

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03881

研究課題名（和文）顎骨間葉系幹細胞を用いた再生医療実現のための基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental research for realizing regenerative medicine using jaw bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

西村 正宏（NISHIMURA, Masahiro）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：00294570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では顎骨骨髓由来間葉系幹細胞（MBMSC）の生体内での骨形成能を事前に予測しうる分子マーカーの探索を実施し、細胞外に分泌されるCHI3-L1が骨形成効果と負の相関を示すことを示し、CHI3-L1分泌量の測定によって移植前に骨形成効果を予測できる可能性を見出した。また、MBMSCは脂肪に分化しにくいという特徴を示すが、どのような分子メカニズムによって分化能が制御されているか不明であった。本研究ではMBMSCが脂肪分化初期および後期転写因子発現が抑制されていることを明らかにした。さらに、MBMSCの脂肪分化制御機構において、活性酸素種（ROS）が分化の制御に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MBMSC移植による骨増生効果を事前に予測するための分子マーカーの同定に成功した。この研究成果を利用した新たな細胞評価技術の開発によって、より効果的で安定的な骨増生治療を提供できる可能性が見出された。さらに、本研究ではMBMSCの脂肪分化制御の分子メカニズムの解明をおこない、ROSが分化制御において重要な働きをすることを初めて明らかにした。この研究成果はMBMSCの組織特異的な性質を解明するための新たな手がかりとなる可能性を示している。従って、本研究は学術的・社会的意義の高いものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated for molecular markers that can predict the in vivo osteogenic potential of mandibular/maxillofacial bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MBMSCs). We showed that extracellular secreted CHI3-L1 levels showed a negative correlation with the in vivo osteogenic potential of MBMSCs. This result indicates that the possibility of predicting the in vivo osteogenic potential of MBMSCs by measuring the CHI3L1 expression levels. In addition, MBMSCs are characterized by low adipogenic potential, but it was unclear what molecular mechanisms regulate their differentiation potential. We showed that early and late adipogenic transcription factors were downregulated in MBMSCs. Furthermore, we found that reactive oxygen species (ROS) are involved in the regulation of adipogenesis in MBMSCs.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎堤が高度に委縮した患者に対し、適切な補綴治療を行うためには委縮した骨を増生させる必要がある。現在の一般的な骨増生法は自家骨移植であるが、採取できる骨量に限りがある点や、採骨部に知覚麻痺が残るなどの問題点も多く、骨移植に代わる骨増生療法の開発が切望されている。

骨移植に代わる新しい骨増生療法として、幹細胞を用いた骨増生法が期待され、そのためのセルソースとして、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell:MSC)が注目されている。MSCは腸骨骨髓、脂肪組織、滑膜、歯髄など生体内の様々な組織に存在することが報告され、これまで多数の基礎研究が実施されている。近年、国内において腸骨骨髓由来MSC(ilic bone marrow MSC:IBMSC)や、脂肪由来間葉系幹細胞(Adipose Derived Stem Cell:ADSC)を用いた顎骨再生の臨床研究も実施されている。

我々は、顎骨骨髓中に存在するMSC(Mandible/Maxillofacial 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見出し、以前よりその有用性に着目してきた。IBMSCやADSCは組織採取の際の侵襲性が問題となるが、顎骨骨髓はインプラント手術の際に、新たな侵襲を加えずに簡単に採取ができ、ごく少量の骨髓液からでもMBMSCの培養が可能である。また、患者の年齢に関わらず細胞を得ることができる。この点が他の組織由来MSCよりも優位な点である。しかし、我々は数十例の患者由来MBMSCを用いて骨分化能評価を行ったところ、MBMSCの骨分化能はドナー間での個体差が大きく、中には全く骨分化しない細胞もあることが判明した。また、MBMSCは他のMSCとは異なり、脂肪への分化能が低いなどの特徴的な性質を示すことも明らかとなってきた。

MBMSC移植による骨増生療法を実施するにあたり、有効性と安全性の担保は最も重要な課題である。しかし、MBMSCはその機能制御機構には不明な点が多いことや、MBMSC移植による骨増生効果を一定にコントロールする技術も確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的はMBMSCの機能制御分子を多面的な手法によって解析し、MBMSCの組織特異性機構の解明を行い、さらに細胞移植前に生体内での骨形成ポテンシャルを予知しうるマーカー分子を特定し、そのマーカー分子解析法を用いた革新的な細胞評価基盤技術を開発することである。

3. 研究の方法

(1)MBMSCの採取および細胞培養

MBMSCの採取は、鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得て(承認番号:170263 課題名:「ヒト口腔組織由来骨原性細胞の分離、同定と骨再生療法の開発」)インプラント手術の際に患者の同意のもとで骨髓液を採取した。IBMSCはLonza社より購入したものを使用した。MBMSCおよびIBMSCは10%ウシ胎児血清含有のMEM培地を用いて培養をおこなった。

(2)MBMSCおよびIBMSCの分化能比較

MBMSCおよびIBMSCに対して、骨、軟骨、脂肪分化誘導をおこなった。各分化能はアリザリンレッド染色、トルイジンブルー染色、Oil-Red O染色によって評価した。

(3)脂肪分化制御分子発現の評価

脂肪分化制御因子として、初期分化転写因子(C/EBP α , C/EBP β)、後期分化転写因子(PPAR γ , C/EBP δ)発現を定量的リアルタイムPCRによって評価した。

(4)ミトコンドリア機能評価

脂肪分化誘導に伴うミトコンドリア機能活性化の評価を、ミトコンドリア膜電位の定量、ミトコンドリアDNA数の測定、ミトコンドリア生合成関連遺伝子発現によって評価した。

(5)細胞内活性酸素種(ROS)測定

脂肪分化誘導に伴う細胞内ROS産生の変化をROS assay kit(Dojindo)を用いて評価した。

(6)細胞内ROS産生誘導による脂肪分化に与える影響の評価

ROS産生誘導剤のメナジオン添加によってMBMSCのROS産生を増加させた際の脂肪分化に与える影響を評価した。

(7)MBMSC移植による骨増生効果の評価

7名のドナーから採取したMBMSCを骨補填剤と混和した移植体を、マウス頭頂骨部へ移植し骨増生効果を組織学的に評価した。

(8)骨増生効果の異なるMBMSCにおける分子発現の網羅的解析

上記検討項目(7)で骨増生効果の異なるMBMSCに対して、分子発現の違いを網羅的に解析するために、Human Angiogenesis Array kit, Human Chemokine Array Kit, Human XL Cytokine Array Kit(R&D Systems)を用いて評価した。

4. 研究成果

MBMSC の組織特異性機構の解明

(1) MBMSC と IBMSC の分化能比較

MBMSC と IBMSC は骨分化能 (図 1A)、軟骨分化能 (図 1B) は同等であったが、MBMSC の脂肪分化能は IBMSC に比べて明らかに低く、脂肪滴の蓄積がわずかであることが示された (図 1C)。

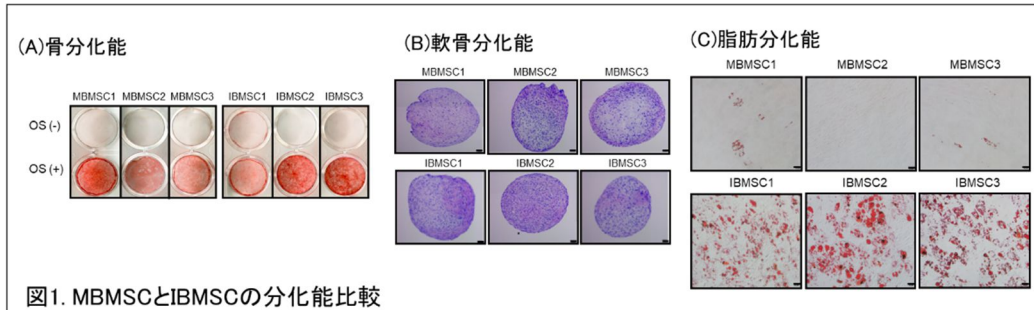


図1. MBMSCとIBMSCの分化能比較

(2) 脂肪分化制御因子発現比較

MBMSC は脂肪分化が負に制御されていることから、どのような分子メカニズムによって調節されているかを明らかにするために、脂肪分化に重要な転写因子発現を評価した。MSC の脂肪分化は複雑な過程によって制御されており、初めに未分化 MSC から脂肪前駆細胞へ分化し、その後、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞へ最終分化する。分化の初期には C/EBP β 、C/EBP δ などの早期分化転写因子が重要な働きをし、分化の後期には PPAR γ 、C/EBP α が重要である。

IBMSC は脂肪分化誘導により、C/EBP β および C/EBP δ の有意な発現上昇が誘導されるが、MBMSC では有意な変化がない (図 2A)。さらに、PPAR γ 、C/EBP α も同様に、MBMSC では有意な発現上昇は認めなかった (図 2A)。PPAR γ および C/EBP α は C/EBP β および C/EBP δ によって発現や転写活性が調節されることが報告されているため、MBMSC における脂肪分化の負の制御機構において、分化早期転写因子発現の抑制が重要なファクターである可能性が示唆される。

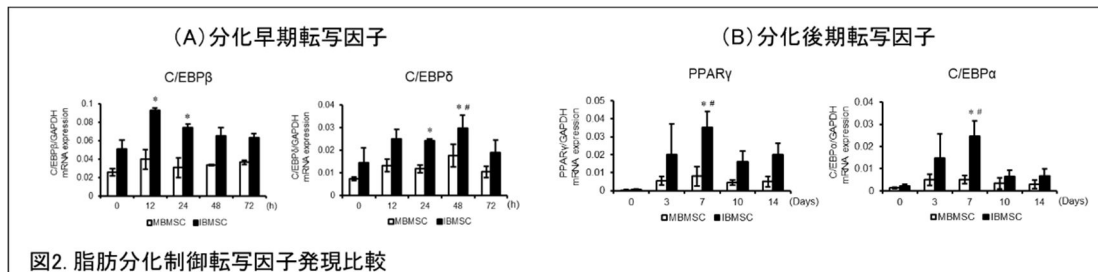


図2. 脂肪分化制御転写因子発現比較

(3) MBMSC の脂肪分化抑制におけるミトコンドリア機能活性化の影響評価

上記項目(2)によって、MBMSC においては脂肪分化早期転写因子の抑制が脂肪制御に関与している可能性が示されたため、次にどのようなメカニズムによって C/EBP β および C/EBP δ 発現が制御されているか探索した。近年、脂肪分化の制御においてミトコンドリア機能の活性化が重要な役割をすることが報告されている。そこで、脂肪分化によるミトコンドリア機能の変化を評価した。MBMSC および IBMSC は脂肪分化誘導によって、ミトコンドリア膜電位が増加するが、両細胞間で有意な差はみられなかった (図 3A) また、ミトコンドリア DNA のコピー数 (図 3B) およびミトコンドリア生成関連遺伝子である、PGC-1 α と TFAM 発現においても MBMSC と IBMSC 間で有意な差はなかった (図 3C)。これらの結果から、MBMSC の脂肪分化抑制においてミトコンドリア機能の活性化は直接的には関与しないことが見出された。

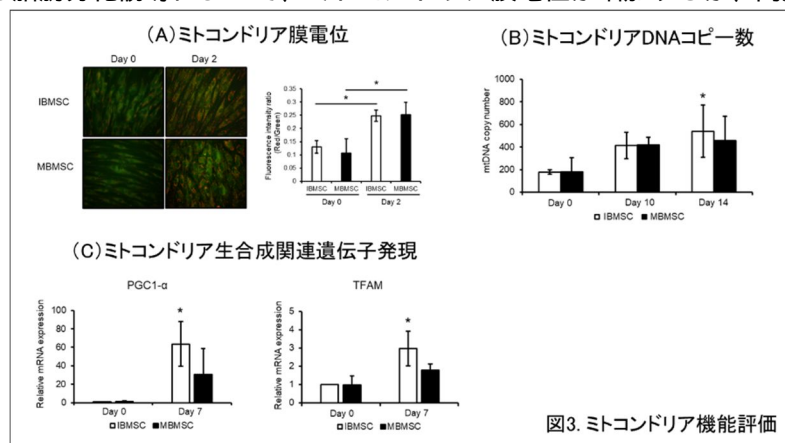


図3. ミトコンドリア機能評価

(4) MBMSC の脂肪分化抑制における活性酸素種 (ROS) の影響評価

過剰な ROS は細胞機能障害を引き起こすが、低濃度の ROS は細胞機能の維持にとって重要で

あることが明らかとなっている。また、近年の研究により ROS が脂肪分化の誘導に重要であることが報告されている。そこで、MBMSC の脂肪分化制御機構における ROS の役割について評価した。IBMSC において、脂肪分化誘導に伴う細胞内 ROS 産生は分化誘導により増加するが、MBMSC では増加しなかった(図 4A)。また、ROS 産生酵素である NOX4 は MBMSC において IBMSC に比べて有意に低かった(図 4B)。このことから、ROS が MBMSC の脂肪分化の制御に何らかの影響を及ぼしている可能性が見出された。

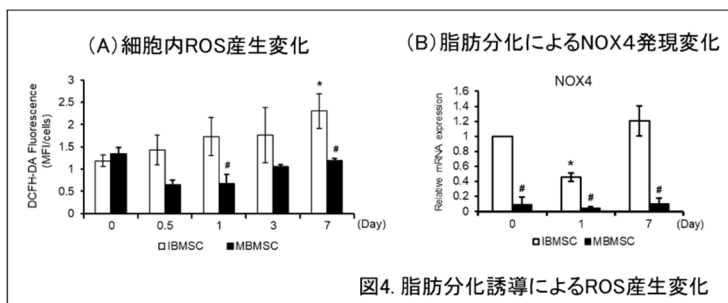


図4. 脂肪分化誘導によるROS産生変化

そこで、次に MBMSC において細胞内 ROS 産生を増加させた際の脂肪分化に与える影響を評価した。細胞内 ROS 産生の誘導には合成ビタミン K であるメナジオンを用いた。MBMSC にメナジオンを添加することによって有意に細胞内 ROS 産生が増加し、C/EBP および C/EBP 発現が増加した(図 5A)。しかし、メナジオン処理によって、脂肪分化後期転写因子の PPAR γ 、C/EBP 発現には影響せず(図 5A)。脂肪滴の形成量には有意な増加は認めなかった(図 5B)。これらの結果は、MBMSC の脂肪分化において ROS は分化初期段階に部分的に関与している可能性を示している。この研究成果は MBMSC の組織特異的な性質を解明するための新たな手がかりとなる可能性を示している。

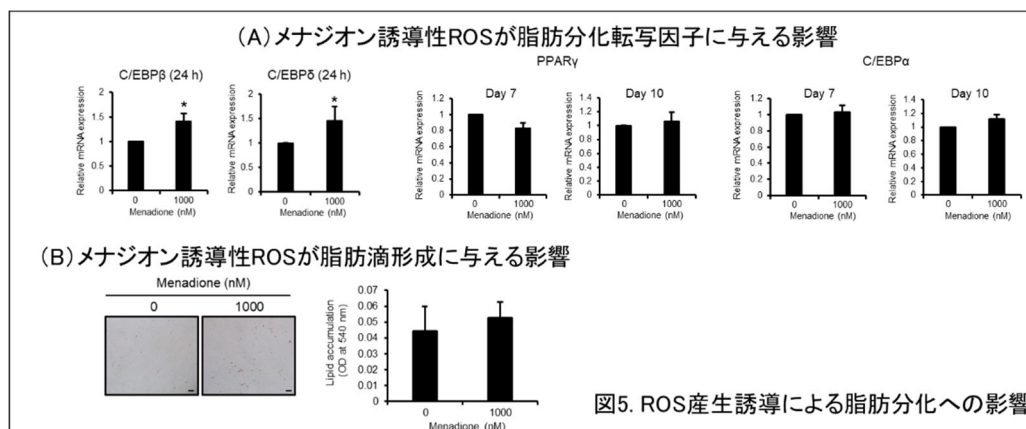


図5. ROS産生誘導による脂肪分化への影響

生体内での骨形成ポテンシャルを予知するマーカー分子の探索

(1) MBMSC の *in vitro* の骨分化能と *in vivo* の骨形成能との相関性評価

MBMSC の生体内での骨形成能を予知する方法として、*in vitro* での骨分化能の評価によって判定できるかを調べるために、本研究では 7 名の患者より採取した MBMSC において、*in vitro* の骨分化能と *in vivo* の骨形成能との相関性を評価した。骨分化誘導によるアルカリフォスファターゼ活性変化と石灰化能を評価すると、細胞間によって骨分化能は大きく異なり、MBMSC5、MBMSC7 はほとんど分化しなかった(図 6A)。次にこれらの MBMSC をマウス頭頂骨部へ移植した際の *in vivo* での骨形成効果を評価した。骨形成能は細胞間で大きく異なり、*in vitro* でほとんど骨分化しなかった MBMSC5 および MBMSC7 が *in vivo* では高い骨形成効果を示した(図 6B)。一方で *in vitro* で骨分化能の高かった MBMSC1 および MBMSC2 は *in vivo* での骨形成能は低かった(図 6B)。このように、MBMSC の生体内での骨形成能は、*in vitro* の骨分化能とは必ずしも一致しないことが明らかとなった。

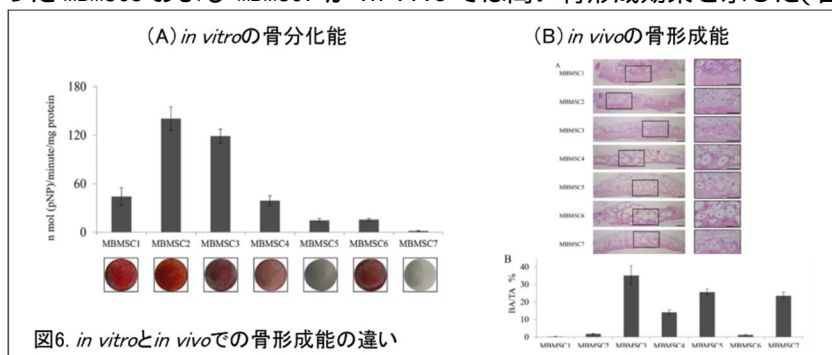


図6. *in vitro*と*in vivo*での骨形成能の違い

(2) 細胞外分泌タンパク発現と *in vivo* での骨形成能との関連性評価

上記項目(1)で、MBMSC 移植による骨形成効果の判定に、*in vitro* での骨分化能評価は適さないことが判明したため、次に MBMSC から分泌される分子を網羅的に解析し、骨形成能と相関性を

示す分子の特定をおこなった。Array 解析によって、5 つの候補分子(CHI3-L1, GRO , MCP-1, MCP-3, IL-8)が特定された(図 7A)。さらにこれらの分子を ELISA 法と PCR 法によって詳細にすると、CHI3-L1 において、高発現細胞は *in vivo* での骨形成能は低く、低発現細胞は骨形成能が低いことが明らかとなった(図 7B)。これらの結果から、細胞移植前に CHI3-L1 発現を評価することによって MBMSC 移植による骨形成能を事前に予見できる可能性が見出された。本研究によって得られた成果を応用することによって、革新的な細胞評価技術の開発につながると考えられる。

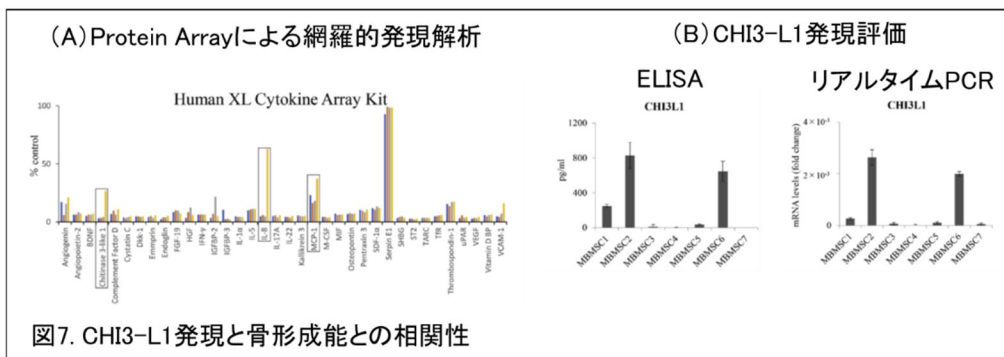


図7. CHI3-L1発現と骨形成能との相関性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ishii M, Ikeda N, Miyata H, Takahashi M, Nishimura M.	4. 巻 46
2. 論文標題 Purple Sweet Potato Leaf Extracts Suppress Adipogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Food Biochemistry	6. 最初と最後の頁 e14057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfbc.14057	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 Suehiro F, Komabashiri N, Masuzaki T, Ishii M, Yanagisawa T, Nishimura M	4. 巻 41
2. 論文標題 Efficacy of bone grafting materials in preserving the alveolar ridge in a canine model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 302-308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-173	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 Yanagisawa T, Ishii M, Takahashi M, Fujishima K, Nishimura M.	4. 巻 47
2. 論文標題 Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 Promotes Lymphangiogenesis in Lymphatic Endothelial Cells through the ERK and Akt Signaling Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 6841-6854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-020-05741-8.	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 Komabashiri N, Suehiro F, Ishii M, Nishimura M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Efficacy of chitinase-3-like protein 1 as an in vivo bone formation-predictable marker of maxillary/mandibular bone marrow stromal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 38-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.03.004	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 Ishii M, Miyata H, Ikeda N, Tagawa T, Nishimura M.	4. 巻 46
2. 論文標題 Piper retrofractum extract and its component piperine promote lymphangiogenesis via an AKT- and ERK-dependent mechanism.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Food Biochemistry	6. 最初と最後の頁 e14233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfbc.14233.	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 Miyata H, Ishii M, Suehiro F, Komabashiri N, Ikeda N, Sakurai T, Nishimura M.	4. 巻 146
2. 論文標題 Elucidation of adipogenic differentiation regulatory mechanism in human maxillary/mandibular bone marrow-derived stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2022.105608	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池田菜緒, 末廣史雄, 駒走尚大, 西村正宏
2. 発表標題 間葉系幹細胞のミトコンドリア機能と脂肪分化能との関連の評価
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 第131回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田春香, 末廣史雄, 駒走尚大, 西村正宏
2. 発表標題 顎骨と腸骨骨髓由来間葉系幹細胞の分化能の比較検討
3. 学会等名 第52回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末廣史雄，駒走尚大，石井正和，益崎与泰，田中謙光，松本哲彦，戸澤聖也，山田悠平，西村正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓間葉系幹細胞採取条件の検討
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村正宏
2. 発表標題 生命科学の視点からの補綴歯科治療を目指して
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田菜緒，末廣史雄，駒走尚大，西村正宏
2. 発表標題 顎骨間葉系幹細胞における骨分化能とエネルギー代謝との関連
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 駒走尚大，末廣史雄，益崎与泰，西村正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間質細胞の骨形成能判定のためのマーカー探索
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 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 宮田春香, 末廣史雄, 駒走尚大, 西村正宏
2. 発表標題 顎骨と腸骨由来間葉系幹細胞の分化能の比較
3. 学会等名 令和3年度日本補綴歯科学会九州支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末廣史雄, 駒走尚大, 益崎与泰, 西村正宏
2. 発表標題 歯槽骨欠損モデルにおける各種骨補填材の有効性の検討
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会 第39回九州支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 駒走 尚大, 末廣 史雄, 石井 和正, 西村 正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間質細胞の骨形成能判定のためのマーカー探索
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田春香, 石井正和, 末廣史雄, 駒走尚大, 西村正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間葉系幹細胞における 脂肪分化制御機構の解明
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 駒走 尚大, 末廣 史雄, 石井 正和, 柳澤 嵩大, 西村 正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間質細胞の骨形成能判定のためのマーカー探索
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳澤嵩大, 西村正宏, 末廣史雄, 益崎与泰, 原田佳枝
2. 発表標題 抗菌性ペプチドLL-37のリンパ管新生促進効果の検討
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会 第129回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 駒走 尚大, 末廣 史雄, 益崎 与泰, 西村 正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間質細胞の骨形成能判定のためのマーカー探索
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会 50回記念学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 リンパ管内皮細胞遊走促進剤	発明者 石井正和、西村正宏、田川 岳、桑原浩誠、柚木 彩	権利者 国立大学法人 鹿児島大学、丸善製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-096208	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 骨形成促進剤および骨形成促進用経口組成物	発明者 石井正和、西村正宏、田川 岳、桑原浩誠	権利者 国立大学法人 鹿児島大学、丸善製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-123939	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 脂肪細胞分化抑制剤、脂肪細胞分化抑制用経口組成物、脂肪滴肥大抑制剤および脂肪滴肥大抑制用経口組成	発明者 石井正和、西村正宏、田川 岳、桑原浩誠	権利者 国立大学法人 鹿児島大学、丸善製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-151661	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	石井 正和 (ISHII Masakazu) (00456683)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	
研究分担者	小賤 健一郎 (KOSAI Kenichro) (90258418)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	佐原 寿史 (SAHARA Hisashi) (90452333)	鹿児島大学・総合科学域共同学系・准教授 (17701)	

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