

論文名：骨分化誘導と低酸素処理併用によるラット間葉系細胞の多面的骨誘導能促進効果の検討

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 齋藤 直朗

---

移植される間葉系幹細胞に骨形成能を期待する骨再生では、移植細胞の宿主環境における生存や新生骨形成までの期間短縮を促すという観点から、宿主での骨形成細胞誘導、血管新生促進、成長因子供給などの多面的アプローチが重要である。ティッシュエンジニアリングによる骨再生療法において、骨形成能、血管新生能、細胞誘導能などの多面的機能強化を細胞に賦与することは骨再生の効率化につながる。近年、細胞の骨誘導機能に対する骨分化誘導と低酸素処理の併用が注目されている。本研究では骨再生療法に対する間葉系細胞の多面的機能強化を図るプロトコル開発を目的として、間葉系細胞に対する骨分化誘導と低酸素処理の効果的な適用法を検討した。

実験にはラット骨髄、脂肪、歯根膜から分離した間葉系細胞を用いた。低酸素の濃度、期間、タイミングと骨分化誘導の各組み合わせにおける各細胞の反応を骨分化能、血管新生能、細胞誘導能の指標である **Runx2**、**Vegfa**、**Cxcl12** を標的遺伝子として、遺伝子発現の変化を定量的 RT-PCR 法にて評価した。また、細胞の石灰化能を石灰化結節形成の程度により確認した。

まず、骨分化誘導と低酸素の同時処理が細胞に与える影響を酸素濃度 2%、96 時間の処理で検討したところ、低酸素処理が加わった群で **Runx2** の発現が低下した。一方、**Vegfa** は低酸素処理によりいずれの細胞においても発現が上昇した。骨分化誘導と低酸素を併用した場合は、骨髄および脂肪由来細胞で低酸素処理単独でみられた **Vegfa** の発現増加が認められなかったが、歯根膜由来細胞では発現の増加を認めた。**Cxcl12** は低酸素処理により骨髄、脂肪由来細胞において発現が低下していた。骨分化誘導と低酸素の同時処理は骨分化に対して抑制的な作用を及ぼすと考えられたため、次に低酸素プレコンディショニングが細胞機能強化に貢献するか検討を行ったところ、低酸素プレコンディショニングによる **Runx2** の発現への影響は認めなかった。また、骨分化誘導が加わった細胞では **Vegfa** の発現量は低下しており、低酸素プレコンディショニングを行った群でも同様の傾向を認めた。96 時間の低酸素処理は **Vegfa** の発現に対しては亢進的作用を示すものの、**Runx2** の発現には抑制的作用を示したため、低酸素処理が **Runx2** の発現に対して抑制作用を引き起こさない、より短い処理時間および酸素濃度 0.5%、2%、5%を検索した。その結果、酸素濃度 0.5%、12 時間の処理で **Runx2** の発現を低下させることなく、効率的に **Vegfa** の発現が亢進した。低酸素処理のタイミングとして、骨分化誘導との同時処理およびプレコンディショニングでは多面的機能強化の効果を及ぼしていないと考えられたため、骨分化誘導後に低酸素処理を行うポストコンディショニングでの検索を酸素濃度 0.5%、12 時間の処理で行った。その結果、骨髄由来細胞で骨分化誘導のみでは **Runx2**、**Cxcl12** の遺伝子の発現が上昇したのに対し、低酸素ポストコンディショニングを加えたところ、**Runx2**、**Vegfa**、**Cxcl12** すべて

## 【別紙2】

の遺伝子発現が上昇した。一方、脂肪、歯根膜由来細胞では低酸素ポストコンディショニングにより *Vegfa* の発現上昇が認められたが、*Runx2*、*Cxcl12* の発現は亢進しなかった。さらに、低酸素ポストコンディショニングが石灰化能に与える影響を石灰化結節形成の程度により評価したところ、歯根膜由来細胞では低酸素ポストコンディショニングにより石灰化結節形成が顕著に増加した。対照的に骨髄由来細胞では低酸素ポストコンディショニングの有無によらず、骨分化誘導に対する石灰化能が圧倒的であり、脂肪由来細胞では骨分化誘導と低酸素ポストコンディショニングの両者に対する反応が乏しかった。

以上より、骨分化誘導と低酸素同時処理または低酸素プレコンディショニングの併用は実験に用いたすべての細胞において多面的骨誘導能のマーカーとして検討した遺伝子発現に抑制的な効果を示した。一方、骨分化誘導と低酸素ポストコンディショニングの併用では骨髄由来細胞において標的とした複数の骨分化、血管新生、細胞誘導の遺伝子発現が有意に上昇し、本プロトコルの有効性が示唆された。さらに、歯根膜由来細胞では低酸素ポストコンディショニングにより石灰化結節形成が顕著に増加したが、骨髄、脂肪由来細胞では低酸素ポストコンディショニングに対する反応が明らかではなかった。このことから低酸素環境を応用した骨再生医療の効率的プロトコルの開発には細胞ソースを十分考慮する必要があると考えられた。