

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19231

研究課題名（和文）ヒト間葉系幹細胞を利用した効率的な新規口唇口蓋裂治療戦略

研究課題名（英文）Efficient Novel Cleft Lip and Palate Treatment Strategy Using Human Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

奈良井 節（NARAI, Takashi）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：40569266

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）：本研究では、効率的にヒト間葉系幹細胞を骨分化させ顎骨欠損部位への細胞移植を行い、従来よりも低侵襲かつ確実な口唇口蓋裂治療戦略の創出を目的とした。純化した骨芽細胞は、純化していない骨分化細胞と比較して少なくとも1週間早く骨分化関連遺伝子プロファイルが確立し、運動性についても確認できた。また骨分化誘導継続によりMineralizationの増強も認められた。これらの結果により、heterogeneity（不均一性）を改善した骨芽細胞集団は骨再生に有利な条件を構築す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

ヒト間葉系幹細胞を利用した骨再生医療は以前より施行されていたが、骨分化誘導効率や治療結果の確実性が障壁となっており未だ普及しているとは言い難い状況である。本研究によりこれらの問題点の解決策の一つとして患者自身の間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導後に骨芽細胞を純化し移植する細胞治療の可能性が示された。この方法は純化した骨芽細胞集団を治療に応用することにより、骨再生に有利な条件が構築され従来の方法と比較して効率的で確実性のある骨再生法の創出が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to create a less invasive and more reliable treatment strategy for cleft lip and palate by efficiently osteogenic differentiating human mesenchymal stem cells and transplanting the cells into the jawbone defect site. The purified osteoblasts established an osteogenic differentiation gene profile at least one week earlier than the unpurified osteodifferentiated cells, and the linkage was confirmed. Continued induction of osteogenic differentiation also enhanced mineralization. These results suggest that osteoblast populations with improved heterogeneity may establish favorable conditions for bone regeneration.

研究分野：口腔顎顔面外科学

キーワード：骨芽細胞 ヒト間葉系幹細胞 口唇口蓋裂

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は400~600人に1人の割合で認める頻度の高い先天性疾患である。顎裂を合併する割合が高く、その結果、歯列不正、構音障害および審美障害が生じQOL(生活の質)の低下の原因となっている。現在、顎裂の治療は患者自身の健全な部位より骨を採取し、患部に移植する顎裂部骨移植が標準治療となっている。しかしこの方法は採骨側と移植側の2ヶ所の手術野が必要であり生体への侵襲度が課題となっている。また移植した骨の十分な再生が認められない場合もあり再手術が必要となることもある。したがって、効率的かつ再現性の高い骨再生が可能となれば、従来よりも効果的な口唇口蓋裂治療が可能となる。しかしながら、現在そのような治療法は存在しない。

ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)の骨分化能に注目が集まっている。臨床現場でも応用されつつあるが十分な成果は得られていない。原因としては、目的とする組織に分化するまでに要する期間や、分化頻度の低さのため大量のhMSCsの採取が必要となる点が挙げられる。そのため、hMSCsから骨への効率的で再現性の高い分化方法の樹立が急務である。

2. 研究の目的

ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)を直接移植し、移植先で骨分化させる細胞治療法が簡便なリソースとして期待されている。しかしhMSCの骨分化においては、生じる集団の分化度および機能的なheterogeneity(不均一さ)が骨分化効率を下げていることが示唆されている。本研究は、より高効率な骨分化誘導方法を開発するためにhMSCsから骨分化する過程において骨芽細胞を純化することでheterogeneityを改善する方法を見出す。そして、hMSCsを利用した効率的で再現性の高い新規口唇口蓋裂治療法の橋渡し研究を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 生細胞で骨芽細胞純化をモニター可能とするヒト不死化間葉系幹細胞株の樹立

ヒト間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を視覚化するためにヒト不死化間葉系幹細胞(hiMSC)を利用して骨芽細胞分化マーカーであるBGLAPのプロモーター直下にEGFPをノックインしたモニター細胞を作製した(図1)。このモニター細胞は、BGLAPのintact alleleが保存されているため、生細胞で内在性のBGLAP遺伝子発現の確認が可能である(Heliyon 2020 Narai *et al.*)。

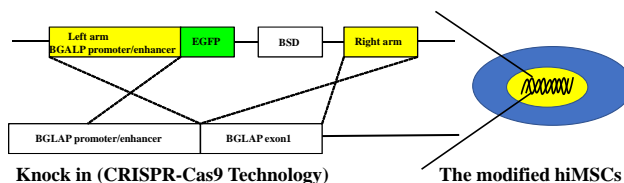


図1:モニター細胞の概要

(2) モニター細胞を利用した網羅的遺伝子解析

骨芽細胞を純化することによる骨分化関連遺伝子プロファイルの動向および骨芽細胞に特異的な細胞膜表面マーカーの同定の検索目的にモニター細胞を1週間または2週間骨分化誘導した後、ソーティングしたEGFP陽性細胞と未分化モニター細胞および未分化・骨分化親株細胞について網羅的遺伝子解析(NovaSeq6000(Illumina), Ingenuity Pathway Analysis(QIAGEN))を行った(図2)。

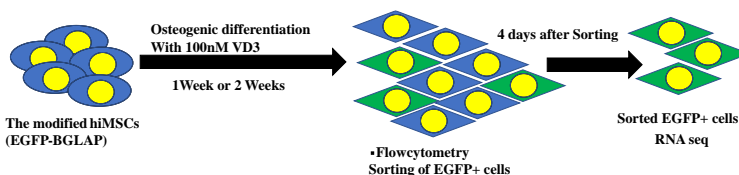


図2:モニター細胞を利用した網羅的遺伝子解析

(3) 純化した骨芽細胞の石灰化機能評価

モニター細胞を骨分化誘導後にソーティングした骨芽細胞について、石灰化機能評価目的にAlizarin Red Stainingを行った。

4. 研究成果

(1) 生細胞で骨芽細胞純化をモニター可能とするヒト不死化間葉系幹細胞株の樹立

モニター細胞株を 100nMVD3 で添加した骨分化誘導培地で 1 週間骨分化誘導をすると、EGFP の発現上昇が確認できた(図 3)。

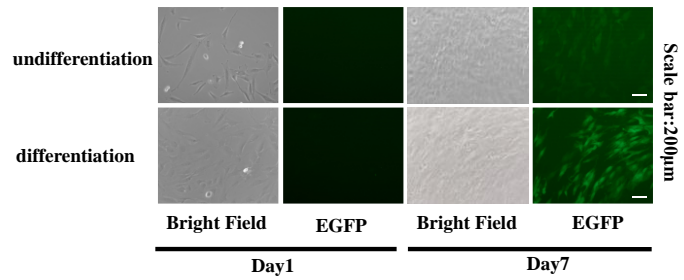


図 3: 骨分化誘導後の EGFP の発現

(2) モニター細胞を利用した網羅的遺伝子解析

① 1 週間または 2 週間の骨分化誘導後にソーティングしたモニター細胞は、ソーティングしていない群と比較して EGFP の発現強度が増強し、EGFP 陽性細胞が分取できたことが確認できた(図 4)。

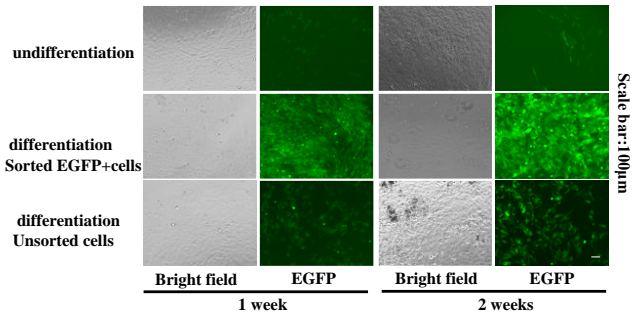


図 4: 骨分化誘導後にソーティングしたモニター細胞

② t-SNE 解析でソーティングした EGFP 陽性細胞は骨分化誘導後には 1 週間目から骨分化関連遺伝子が上昇し純化していない細胞(hiMSCs)は 2 週間目から骨分化関連遺伝子が上昇を認められた(図 5)。

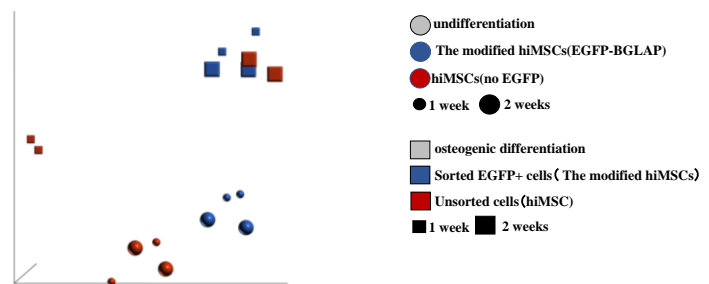


図 5: t-SNE 解析

③ 骨分化誘導後にソーティングした EGFP 陽性細胞は、骨分化誘導した親株細胞と比較して BGLAP の発現上昇を認め、骨分化関連遺伝子の運動性についても確認できた(図 6)。

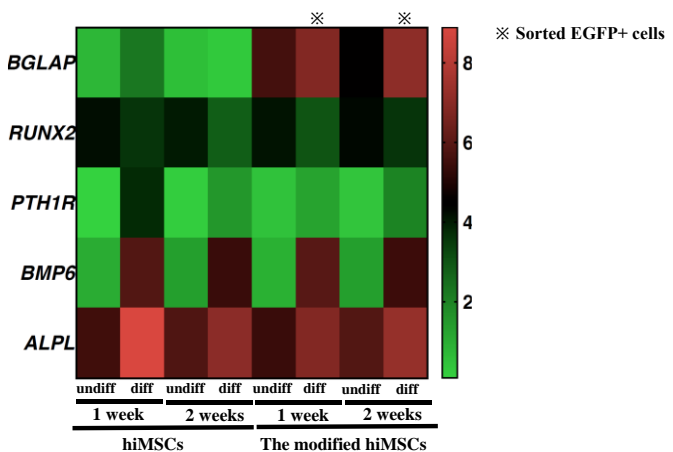


図 6: 骨分化マーカー遺伝子発現

④1週間骨分化誘導後にソーティングした EGFP 陽性細胞は、骨分化誘導の継続により、経時的な Mineralization(石灰化)の増強を認めた(図7)。

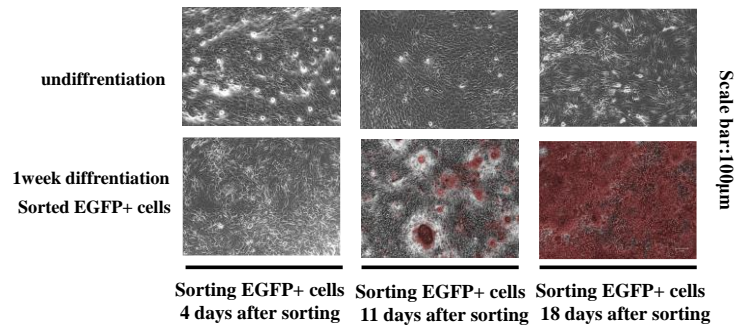


図7:Alizarin Red Staining

以上より純化した骨芽細胞は骨分化細胞(hiMSCs)と比較して1週間後には骨分化関連遺伝子プロファイルが確立し、連動性についても確認できた。また骨分化誘導継続により Mineralizationの増強も認めた。これらの結果により、BGLAPを指標に heterogeneity(不均一性)を改善した骨芽細胞集団は骨再生に有利な条件を構築する可能性が示唆された。今後、純化した骨芽細胞について 1)骨分化制御因子の解明、2)骨分化過程での鍵となる骨芽細胞の分化度、3)骨芽細胞の純化を可能とする膜表面マーカーの検索について検証を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Takashi Narai , Yuji Nakayama , Isamu Kodani , Kenji Kokura	4. 巻 Vol.9
2. 論文標題 A Paradigm Shift in Bone Regeneration Therapy: Using Mesenchymal Stem Cells and the CRISPR-Cas9 Technology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene Technology	6. 最初と最後の頁 Iss. S2 No:004
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 有
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 Narai T, Watase R, Nakayama Y, Kodani I, Inoue T, Kokura K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of human immortalized mesenchymal stem cells lines for the monitoring and analysis of osteogenic differentiation in living cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	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) 10.1016/j.heliyon.2020.e05398	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井信行, 奈良井節, 辻本真, 土井理恵子, 小谷勇
2. 発表標題 鳥取大学医学部附属病院歯科口腔外科における口唇裂・口蓋裂患者の臨床統計学的検討-裂型と合併先天異常・症候群-
3. 学会等名 第50回(公社) 日本口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奈良井節 , 小谷勇
2. 発表標題 The modified hiMSC for isolating living osteoblasts
3. 学会等名 第75回 NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奈良井 節 , 小谷 勇
2. 発表標題 生細胞で骨分化のモニタリング解析可能なヒト不死化間葉系幹細胞株の樹立
3. 学会等名 第74回 NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈良井 節、藤井信行、田村隆行、土井理恵子、小谷勇
2. 発表標題 CRISPR/CASの利用した新規骨分化ハイスループットスクリーニング系の樹立
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奈良井 節、綿世 諒平、古倉 健嗣、井上 敏昭、田村 隆行、小谷 勇
2. 発表標題 生細胞で骨分化をモニタリングできるヒト間葉系幹細胞株の樹立
3. 学会等名 第48 回(公社) 日本口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------