

令和元年6月4日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11605

研究課題名(和文) 生体内で確実に骨増生効果を示す顎骨MSCを識別し得る特異的マーカーの探索

研究課題名(英文) Search for new specific molecular markers that can predict bone regenerative ability of mandible bone marrow stem cells.

研究代表者

鎌下 祐次 (Kamashita, Yuji)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90224641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨骨髓中に存在する間葉系幹細胞(MBMSC)は顎骨の増生のための有望なセルソースであるが、MBMSCの骨増生能にはバラつきが大きい。現時点で骨増生能を判定する有効なマーカーがないため、本研究では骨増生能を予見し得る新規マーカーの探索を目的とした。5名のドナーより分離されたMBMSCを用いて骨増生能を評価した結果、高骨分化能の3株、低骨分化能の2株に分けることができた。次に、それぞれの群間で発現するmiRNA発現パターン解析を行った結果、高骨分化能のMBMSCで4倍以上の変化を有する因子を合わせるとそれぞれ40因子程度同定された。これらの因子が新規の骨分化予見マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎堤が高度に萎縮した患者に対し、適切な補綴治療を行うためには萎縮した骨を増生させる必要がある。高度萎縮顎堤を呈する患者に対して、MBMSC移植による顎骨増生治療は国内外でも報告がなく、成功すれば世界初の治療法となり得る。しかし骨形成治療の有効性担保に向けて細胞移植前に骨形成能を事前に評価し得る技術は確立されていない。本研究結果によって見いだされたmiRNAがMBMSCの骨形成能を事前に予知し得るマーカーとなれば、これらを指標とした新規の細胞品質管理技術の開発につながり、MBMSCによる再生治療の臨床応用に大きく寄与するもの示唆される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) present in the bone marrow of the mandibular bone are promising cell sources for cell therapy. Because mandibular bone marrow MSCs (MBMSCs) is heterogeneous population, the bone regenerative effects of the MBMSC is highly variable. Since there is no effective marker for determining osteogenic ability of MBMSCs, we aimed to search for new specific molecular markers that can predict bone regenerative ability. In this study, we used MBMSCs isolated from 5 patients. As a result of evaluating osteogenic potential in vitro, it could be divided into three strains of high osteogenic differentiation ability and two strains of low osteogenic differentiation ability. We compared the miRNA expression in MBMSCs with high osteogenic and low osteogenic ability. It has been confirmed that about 40 miRNA were highly expressed in MBMSCs with high osteogenic potential. It has been suggested that these miRNAs may be novel markers of osteogenic differentiation prediction.

研究分野：補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 骨再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢者における歯の喪失の原因の大半は歯周疾患による顎骨吸収である。歯の欠損部位はインプラントを含めた義歯によって補綴されるが、吸収した顎骨でそれらを安定させることは極めて困難である。現在、顎骨の造成を図るために自家骨移植が行われているが、採取できる骨量にも限りがあり、採骨部に知覚麻痺が残るなどの副作用が残るなど問題点も多い。

顎骨の骨量が不足した患者への治療法として、近年では骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell:MSC) と人工骨等のスキャフォールドを組み合わせた再生医療の研究が注目されている。これまで顎骨再生に用いられる細胞ソースには主に腸骨骨髄由来 MSC (iliac bone marrow MSC:IBMSC) が用いられてきた。しかし、腸骨からの細胞採取は侵襲性が高いことや、特定の専門医に採取を依頼する必要があるなどの欠点がある。

我々の先行研究により、顎骨骨髄中に存在する MSC (mandible bone marrow MSC:MBMSC) は IBMSC と同等かそれ以上の骨分化能を有することを報告し、MBMSC の有用性に以前より注目してきた。しかしこれまで、顎骨からの骨髄液の採取は非常に困難であったため、MBMSC を用いた研究を安定的に行うことが難しかった。我々はこの問題点をクリアすべく、顎骨から骨髄液を採取するための小型の穿刺針 (バイオプシーニードル) の開発に成功し、この穿刺針を用いて顎骨から低侵襲に安定的に骨髄液を採取することに成功した。MBMSC を安定的に分離・培養することが可能となり、個体ごとの骨分化能を *in vitro* で評価を行うと、各ロット間で骨分化能が大きく異なることが判明した。MBMSC は非常にヘテロな細胞集団であり、MBMSC を用いた顎骨再生医療を成功させるためには、細胞移植前に生体内での骨形成能のポテンシャルを予測することが重要である。我々はこれまでに MBMSC 特異的マーカーの探索を目的に、様々な細胞表面抗原の検証や、骨分化誘導時に変化する遺伝子の探索を行ってきたが、現時点で生体内での骨形成のポテンシャルを正確に判定するマーカーの同定には至っていない。

2. 研究の目的

microRNA (miRNA) は様々な細胞の分化や増殖、アポトーシスなどの調節に強く関与するといわれており、近年非常に注目されている分子である。今回我々は MBMSC に発現する miRNA に着目し、miRNA の発現解析をすることによって、生体内で確実に骨増生効果を示す顎骨 MSC を識別し得るか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認 (承認番号: 170263 疫) を得て、患者の同意のもと、骨髄液を採取し、採取された骨髄液を培養皿に播種し、MBMSC の培養を行った (5 株)。増殖した MBMSC において、フローサイトメトリーによって MSC の細胞表面抗原発現比較を行った。5 株の MBMSC の骨分化誘導を行い、分化誘導 7 日目にアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性定量、分化誘導 14 日目にアリザリンレッド染色によって石灰化の評価を行った。骨分化能の程度に差の認められた 3 株において、骨分化制御転写因子 (RUNX2, Osterix, Dlx5, MSX2)、自己複製能と未分化状態の維持に関わる転写因子 (Oct-4, SOX2, Nanog) および、神経堤細胞マーカー (SOX10, p75NTR, FOXD3) 遺伝子発現をリアルタイム PCR によって評価した。5 株の MBMSC に発現している miRNA は 3D-Gene miRNA Oligo Chip (TORAY) を用いて評価を行った。

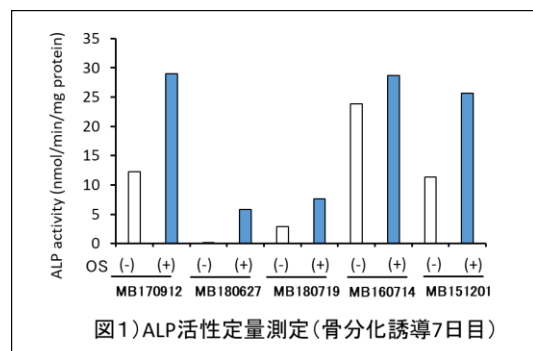
4. 研究成果

5 名の患者より採取された MBMSC はすべて培養に成功し、増殖能はいずれも同程度であった。次に得られた 5 株の MBMSC において、フローサイトメトリーにて細胞表面抗原発現比較を行った。いずれの MBMSC においても、MSC の陽性マーカーである CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-ABC の発現が確認され、陰性マーカーである CD11, CD34, CD45, HLA-DR の発現が無いことが確認された。唯一、CD105 の発現に細胞間で発現にバラツキが認められた。

次に 5 株の MBMSC に対して骨分化誘導をおこなった。骨分化誘導 7 日目におけるアルカリフォスファターゼ活性定量をおこなった結果、2 株 (MB180627, MB180719) においては ALP 活性が低値であった (図 1)。

さらに、分化誘導 14 日目にアリザリンレッド染色によって、石灰化能の評価をおこなった (図 2)。各細胞間で石灰化能にバラツキがあり、上記の ALP 活性定量の結果と一致し、2 株 (MB180627, MB180719) においてはほとんど石灰化が認められなかった。

次に、骨分化能を事前に予測し得るマーカー分子の探索を目的とし、上記の実験により骨分化能に差の認められた 3 株 (MB170912, MB180627, MB180719) において、骨分化制御転写因子 (RUNX2, Osterix, Dlx5, MSX2) 発現比較を行った (図 3)。3 株の



未分化 MBMSC において、骨分化制御転写因子の発現パターンと骨分化の程度が必ずしも一致しないことが明らかとなった。以上の結果から、上記 4 遺伝子発現を調べるだけでは、MBMSC の骨分化能を予知することができないことが判明した。

2 株 (MB180627, MB180719) の低骨分化能の原因として、幹細胞性の低下があるのではと考え、幹細胞性維持に関する因子 (Oct-4, SOX2, Nanog) について評価を行ったが、骨分化能の高かった 1 株 (MB170912) と低骨分化能の 2 株 (MB180627, MB180719) において顕著な差は認められなかった (図 4)。

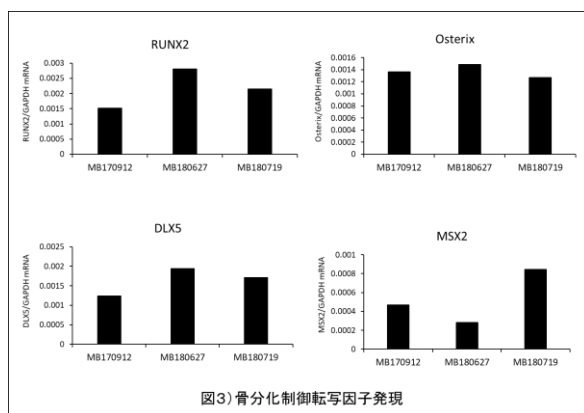


図3) 骨分化制御転写因子発現

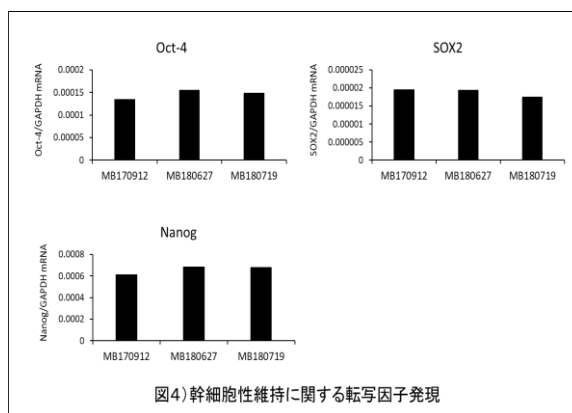


図4) 幹細胞性維持に関する転写因子発現

MBMSC は神経堤由来細胞であり、腸骨骨髓由来 MSC (IBMSC) は中胚葉由来の細胞であると言われている。MBMSC の特徴をさらに評価するため、3 株の MBMSC と 3 株の IBMSC (BM603525, BM654251, BM413042) において、神経堤細胞マーカー (SOX10, p75NTR, FOXD3) 発現比較を行った (図 5) が、いずれもマーカー遺伝子においても MBMSC と IBMSC において差は認められなかった。

上記の項目の検討により、MBMSC の骨分化能を判定するマーカーの同定には至らなかったため、次に細胞の分化や増殖の調節に深く関与することが知られている microRNA (miRNA) に着目し、高骨分化 MBMSC 群または低骨分化 MBMSC 群において特徴的な発現パターンを示す miRNA の探索を行った (図 6)。網羅的解析の結果、高骨分化群において 8 倍以上高発現する miRNA が 6 個、4 倍以上高発現する miRNA が 30 個あることが判明した。また、低骨分化 MBMSC 群において 8 倍以上高発現する miRNA が 6 個、4 倍以上高発現する miRNA が 28 個あることも明らかとなった。現在、上記の miRNA と MBMSC の骨分化との関連性を解析中であるが、今回見いだされた miRNA において、MSC の骨分化に関与することが報告されている miRNA はなく、いずれの因子においても骨分化との関連が明らかにされた場合は、新規の骨分化予見マーカーとなることが示唆される。本研究成果によって見いだされた miRNA が MBMSC の骨形成能を事前に予知し得るマーカーとなれば、これらを指標とした新規の細胞品質管理技術の開発につながり、MBMSC による再生治療の臨床応用に大きく寄与するもの示唆される。

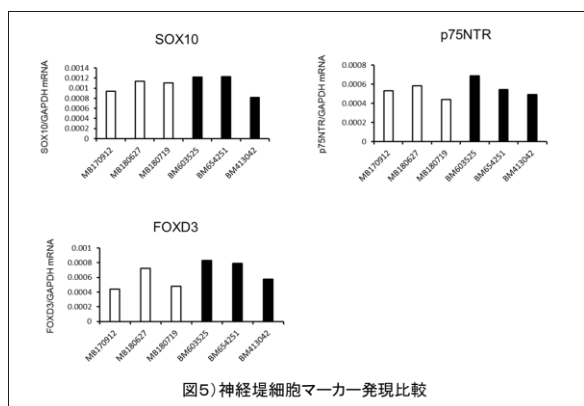


図5) 神経堤細胞マーカー発現比較

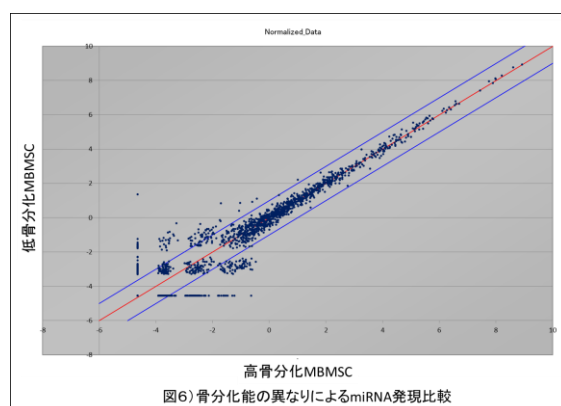


図6) 骨分化能の異なるによるmiRNA発現比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ① Ishii M, Takahashi M, Murakami J, Yanagisawa T, Nishimura M. Vascular Endothelial Growth Factor-C Promotes Human Mesenchymal Stem Cell Migration via an ERK-and FAK-dependent Mechanism. *Mol Cell Biochem.* 2018; 455(1-2):185-193. doi: 10.1007/s11010-018-3481-y. (査読あり)
- ② Shimizu Y, Polavarapu R, Eskla KL, Pantner Y, Nicholson CK, Ishii M, Brunnhoelzl D, Mauria R, Husain A, Naqvi N, Murohara T, Calvert JW. Impact of Lymphangiogenesis on Cardiac Remodeling After Ischemia and Reperfusion Injury. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7:e009565. doi: 10.1161/JAHA.118.009565. (査読あり)
- ③ Ishii M, Nakahara T, Araho D, Murakami J, Nishimura M. Glycolipids from spinach suppress LPS-induced vascular inflammation through eNOS and NF- κ B signaling. *Biomed Pharmacother.* 2017;91:111-120. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.052. (査読あり)
- ④ Suehiro F, Ishii M, Asahina I, Murata H, Nishimura M. Low-serum culture with novel medium promotes maxillary/mandibular bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation ability. *Clin Oral Investig.* 2017;21:2709-2719. doi: 10.1007/s00784-017-2073-7. (査読あり)
- ⑤ Murakami J, Ishii M, Suehiro F, Ishihata K, Nakamura N, Nishimura M. Vascular Endothelial Growth Factor-C Induces Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells through the ERK and RUNX2 Pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;484(3):710-718. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.001. (査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① 柳澤嵩大、石井正和、高橋まなみ、村上寿理、西村正宏、VEGF-Cによる骨髄間葉系幹細胞の遊走促進効果、第18回日本再生医療学会総会、2019年
- ② 駒走尚大、末廣史雄、石井正和、柳澤嵩大、原田佳枝、西村正宏、顎骨骨髄由来間質細胞の骨形成能判定のためのマーカー探索、第18回日本再生医療学会総会、2019年
- ③ 末廣史雄、益崎与泰、田中謙光、駒走尚大、西村正宏、顎堤増生を目的とした顎骨骨髄由来間質細胞の採取成績、第36回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会、2019年
- ④ 新屋俊明、西 恭宏、中村康典、村上 格、原田佳枝、鎌下祐次、西村正宏、舌苔付着の主観評価と舌背細菌数の関係、日本老年歯科医学会 第29回学術大会、2018年
- ⑤ 益崎与泰、末廣史雄、西村正宏、3次元連通気孔を有するスタチン含有炭酸アパタイトブロックの骨置換能の検討、日本口腔インプラント学会第35回九州支部学術大会、2018年
- ⑥ 西原一秀、西 恭宏、末廣史雄、益崎与泰、石畑清秀、中村典史、西村正宏、新崎 章、上顎前歯部欠損症例に対する骨造成術併用インプラント治療の検討、第47回日本口腔インプラント学会、2017年
- ⑦ 益崎与泰、石井正和、末廣史雄、西村正宏、3次元連通気孔を有する炭酸アパタイトブロックの骨新生能の検討、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016、2016年
- ⑧ 石井正和、中原達雄、池内慎吾、西村正宏、 β -amyrinによる血管新生促進効果の検討、第23回日本歯科医学会総会、2016年
- ⑨ 金田尚子、石井正和、西村正宏、老化に伴う骨組織再生能低下と血管新生との関連性、第23回日本歯科医学会総会、2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：細胞接着因子発現抑制剤

発明者：石井正和、西村正宏、中原達雄

権利者：国立大学法人鹿児島大学、丸善製薬株式会社

種類：特許

番号：特願 2016-245727

出願年：2016年

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：血管新生促進剤

発明者：石井正和、西村正宏、中原達雄、池内慎悟

権利者：国立大学法人鹿児島大学、丸善製薬株式会社

種類：特許
番号：特許第 6469518 号
取得年：2019 年
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/prostho2/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西村 正宏
ローマ字氏名：(NISHIMURA, Masahiro)
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学域歯学系
職名：教授
研究者番号 (8 桁)：00294570

研究分担者氏名：石井 正和
ローマ字氏名：(ISHII, Masakazu)
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学域歯学系
職名：助教
研究者番号 (8 桁)：00456683

(2) 研究協力者

研究協力者なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。