



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in <i>Rattus norvegicus</i> calvaria defect model |
| Author(s)    | Honda, Hirotugu   |
| Citation     | 大阪大学, 2013, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/26312">https://hdl.handle.net/11094/26312</a>   |
| rights       |   |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。       |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

### Synopsis of Thesis

## 〔論文題名：Thesis Title〕

Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model

(骨髓由来間葉系細胞とconcentrated growth factorsを用いた骨再生)

専攻名 : 外科系臨床医学  
Division

学位申請者 : 本田 博嗣  
Name

## 〔目的 (Purpose)〕

Concentrated growth factors (CGF) は血小板  $\alpha$  顆粒由来の多様な成長因子とフィブリン線維の3次元構造を含む100%自己血由来のフィブリングルでありPlatelet rich plasmaに続く第2世代の濃縮血小板として再生医療分野等での応用が期待されている。また、CGFに骨髓由来間葉系細胞 (BMSCs) を加えると再生医療に必要な3要素、Growth Factor (血小板由来サイトカイン)、Scaffold (フィブリン線維)、Cells (BMSCs) をすべて兼ね備え、再生医療の理想的なツールとなることが期待される。本研究の目的はCGFの骨再生への有用性について検討を行うことである。

## 〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕

(Methods) In vitroでCGFの細胞増殖と骨分化に与える影響をヒトの株化間葉系幹細胞 (h-TERT-E6/E7) を用いてCGF添加群 (1, 3, 5, 7, 10, 20%) と同量の血清添加群 (対照) とで比較検討した。評価は細胞増殖をProliferation assayでCell count 行い、代表的な骨分化マーカーの発現をreal-time PCRで比較し、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色、アリザリンレッド (A-red) 染色およびvon Kossa染色で骨分化ならびに石灰化の比較検討を行った。in vivoではSDラット (雄、10~12週齢) の頭蓋骨にcritical-sizeである直系5mmの骨孔を作成したcalvaria defectモデルを用いて骨欠損単独 (対照) 群、CGF充填群、CGF+骨髓由来間葉系細胞 (BMSCs) 充填群の3群にて術後4週、8週、12週での骨再生を  $\mu$ -CT並びに組織標本にて検討した。

(Results) In vitroで細胞増殖はCGF添加群で濃度依存的に対照群と比して優位に促進したが20%の高濃度群では10%群に比して抑制される傾向を認めた。遺伝子発現はALP, osteopontin (OPN), type I collagen alpha 1 (COL1A1) がCGF添加群で濃度依存的に発現が上昇し対照群と比して優位差を認めたが高濃度群では細胞増殖同様、各遺伝子発現の減少傾向を認めた。骨芽細胞分化のKey regulatorであるrunt-related transcription factor 2 (RUNX2) やosterix (OSX) の発現には両群間や各濃度間で有意差がなかった。ALP染色、A-red染色およびvon Kossa染色ではCGF添加群が3~10%の濃度域では対照群と比して濃染する傾向を認めたがこちらも20%の高濃度群では染色性は低下していた。In vivoのcalvaria defectモデルではいずれの週数においても対照群に比してCGF群、CGF+BMSCs群では良好な骨新生を認め、CGF+BMSCs群で最も良好な結果を得た。組織標本では対照群では主に骨孔辺縁から週数を経るに従って徐々に中心部に向かって骨新生が確認されるのに対し、CGF+BMSCs群で術後早期 (4週) より骨孔辺縁だけでなく骨孔中心部付近まで新生骨を認め12週ではcritical-sizeの骨孔がほぼ完全に新生骨で閉鎖している様子が確認できた。

## 〔総括 (Conclusion)〕

CGFはin vitroで間葉系細胞の増殖、骨分化を濃度依存的に増強するが20%の高濃度群では逆に抑制する傾向が認められ至適濃度の存在が示唆された。また、CGFはin vivoで骨欠損の修復を促進するだけでなく、BMSCsと組み合わせるとより新生骨の形成が促進され骨再生医療における安全かつ有用なツールとなる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

|         |            |       |
|---------|------------|-------|
| (申請者氏名) |            | 本田 博嗣 |
| 論文審査担当者 | (職)        | 氏名    |
|         | 主 査 大阪大学教授 | 吉川 秀樹 |
|         | 副 査 大阪大学教授 | 細川 亘  |
|         | 副 査 大阪大学教授 | 澤芳枝   |

## 論文審査の結果の要旨

近年再生医療への世間の注目は高く、安全で効果的な再生医療の開発は重要な課題である。Concentrated growth factors(CGF)は血小板 $\alpha$ 顆粒由来の多様な成長因子とフィブリン線維の3次元構造を含む100%自己血由来のフィブリンゲルであり再生医療における重要な3要素①細胞（Cell）、②増殖因子（Growth Factor）、③足場（Scaffold）のうち②と③を有する素材であり再生医療分野等での応用が期待されている。今回、我々はin vitroでCGF中の増殖因子が骨髄由来間葉系細胞の増殖、骨分化に与える影響を検討し、またin vivoでCGFに骨髄由来間葉系細胞を加えたCombination therapyの骨再生への有用性について検討を行った。その結果、CGF中の増殖因子はある一定の濃度域では間葉系細胞の増殖、骨分化を促進するが高濃度では逆に阻害することが明らかとなり指摘濃度の存在が示唆された。また、CGFと骨髄由来間葉系細胞のCombination therapyは動物実験で骨欠損の修復を優位に促進し再生医療に必要な3要素を満たした骨再生の有用なツールとなると考えられた。以上の結果より本研究は100%自己血由来の安全で効果的な新しい骨再生医療の可能性を示すうえで意義のある研究であり、学位に値すると考えられる。