

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20595

研究課題名(和文) 未分化間葉系幹細胞とレーザーを併用した骨再生技術の確立と顎裂閉鎖治療への応用

研究課題名(英文) The establishment of bone regeneration combining mesenchymal stem cells and laser and its application to the treatment of jaw cleft

研究代表者

鷲見 圭輔 (Sumi, Keisuke)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：00707078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：MSCsにおける破骨細胞の分化へおよぼす影響として、血管誘導能の促進は認める一方で破骨細胞分化への抑制を認めた。次に、MSCsがRAW264の走化性に及ぼす影響についての検討を行った結果、MSCsはRAW264に対して、CCL2-CCR2相互作用を介したシグナル伝達により走化性に影響することが明らかとなった。その結果を踏まえ、マウス頭蓋骨欠損部への未分化MSCs移植部へのRAW264の集積についての検証を行い、MSCs移植群における広範囲なRAW264の集積が認められた。これらより、MSCsが周囲の細胞の走化性に影響を及ぼすことによって骨リモデリングに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As an effect of MSCs on the differentiation of osteoclasts, it was found that promotion of blood vessel - inducing ability is observed but it inhibits osteoclast differentiation. And as a result of examining the influence of MSCs on the chemotaxis of RAW 264, it was revealed that MSCs affect chemotaxis by RAW 264 through signal transduction via CCL2-CCR2 interaction. From in vitro results, we examined the accumulation of RAW 264 in the MSCs transplantation area using skull defect model mouse and found extensive RAW 264 accumulation in the MSCs transplanted group. From these results, it is suggested that MSCs may be involved in bone remodeling by affecting chemotaxis of surrounding cells.

研究分野：骨再生

キーワード：間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂 (CLP) は、複数の遺伝子要因と環境要因から発症する多因子性の疾患であり、日本人における発症率は 0.19% である。病態は、胎生期における顔面突起の癒合不全に起因する顎裂を特徴とし、構音障害や顔面の変形が認められる。骨架橋の確立や歯槽堤の形成、鼻口腔瘻の完全閉鎖などを目的として、ほとんどの症例において同部への腸骨移植が学齢期に行われるが腸骨採取時の外科的侵襲は患者の大きな負担となり、長期入院の必要性や腸骨採取後の疼痛とそれに伴う歩行障害など、種々の問題が伴う。そこで、我々の研究グループでは、腸骨採取に伴う侵襲を低減しながら骨再生を達成する方法として、MSCs 移植による骨再生療法の検討を重ねてきた。顎裂閉鎖治療に際しては、他の部位と異なり、永久歯の萌出誘導や矯正的な歯の移動などの必要性から、移植に用いられる担体は破骨細胞により速やかに吸収され、それに続く迅速な骨形成が重要となる。我々の研究グループでは半導体レーザーの、細胞に対する影響について検証しこれまでの検討により、半導体レーザーの低出力照射はヒト歯髄間葉系幹細胞に対する増殖能、基質代謝を亢進させることが明らかとなった。これらを併用することにより、より信頼性の高い骨再生技術の確立が期待される。

### 2. 研究の目的

MSCs と破骨細胞の相互作用による CAP を含めた骨代謝機構を解明するとともに、骨リモデリングの亢進が生じる条件を検証することとした。さらに、レーザーの顎裂部への照射によって、MSCs と破骨細胞の相互作用を活性化させることにより、顎裂部の骨誘導効果が期待される。以上の背景から、MSCs による骨代謝活性を高めた骨再生法を確立し、顎裂閉鎖治療に応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

実験 1 では、未分化 MSCs が破骨細胞前駆細胞の分化・増殖に及ぼす影響についての検討を行い、実験 2 では、未分化 MSCs が破骨細胞前駆細胞の走化性に及ぼす影響についての検討を行った。実験 3 では頭蓋骨欠損モデルマウスを用いて、未分化 MSCs が破骨細胞前駆細胞の走化性に及ぼす影響についての検討を行った。

### 4. 研究成果

#### 実験 1

RAW264 の生細胞数に対する未分化 MSCs との共培養の影響

RAW264 の生細胞数を表す吸光度は、MSCs との共培養により、単独培養時と比較して、3、5、7 日目において有意に高い値を示した (図 1)。

未分化 MSCs と RAW264 の共培養における破骨細胞分化関連遺伝子発現の経時的変

化

未分化 MSCs と RAW264 との共培養時における RANKL、MCSF および VEGF 遺伝子の経時的発現には、有意な変化は認められなかった。一方、OPG 遺伝子発現は 4 日目と比較して 6、8、10 日目において有意な低下が認められた (図 2)。

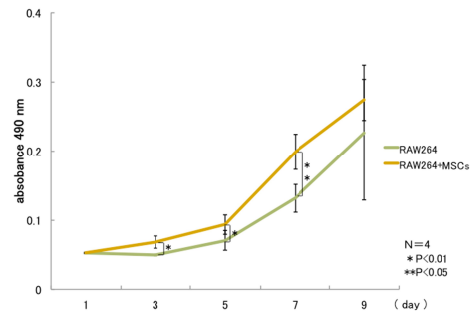


図 1 RAW264 の生細胞数に対する未分化 MSCs との共培養の影響 (MTS assay)

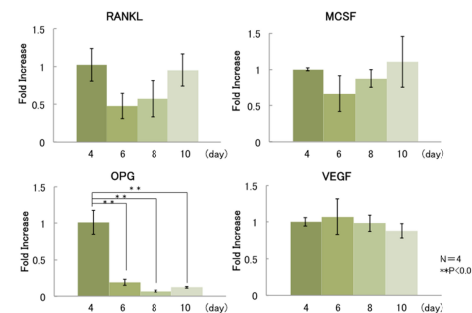


図 2 未分化 MSCs と RAW264 の共培養における破骨細胞分化関連遺伝子発現の経時的変化

#### 実験 2

未分化 MSCs の CCL2 発現に対する RAW264 細胞との共培養の影響

MSCs における CCL2 遺伝子発現は、RAW264 との間接共培養により MSCs 単独培養群と比較して有意に高い値を示した (図 3)

RAW264 の走化性に対する未分化 MSCs との共培養の影響

RAW264 走化細胞数は MSCs との共培養により、単独培養群と比較して、有意に増加した。また、抗 CCR2 抗体を添加すると、RAW264 走化細胞数は共培養群と比較して、有意に減少した (図 4)。

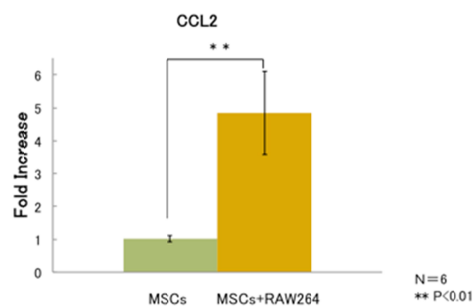


図 3 未分化 MSCs の CCL2 発現に対する

## RAW264 細胞との共培養の影響

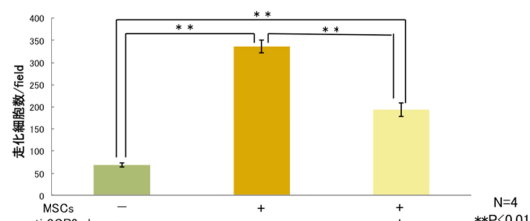


図 4 RAW264 の走化性に対する CCL2 を介した未分化 MSCs との共培養の影響

### 実験 3

マウス頭蓋骨欠損部への未分化 MSCs 移植部への RAW264 の集積

MSCs 非移植群においては、移植 1 日後より骨欠損部および背部中央の集積を認めた。MSCs 移植群においては、骨欠損部および頸部から背部上方にかけての広範囲な集積が認められた。一方、MSCs 移植群では、頭蓋骨欠損部への顕著な集積が認められた。

骨欠損部における蛍光強度を三群間で比較したところ、MSCs 移植群では、control 群、MSCs 非移植群と比較して、頭蓋部における蛍光強度は RAW264 移植後 1、3、5、7 日目において有意に高い値が認められた。また、MSCs 移植群における頭蓋部の蛍光強度は、MSCs 非移植群と比較して 3、5、7 日目において有意に高い値が認められた (図 5、6)。

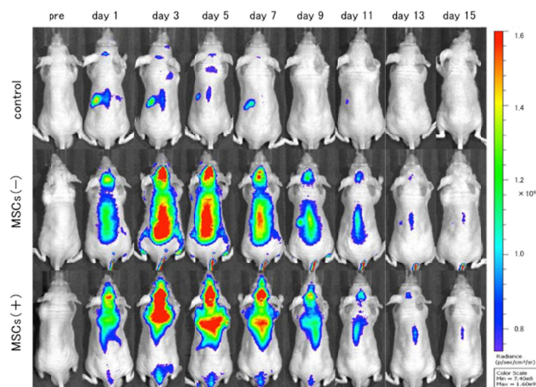


図 5 移植 RAW264 細胞の動態の観察

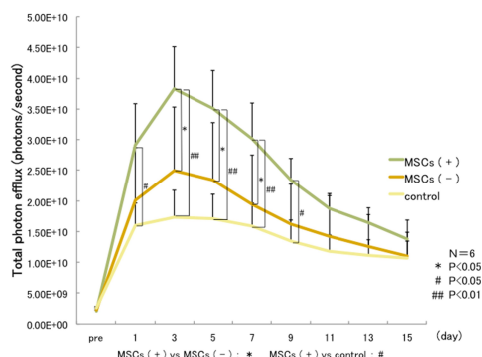


図 6 RAW264 の頭蓋部における蛍光強度

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 阿部崇晴

The effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on osteoclast precursor for bone regeneration of alveolar cleft

第 49 回 広島大学歯学会総会 (広島) 2016 年 7 月 2 日

(2) Takaharu Abe Keisuke Sumi Kotaro Tanimoto

The effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on osteoclast precursor for bone regeneration of alveolar cleft.

2015 Asian Pacific Orthodontic Society APOS Resident Forum. Dec 4-6, 2015 Taichung, Taiwan

(3) 阿部崇晴 鷲見圭輔 沖奈苗 杉山勝 谷本幸太郎

顎裂部骨再生における骨髄由来間葉系幹細胞による破骨前駆細胞への影響

第 39 回日本口蓋裂学会 (東京) 2015 年 5 月 21~22 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷲見 圭輔 (Sumi Keisuke)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：00707078

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )