction. *Int J Stem Cells*, 7: 23-29, 2014.
- 9) Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85: 638-646, 1998.

- 10) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al: Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 6: 1282-1286, 2000.
- 11) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147, 1999.
- 12) Morsezeck C, Götz W, Schierholz J, et al: Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 24: 155-165, 2005.
- 13) Khanna-Jain R, Agata H, Vuorinen A, et al: Addition of BMP-2 or BMP-6 to dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate may not enhance osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Growth Factors*, 28: 437-446, 2010.
- 14) Takahashi K, Ogura N, Aonuma H, et al: Bone morphogenetic protein 6 stimulates mineralization in human dental follicle cells without dexamethasone. *Arch Oral Biol*, 58: 690-698, 2013.
- 15) Ahlström M, Pekkinen M, Lamberg-Allardt C: Dexamethasone downregulates the expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in mesenchymal stem cells. *Steroids*, 74: 277-282, 2009.
- 16) Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS: Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 90: 13-22, 2003.
- 17) Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG: Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*, 60: 1176-1181, 2002.
- 18) Choi BH, Im CJ, Huh JY, et al: Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33: 56-59, 2004.
- 19) Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, et al: Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*, 64: 443-451,

2006.

- 20) Wadhwa M, Krailadsiri P, Dilger P, et al: Cytokine levels as performance indicators for white blood cell reduction of platelet concentrates. *Vox Sang*, 83: 125-136, 2002.
- 21) Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, et al: Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine secretion in primary human osteoblasts. *J Periodontol*, 84: 1180-1190, 2013.
- 22) Anitua E, Troya M, Orive G: An autologous platelet-rich plasma stimulates periodontal ligament regeneration. *J Periodontol*, 84: 1556-1566, 2013.
- 23) Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Del Corso M, et al: Shedding light in the controversial terminology for platelet-rich products: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), platelet-leukocyte gel (PLG), preparation rich in growth factors (PRGF), classification and commercialism. *J Biomed Mater Res A*, 95: 1280-1282, 2010.
- 24) Anitua E, Begoña L, Orive G: Controlled ridge expansion using a two-stage split-crest technique with ultrasonic bone surgery. *Implant Dent*, 21: 163-170, 2012.
- 25) Anitua E: Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14: 529-535, 1999.
- 26) Iwai S, Kuyama K, Kuboyama N, et al: Osteogenic Potential of Human Dental Follicle Cells on Rat Calvaria. *J Hard Tissue Biol*, 22: 95-104, 2013.
- 27) Takiguchi S, Kuboyama N, Kuyama K, et al: Experimental Study of Bone Formation Ability with the Periosteum on Rat Calvaria. *J Hard Tissue Biol*, 18: 149-160, 2009.
- 28) Yoshioka T, Kanamori A, Washio T, et al: The effects of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) on healing of medial collateral ligament of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 21: 1763-1769, 2013.
- 29) Kwapiszewska G, Chwalek K, Marsh LM, et al: BDNF/TrkB signaling augments smooth

- muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Am J Pathol*, 181: 2018-2029, 2012.
- 30) Aonuma H, Ogura N, Takahashi K, et al: Characteristics and osteogenic differentiation of stem/progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling. *Cell Tissue Res*, 350: 317-331, 2012.
- 31) Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, et al: Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*, 329: 283-294, 2007.
- 32) Luan X, Ito Y, Dangaria S, et al: dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev*, 15: 595-608, 2006.
- 33) Li J, Zhang N, Huang X, et al: Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation. *Cell Death Dis*, 2013: doi: 10.1038/cddis. 2013. 348.
- 34) Wang FS, Ko JY, Yeh DW, et al: Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology*, 149: 1793-1801, 2008.
- 35) Smith E, Frenkel B: Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta- dependent and –independent manner. *J Biol Chem*, 280: 2388-2394, 2005.
- 36) Burghardt AJ, Link TM, Majumdar S: High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res*, 469: 2179-2193, 2011.
- 37) Reddi AH: Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 83: S1-6, 2001.
- 38) Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, et al: Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol*

Endocrinol, 11: 1681-1694, 1997.

- 39) Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, et al: Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells*, 6: 851-856, 2001.
- 40) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108: 17-29, 2002.
- 41) Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, et al: SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS One*, 7: e32364, 2012.
- 42) Komori T: Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem*, 112: 750-755, 2011.
- 43) Street J, Bao M, deGuzman L, et al: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9656-9661, 2002.
- 44) Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 5: 623-628, 1999.
- 45) Mariani E, Filardo G, Canella V, et al: Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy*, 16: 1294-1304, 2014.
- 46) Kanakis I, Nikolaou M, Pectasides D, et al: Determination and biological relevance of serum cross-linked type 1 collagen N-telopeptide and bone-specific alkaline phosphatase in breast metastatic cancer. *J Pharm Biomed Anal*, 34: 827-832, 2004.
- 47) Tanaka S, Matsuzaka K, Sato D, et al: Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: analysis of cbfa-1, osteocalcin, and VEGF expression. *J Oral Implantol*, 33: 321-326, 2007.
- 48) Anitua E, Orive G, Pla R, et al: The effects of PRGF on bone regeneration and on titanium

implant osseointegration in goats: a histologic and histomorphometric study. *J Biomed Mater Res A*, 91: 158-165, 2009.

- 49) Anitua E, Zalduendo MM, Pardo R, et al: Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: Evaluation of the effect of leukocyte inclusion. *J Biomed Mater Res A*, 2014 Jun 2. [Epub ahead of print].