

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10251

研究課題名（和文）高齢ドナー由来間葉系幹細胞を用いた骨増生時における細菌由来因子影響の解析研究

研究課題名（英文）Analysis of the Effects of Bacterial Factors on Bone Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells Derived from Elderly Donors

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：補綴治療において、長期間経過後の患者は骨吸収が進行し、治療が困難になることがある。特に、顎骨から採取される間葉系幹細胞（MSC）は容易に採取でき、患者の負担も少ないため、臨床応用の研究が進行中である。一方、高齢者では老化細胞の蓄積が見られ、顎骨MSCも老化の影響を受ける可能性がある。本研究では、若年および高齢のC57BL/6J雄性マウスから採取した顎骨MSCと長管骨MSCの増殖能力、老化細胞陽性率、骨分化と脂肪分化の能力、SASP因子発現を比較した。結果、高齢MSCには老化細胞を多く含み、分化能力が低下し、SASP因子に関しても亢進していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究の社会的意義は、高齢患者の補綴治療の効果向上に寄与する点にある。高齢者は補綴治療の主要な対象であり、老化に伴う骨吸収や細胞機能低下が治療の成功に影響を与える。この研究により、高齢者の顎骨MSCの特性が明らかになれば、より効果的な治療法の開発が可能となり、高齢患者のQOL（生活の質）向上が期待される。また、老化細胞の影響を考慮した再生医療の進展も見込まれ、社会全体の医療水準向上に繋がる重要な知見を提供する。さらに、高齢化社会における医療費の削減にも寄与し、持続可能な医療システムの構築に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In prosthetic treatments, patients may experience progressive bone resorption over time, making treatment challenging. Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the mandibular or maxillary bone are particularly advantageous as they are easy to harvest and minimally invasive, thereby reducing patient burden. Clinical researches on their application are ongoing. However, in elderly patients, the accumulation of senescent cells is observed, and their MSCs may also be affected by aging. This study compared the proliferative capacity, senescent cell positive rate, osteogenic and adipogenic differentiation abilities, and SASP factor expression of mandibular MSCs and tubular bone MSCs obtained from young and aged male C57BL/6J mice. The results suggested that aged MSCs contained a higher number of senescent cells, exhibited reduced differentiation abilities, and had increased SASP factor expression.

研究分野：歯科補綴学分野

キーワード：間葉系幹細胞 細菌 高齢者

## 1. 研究開始当初の背景

補綴治療、義歯やインプラントによる治療では、残存する顎骨の量が治療の難易度や患者の満足度に大きく関与する。特に歯を喪失し長期間経過した患者では骨吸収量が多く、補綴治療が困難な症例に対し、顎骨再生医療による補綴治療の易化が期待されている。間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cells) は骨再生において優良な再生医療における細胞ソースである。その中で顎骨中に存在する MSC は歯科医師が容易にアプローチ可能で、内在性賦活化や移植を含めた骨再生の研究が進められている。しかし、MSC の臨床応用実現のためには改善すべき問題点もあり、例えば高齢者由来 MSC では、分化能低下や細胞増殖の減退がある。今の日本では、移植後の拒絶反応・感染症の面から他人からの他家移植は受け入れられにくく、免疫反応や感染等の危険性が少ない自己細胞のニーズが高いため、自らから採取された幹細胞を利用する価値も高い。

一方、補綴治療の対象者の多くを占める高齢者では、その全身で老化細胞が蓄積していると考えられている。よって高齢者顎骨由来 MSC (顎骨 OMSC) は、若年者由来 MSC (顎骨 YMSC) と比べると老化による何らかの変化が生じている可能性があるが、その詳細は未だわかっていない。さらに、老化幹細胞からは、様々な分泌タンパク質 (炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素などのプロテアーゼ類、増殖因子など) が産生される SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる現象が生じる。SASP 因子はバラクライン的に周囲の細胞に作用し、細胞老化を誘導したり、またオートクライン的な作用で自らの細胞老化をより亢進させる。よって、OMSC も YMSC よりも老化細胞が多く含まれ、老化細胞から SASP が惹起され、MSC の組織分化へ影響を及ぼしていると考えられるが、顎骨 MSC においてはその詳細も不明である。

## 2. 研究の目的

高齢マウス由来顎骨または長管骨由来 MSC (顎骨/長管骨 OMSC) を採取し、若齢マウス由来顎骨または長管骨 MSC (顎骨/長管骨 YMSC) を採取し、老化個体での MSC の細胞老化と SASP の関連や、個体老化と細胞老化との関係、さらにそれら細胞の組織分化の違いについて解析し、細菌感染時における影響並びに老化を抑制するための方法を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

顎骨 MSC 採取では、マウス長管骨 MSC 採取法<sup>1)</sup>の一部を改変して行った。マウス顎骨 MSC の採取：若齢 (10 週齢) と高齢 (70~80 週齢) C57BL/6J 雄性マウスから顎骨を採取し、歯牙を除いて乳鉢を用いて骨片に粉碎し、ディスパーゼ/コラゲナーゼ添加した培地で 37°C で振盪処理を 1 時間行った。処理後の溶液から骨片を除いて細胞を回収し、プレートに播種後に増殖した細胞を MSC とした。細胞採取においては、以前の研究では顎骨 MSC 採取時に一部骨片が混入し除去しきれない問題があったが、使用するフィルターを変更する等、細胞採取方法を改良し解決した。一部の実験に関しては、同マウス長管骨からも同じマウスの長管骨から同様の方法に従い MSC を採取した。

採取された MSC について、老化細胞を  $\beta$ -gal 染色にて検出し、陽性率を求めた。組織分化能測定では、細胞を骨・脂肪の分化誘導培地を用いて 2 週間もしくは 4 週間の分化誘導を行った。分化誘導後の細胞に対し、骨分化をアリザリンレッド染色、脂肪分化をオイルレッド染色を行い比較した。遺伝子発現量の定量：骨分化、脂肪分化は 2 週間の分化培養後に mRNA を回収した。リアルタイム PCR にて細胞周期 (老化)、多能性、骨分化・脂肪分化、SASP に関連する遺伝子 (マーカー) について解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 採取された細胞について

OMSC 採取後も培養を続け、細胞増殖曲線にて比較したところ、双方ともに培養後 10 数日~20 日前後で増殖速度が遅くなり、さらに培養を続けると完全に増殖が停止した。顎骨 OMSC は長管骨 OMSC と比べて増殖が速

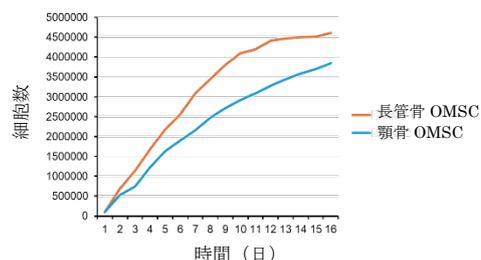


図 1: 高齢雄性マウス顎骨・長管骨由来 MSC (顎骨・長管骨 OMSC) の細胞増殖曲線 (抜粋)。

度が遅い一方、増殖停止が遅い傾向にあった（図1）。

## (2) 細胞老化解析

OMSC について $\beta$ -gal 染色を行い、老化細胞を検出して細胞中の $\beta$ -gal 陽性率を比較した。顎骨 YMSC と顎骨 OMSC 間においては、顎骨 OMSC は顎骨 YMSC より $\beta$ -gal 陽性率が高かったが、顎骨 OMSC と長管骨 OMSC で比較したところ、長管骨の方が $\beta$ -gal 陽性率が高い傾向を示した（図2）。

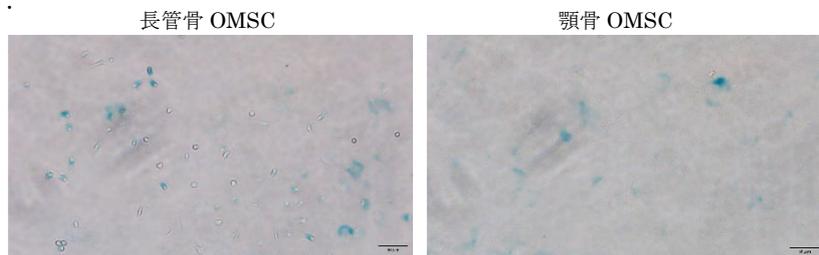


図2：高齢雄性マウス顎骨・長管骨由来 MSC（顎骨・長管骨 OMSC）の $\beta$ -gal 染色像。

## (3) FACS 解析

### ①細胞周期マーカー

顎骨 YMSC と OMSC に関し、細胞周期マーカーをリアルタイム PCR 解析を行ったところ、p21, p53, p16 ともに OMSC は YMSC よりも亢進傾向であり、老化細胞の割合が多いこと示唆された。

### ②多能性

顎骨 YMSC と OMSC に関し、多能性マーカーを解析したところ、NANOG・SOX ともに OMSC は YMSC よりも低下傾向にあり、多能性は低下していることが示唆された。

### ③骨分化・脂肪分化

分化誘導前後での骨分化誘導に関しては、OPN (Osteopontin), Osteocalcin, RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) に関しては OMSC・YMSC 共に分化刺激で亢進し、分化刺激前後を通し OMSC は YMSC よりも亢進傾向であった。一方、脂肪分化に関して関連遺伝子 PPAR- $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) の mRNA レベルは、分化誘導により OMSC は YMSC よりも亢進傾向だったが、脂肪分化刺激は逆に抑制傾向であることが分かった。

### ②SASP

顎骨 YMSC と OMSC に関しては、MPC 1, IL-1 $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6 ともに顎骨 OMSC の方が顎骨 YMSC よりも高い傾向を示し（図3）、SASP が亢進していることが示唆された。

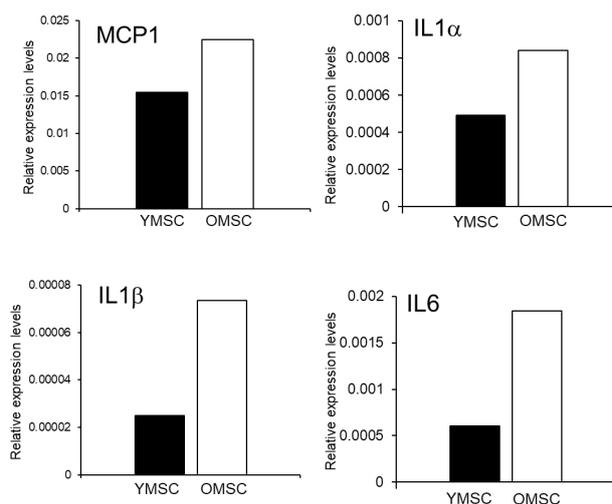


図3：顎骨 YMSC と OMSC での SASP 因子に関するリアルタイム PCR 解析。

## (2) 骨分化・脂肪分化解析

長管骨・顎骨の OMSC と YMSC に関し、骨誘導・脂肪誘導実験の結果、顎骨 MSC での YMSC と OMSC での比較では、顎骨 OMSC の方が長管骨 OMSC よりも骨分化誘導が亢進し、一方で脂肪分化誘導においては、いずれの OMSC において脂肪滴の検出は少なかったが、顎骨 OMSC ではより少ない傾向だった（図4）。

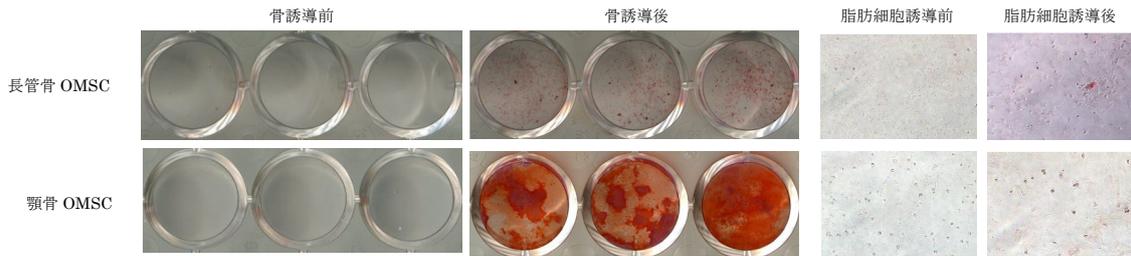


図4：顎骨 OMSC と長管骨 OMSC における分化誘導実験の結果.

以上より、顎骨 OMSC は長管骨 OMSC と同じく細胞増殖し、また老化細胞の割合は長管骨 OMSC よりも抑制傾向にあり、骨分化は優位である一方、脂肪分化刺激に対する分化は抑制されていることが分かった。さらに、長管骨 OMSC と長管骨 YMSC 間での比較においては、OMSC において SASP 因子の発現が亢進していることも分かった。顎骨 OMSC における SASP 因子が細胞老化に及ぼす影響、また細菌感染時における SASP 因子の挙動についても今後明らかにしていく。

#### 参考文献

- 1) Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- $\alpha$ . Nat Protoc. 2012; 7: 2103-2111.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Horinouchi R, Harada K, Murakami M, Yamashita Y, Kamashita Y, Shimotahira N, Hamada T, Nishi Y, Nishimura M	4. 巻 41
2. 論文標題 Properties and characteristics of foam denture cleaners as denture adhesive removers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 741-748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2022-007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Harada K, Horinouchi R, Murakami M, Yamashita Y, Yanagisawa T, Shimotahira N, Kamashita Y, Hamada T, Nishi Y, Nishimura M.	4. 巻 -
2. 論文標題 An in vitro study on the selection of surfactants for removal of cream denture adhesives from dentures and their application to denture cleaners	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2186/jpr.JPR_D_21_00286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 原田佳枝, 堀之内玲耶, 村上 格, 下田平直大, 鎌下祐次, 山下裕輔, 西 恭宏, 西村正宏	4. 巻 特別号
2. 論文標題 義歯安定剤使用者のための新しい泡タイプ義歯洗浄剤の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 歯界展望	6. 最初と最後の頁 283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami M, Nishi Y, Harada K, Masuzaki T, Minemoto Y, Yanagisawa T, Shimizu T, Tsuboi A, Hamada T, Nishimura M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of Oral Intake of Glucosylceramide Extracted from Pineapple on Xerostomia: A Double Blind Randomized Cross-over Trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu11092020	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀之内玲耶, 原田佳枝, 西村正宏
2. 発表標題 高齢マウス顎骨由来間葉系幹細胞の老化現象と骨分化への影響の解析
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田佳枝, 堀之内玲耶, 村上 格, 下田平直大, 鎌下祐次, 山下裕輔, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 義歯安定剤使用者のための新しい 泡タイプ義歯洗浄剤の開発
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田佳枝, 堀之内玲耶, 山下裕輔, 下田平直大, 村上 格, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 義歯安定剤ユーザーに向けた新規義歯洗浄剤の検討
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田佳枝, 堀之内玲耶, 村上 格, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 新規開発した義歯洗浄剤を含めた泡タイプ義歯洗浄剤の比較検討
3. 学会等名 第13回日本義歯ケア学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田佳枝, 堀之内玲耶, 神園健人, 濱坂厘杏, 下田平直大, 村上 格, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 義歯安定剤使用者に向けた新しい義歯洗浄法の開発
3. 学会等名 第12回日本義歯ケア学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上 格, 西 恭宏, 原田佳枝, 西村正宏
2. 発表標題 医療従事者における口腔保湿剤の認知度ならびに指導実態の調査
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀之内玲耶, 原田佳枝, 村上 格, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 適正範囲のHLB値をもつ界面活性剤はクリームタイプ義歯安定剤除去にて有用である
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学口腔顎顔面補綴学分野website  
<https://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/prostho2/index.htm>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西村 正宏  (Masahiro Nishimura)  (00294570)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授   (17701)	MSCを用いたin vivo実験の分担、ディスカッション
研究分担者	末廣 史雄  (Fumio Suehiro)  (40524781)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師   (17701)	MSCを用いた骨分化実験の分担
研究分担者	原田 佳枝  (Kae Harada)  (60432663)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教   (17701)	高齢マウス由来MSCの調整、MSCを用いたin vitro実験の分担
研究分担者	石井 正和  (Masakazu Ishii)  (00456683)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教   (17701)	高齢マウス由来MSCの調整、MSCを用いたin vitro実験の分担

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堀之内 玲耶  (Horinouchi Reiya)	鹿児島大学・大学院生   (17701)	マウスMSCの調整、リアルタイムPCR解析、細胞分化実験の協力
研究協力者	宮田 春香  (Miyata Haruka)	鹿児島大学・大学院生   (17701)	マウスMSCの調整、細胞増殖実験、細胞分化実験の協力

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------