

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791504
 研究課題名（和文） 幹細胞を用いた骨再生医療におけるWntシグナルの影響に関する研究
 研究課題名（英文） Effects of Wnt signaling on the regenerative medicine of bone using stem cells
 研究代表者
 片桐 渉(Wataru Katagiri)
 名古屋大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：10437030

研究成果の概要：

本研究では未分化間葉系幹細胞(MSCs)の培養過程において、幹細胞の増殖・分化において中心的な役割を果たしているWntシグナルを制御することにより、短期間でMSCsを増殖させかつ早期に骨分化を誘導することを目的とし、増殖能を低濃度塩化リチウム、骨分化能をsFRP-3で亢進できることを示した。また乳歯歯髓由来の幹細胞が高い増殖能をもち、これがWntシグナルによって制御されている可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生医療、幹細胞、Wntシグナル、歯髓幹細胞、乳歯歯髓幹細胞、再生医学、歯学、MSC

1. 研究開始当初の背景

これまで、歯周病や外傷、または腫瘍切除等で失った骨を回復する手段としては自家骨移植がゴールドスタンダードであるとされてきた。現在もこの考えに大きな変更はない。

しかしながら骨移植にはドナーサイトの手術が必要になる場合があり、患者への侵襲や負担は決して小さいものではない。このよう

な背景で代替材料として様々な人工材料やあるいは他家骨などが市場に多く流通するようになってきた。しかしながら臨床応用を考えた際、こういった材料は様々な問題を含んでいることも見逃せない。たとえば感染の問題や異物反応の問題等が挙げられる。

このような背景により、低侵襲でかつ効果的な新しい骨再生医療の開発が期待されている。

る。こういった中、未分化間葉系幹細胞(MSC)を用いた骨再生医療はすでに実用化の段階に入っており、われわれの施設でもこれまでにその有用性を報告してきた。

一方、細胞培養に一定の時間が必要であることや、培養などに相当のコストがかかることは患者の負担という意味では改善すべき点である。

さらに BMP-2 や FGF-2 といった増殖因子を使用した骨再生医療も報告されているが、増殖因子を使用した場合、過形成が起こったり、再生される骨量が十分でないなどの欠点もある。

本研究では増殖因子を用いることなく、MSCs の増殖や骨分化を効率的に行うため、細胞増殖・分化への関与が明らかにされつつある Wnt シグナルに着目した。

2. 研究の目的

近年、未分化間葉系幹細胞(MSC)の増殖および骨分化の過程において、Wnt/ β -カテニン経路による制御が関連していることが明らかになってきた。また、Wnt が作用するとヒト MSC では増殖が促進され、骨分化が阻害されること、そして Wnt が作用しない場合、骨分化が促進され増殖は抑制される(図 1 A)。つまり、Wnt が作用するとヒト MSC では増殖が促進され、骨分化が阻害されることが知られている(図 1 B)。

そこで、われわれは MSC の臨床応用における培養過程において、この Wnt シグナルを調節することにより効率的かつ効果的に骨分化誘導を行い、骨再生医療における更なる治療期間の短縮や効果的な骨造成を行うことを目的に検討を行った。

さらに骨髄由来 MSC だけでなく、近年その高い増殖能が注目されている歯髄幹細胞、あるいは乳歯歯髄由来幹細胞について、その有用性について Wnt シグナルの面から検討を行った。

本研究ではこれらの検討によって増殖因子等を使うことなくいかに効率的に細胞培養を行うことができるか、またその細胞源としてどのような細胞が有用であるかを検討し、臨床上新たな、そして医療者にとっても患者にとっても効果的な骨再生医療の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1)ヒト MSC の増殖能に対する検討

ヒト MSC は Cambrex 社より購入した。MSC の増殖過程において β -カテニンのリン酸化を阻害し、その結果 Wnt/ β -カテニン経路を賦活する塩化リチウムを各濃度に希釈し

て培養液に添加した。細胞増殖能を細胞数および BrdU ラベリング法にて検討した。

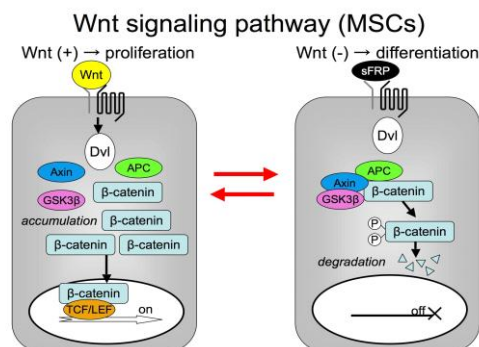


図 1 MSC の増殖・分化と Wnt シグナル

(2)ヒト MSC の骨分化能に対する検討

骨分化過程において Wnt レセプターである Frizzled を Wnt と競合的に阻害し、Wnt/ β -カテニン経路を負に制御する sFRP-3 を分化誘導培地に添加した効果について、Alizalin Red 染色にて石灰化を、RT-PCR 法により骨形成関連遺伝子の発現を分化誘導後 7、14 日に評価した。

(3) 歯髄由来幹細胞の有用性に関する検討

骨髄由来以外の細胞源として歯髄や乳歯由来歯髄を用いその有用性について、細胞増殖の面より検討した。また Wnt シグナルとの関連について β -カテニンの免疫染色を行い、細胞内での局在を検討した。

4. 研究成果

(1)ヒト MSC の増殖能に対する検討

MSC の増殖過程において塩化リチウム 4mM 添加群で非添加群に比べ、増殖曲線における細胞数の増加および BrdU 陽性細胞数の有意な増加を認めた(図)。またデータは示さないが塩化リチウムの添加は MSC における核への β -カテニンの集積を増強した。これはリチウムイオン添加により Wnt シグナルが賦活されたことを意味した。しかしながら 20mM、40mM の濃度の塩化リチウムは増殖を逆に抑制し細胞形態の変化を認めた。

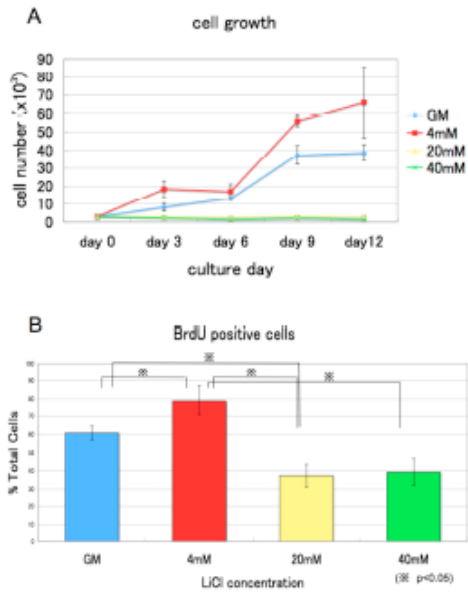


図2 MSCの細胞増殖能

(2)ヒトMSCの骨分化能に対する検討

ヒトMSCの骨分化過程においてはsFRP-3添加群では分化誘導開始後7日目より非添加群に比較し、Alizalin Redに対する染色性を認め、分化誘導開始14日目ではさらに染色性が増強した。RT-PCRによるとアルカリフォスファターゼ(ALP)やRunx2などの骨形成関連遺伝子の発現増強を認めた。

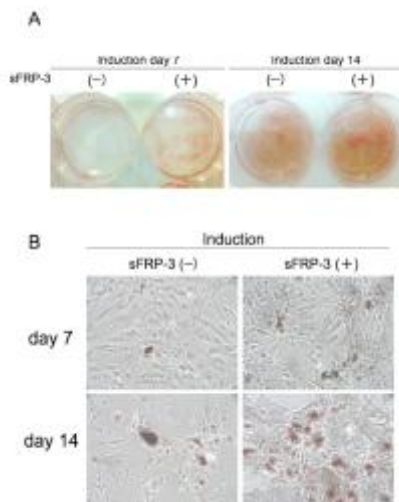


図3 MSCの骨分化でのsFRP-3の効果

さらにsFRP-3の発現が通常、sFRP-3非添加群では14日目より発現するのに対し、添加

群では7日目においてすでに発現していたことより、sFRP-3添加は本来の骨分化の過程で発現しているもの骨分化の初期には発現しておらず、sFRP-3添加によりその発現を早期に誘導したと考えられた。

(3)歯髄由来幹細胞の有用性に関する検討

乳歯歯髄由来幹細胞(MTSCs)はMSCs、歯髄由来幹細胞(DPSCs)に比べBrdU陽性細胞が多く認められた。さらに免疫染色ではβ-カテニンの細胞質および核への移行が強くみられた。このことは乳歯歯髄由来の幹細胞の保持する高い細胞増殖能がWntシグナルと関連することを示唆する結果となった。

以上の結果より本研究において以下のことが明らかとなった。

1. MSC培養において、培地への低濃度の塩化リチウムの添加はβ-カテニンを核へ移行させ、結果として細胞増殖能を亢進させた。
2. MSCの骨分化誘導においてWntシグナルを阻害する因子であるsFRP-3を添加して培養することにより早期の骨分化が誘導できた。
3. 再生医療において新たな細胞源としてこれまで医療廃棄物として破棄されてきた乳歯歯髄由来の幹細胞の有用性が示唆された。かつ、乳歯歯髄由来幹細胞の高い増殖能がWntシグナルに関連するものである可能性が示唆された。

Wntシグナル伝達経路は本来細胞が備えもつ重要な機構の一つである。しかしながらこれまでの細胞を用いた治療においては残念ながらWntシグナルの作用は考慮されてこなかった。本研究はこのWntシグナルを制御することによりより細胞を用いた骨再生医療を効率的に行うことを目的とし、本研究ではこれらに対し一定の成果を得たものと思われる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 片桐 渉、同一患者より得た埋伏歯、乳歯歯髄由来幹細胞の細胞特性の比較、第 53 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 20 年 10 月 22 日、徳島県徳島市

2. 片桐 渉、Wnt シグナルトランスミクションによる骨再生医療効率化に関する研究、第 62 回日本口腔科学会学術大会、平成 20 年 4 月 18 日、福岡県福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片桐 渉 (Wataru Katagiri)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10437030