

令和元年9月9日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17183

研究課題名(和文) 創傷治癒における間葉系幹細胞と口腔内細菌の関連性解析

研究課題名(英文) Study of the correlation with mesenchymal stem cells and oral bacteria in wound healing

研究代表者

下田平 直大 (Shimotahira, Naohiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20710007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、間葉系幹細胞(MSC: Mesenchymal stem cell)の硬組織・軟組織再生への免疫応答を介した口腔内細菌の影響を解明することである。そのため、一般的に良く実験に用いられている骨髄由来間葉系幹細胞ではなく、口腔組織由来の幹細胞である顎骨由来MSCをマウスから採取して実験を行うことにした。顎骨・骨髄・脂肪由来を採取してin vitro実験での結果が得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎骨由来MSCについては、脂肪組織や骨髄由来MSCと比較して、行われた研究自体少なく、どのような特徴を持っているかという知見に乏しい。特に、今後歯科医サイドからの再生医療という立場で考えると、高齢者における顎骨由来MSCを用いた再生医療を考えるにあたって、術後の創傷治癒と細菌感染に関する知見を深めるという点において重要である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the influence of oral bacteria through the immune response of MSC (Mesenchymal stem cell) to hard and soft tissue regeneration. Therefore, instead of bone marrow-derived mesenchymal stem cells that are commonly used for experiments, we decided to conduct experiments by collecting jawbone-derived MSCs, which are stem cells derived from oral tissues, from mice. We succeeded to obtain MSC from jaw bone, bone marrow, and fat tissues, and valuable results were obtained from in vitro experiments.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：創傷治癒 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨再生を目的とした再生療法には、いくつかの幹細胞を利用したとして iPS 細胞に注目が集まっているが、癌化の危険性などのリスクがあり、臨床応用への障壁となっている。一方で骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal stem cell) は安全性の高い細胞ソースの1つであり、MSC 移植による組織再生を図る研究が報告されている。特に最近、歯科医でも簡便な方法で顎骨骨髄から MSC が入手できることがわかり、注目を集めている。MSC は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等様々な細胞へ分化する。さらに最近、MSC はパラクラインとって、MSC 自体がサイトカインを放出して近傍細胞へ影響を与えることにより、骨再生や創傷治癒過程を調節していることがわかった (Catherine L Ward et al. BMC Microbiol 2015)。MSC の分泌するサイトカインには炎症性サイトカインや塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2)、stromal derived factor 1 (SDF-1)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、血小板由来成長因子 (PDGF) がある。加えて、MSC は抗菌ペプチドである LL-37 を産生することが報告されている。これらのことから、MSC が炎症反応や組織再生を通して術後の創傷治癒に関与していることが考えられる。また、口腔内には 500 種に及ぶ細菌が存在しており、口腔内の手術後の創傷治癒において口腔内細菌と MSC の免疫応答が影響を与える可能性がある。

特に顎骨骨髄由来 MSC に関しては、基礎的な研究があまり行われておらず、あるとしても幹細胞性についての研究が主であり、口腔内の創傷治癒に関する知見はなかった。その点に着目した研究代表者は本研究を計画して行うことにした。

2. 研究の目的

顎堤の保存やインプラント周囲の骨造成を目的として、再生療法が応用され、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を使用した細胞再生療法は良好な結果が報告されている。また、口腔内に存在している口腔内細菌は歯周病やインプラント周囲炎に関与している。しかしながら、細胞再生療法時における細菌抗原に対する MSC の免疫応答が、創傷治癒に及ぼす影響については解明されていない。MSC を骨分化誘導時にどのような変化があるかは不明である点に着目し、研究代表者は本研究を始めることにした。本研究は、顎骨由来 MSC の硬組織・軟組織再生への免疫応答を介した口腔内細菌の影響を解明することが目的である。

3. 研究の方法

10 週齢 (若年)・80 週齢 (老年) の雄性マウスから顎骨を採取し Yamaza et al., 2011 の方法に準じた方法にて間葉系幹細胞を採取した。同様に長管骨骨髄と脂肪組織からも細胞を採取した。将来的な免疫応答に関する実験を行う前に、得られた細胞に対して石灰化・脂肪分化誘導刺激を与えて、分化能があるか調べた。

4. 研究成果

顎骨、長管骨骨髄、脂肪組織からの間葉系幹細胞様の細胞の採取に成功した。顎骨からの細胞採取時の顕微鏡像 (図 1)、脂肪組織由来細胞の顕微鏡像 (図 2) を示す。顎骨由来細胞に 2 週間、専用培地を用いて石灰化誘導後、アリザリンレッドを用いて石灰化部を染色して調べたところ、若齢・老齢マウス由来細胞ともに石灰化が認められ、特に老齢マウスにおいて強い石灰化が認められた (図 3)。さらに脂肪組織由来細胞については、脂肪組織分化を調べたところ

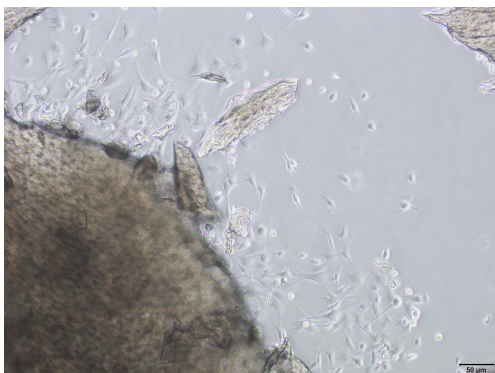


図 1 : 顎骨組織由来細胞の顕微鏡写真像。若齢・老齢雄性マウスより Yamaza et al., 2011 の方法に従い、細胞を調整した。

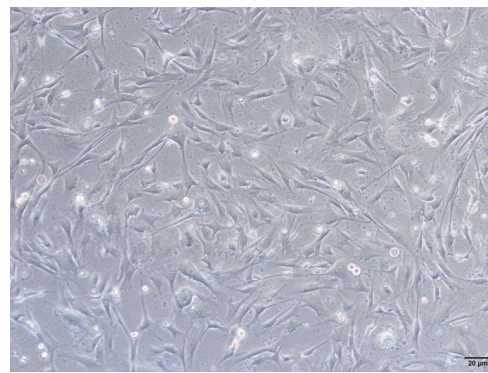


図 2 : 脂肪由来細胞の顕微鏡像。

る、2週間の分化誘導後にオイルレッド染色にて染色可能な脂肪滴を持つ脂肪細胞への分化が確認できた(図4)。さらに骨髄・顎骨由来細胞からの脂肪分化についても同様に確認ができ、幹細胞性が示唆された。

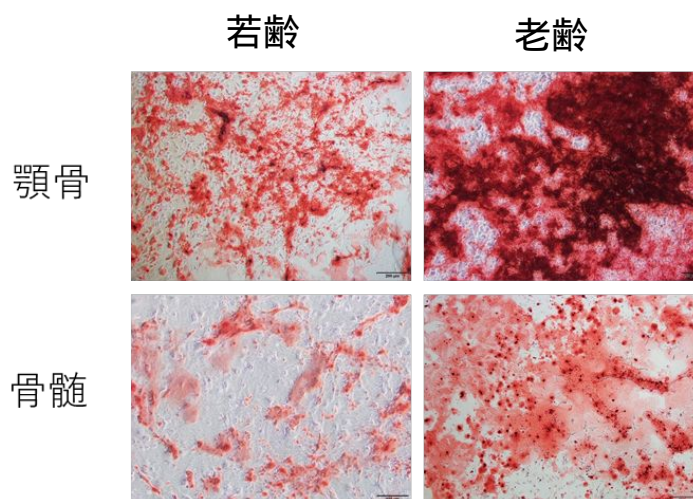


図3：顎骨組織由来細胞の石灰化誘導の結果。顎骨・骨髄由来細胞ともにアリザリンレッドによる染色部位が認められたが、特に老年の顎骨で強く認められた傾向であった。

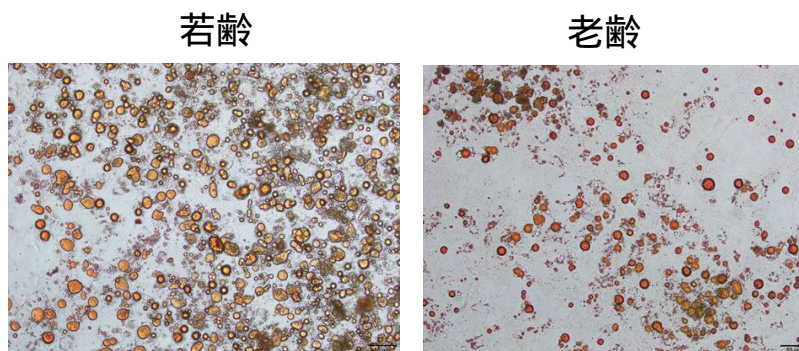


図4：脂肪組織由来細胞の脂肪分化の結果。オイルレッド染色された脂肪滴が観察できた。老齢マウス由来細胞は、若年個体由来よりも脂肪分化は弱い傾向であった。

顎骨由来細胞では、老齢個体由来細胞の方が若齢由来よりも骨分化能が強い傾向が認められ、一方、脂肪組織由来細胞では、老齢個体由来細胞の方が若年由来よりも脂肪分化能が弱い傾向が認められた。小型動物であるマウスでは、1個体より得られる細胞数が少ないと予想されたが、今回の研究にて十分な細胞を得ることができたことがわかった。これらの結果を踏まえ、今後は顎骨由来細胞免疫応答について解析を行っていく。

顎骨由来間葉系幹細胞は、人への臨床応用を考えた際に、腸骨骨髄等よりも簡便でドナーへの侵襲が少なく入手できるなどの利点が認められる。しかしその一方、未だ知見に乏しい点もあるため、今後その性質を十分に理解しながら研究を進めていく。特に、高齢実験動物の顎骨からのMSC採取し実験を行った研究は極めて珍しく、今後、新しい知見が得られて臨床応用を行う上で重要な知見が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/admission/overview/about/organization/prosth2.html>

6 . 研究組織

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。