

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10219

研究課題名(和文)閉経後の骨粗鬆症に対する乳歯由来歯髄幹細胞の培養上清の効果

研究課題名(英文) Bone resorption improvement by conditioned medium of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in ovariectomized mice

研究代表者

菊入 崇 (KIKURI, Takashi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10322819

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)：ヒト乳歯剥離歯由来幹細胞(SHED)は、乳歯の歯髄組織に存在する間葉系幹細胞です。SHEDの分泌物は、免疫調節機能や再生機能を有している。本研究では、卵巣摘出(OVX)表現型により誘発される骨減少症とそれに対応する免疫学的変化に対するSHEDの培養上清(SHED-CM)の効果について検討した。雌性C3H/HeJマウスにOVXを施し、OVX直後から4週間SHED-CMを腹腔内投与した。SHED-CMはOVX後の骨量を改善し、腹腔内のM2マクロファージの分極を上昇させた。以上のことから、SHED-CMにはOVX誘発の骨減少症を改善する効果が期待できる活性分泌物が含まれていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は、骨強度の低下を特徴とした骨系統疾患であり、進行すると骨強度の低下により寝たきりになり患者のQOL低下につながる。国内においても急速な高齢化に伴い罹患者は急増している。そのため、多くの患者が骨粗鬆症の進行を抑えるためビスホスホネート製剤などの骨吸収抑制剤を服用している。しかし、それらの骨吸収抑制剤には重篤な副作用(薬剤関連性顎骨壊死)があり、新たな治療薬の創生が望まれている。本研究は、乳歯に存在している歯髄幹細胞が骨粗鬆症の治療もしくは予防に有効であるか動物実験を行い検討した。その結果、乳歯歯髄幹細胞の分泌因子が、マウスの骨粗鬆症の病態を改善する作用を有していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) are mesenchymal stem cells with multipotent differentiation potential present in the dental pulp tissue of the deciduous teeth. SHED produce secretions that have immunomodulatory and regenerative functions. In this study, we investigated the effects of SHED-conditioned medium (SHED-CM) on osteopenia induced by the ovariectomy (OVX) phenotype and its corresponding immunological changes. 11-week-old female C3H/HeJ mice were subjected to OVX, and SHED-CM was administered intraperitoneally for 4 weeks starting immediately after OVX. In conclusion, our data indicate that SHED-CM contains active secretions that may have promising efficacy to ameliorate OVX-induced osteopenia. We suggest that SHED-CM has the potential to be used as a novel therapeutic agent to inhibit osteoporosis.

研究分野：歯科

キーワード：乳歯歯髄幹細胞 骨粗鬆症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、間葉組織に存在している体性幹細胞であり、骨細胞、心筋細胞、軟骨細胞などへの分化の他、グリア細胞・神経細胞(外胚葉系由来)や肝細胞(内胚葉系由来)などの間葉系以外の細胞に分化できる優れた多分化能を有している。そのため、間葉系幹細胞は再生医療の細胞ソースとして有用な幹細胞である。さらに、間葉系幹細胞は多分化能の他に、抗炎症作用、免疫抑制・調整作用、組織保護・修復作用を有していることが明らかになっている。

乳歯由来歯髄幹細胞(Stem cells from human exfoliated deciduous teeth : SHED)は、乳歯の歯髄に存在している間葉系幹細胞であり、胎齢の初期に歯が出来る予定領域に形成した歯堤周囲に凝集した間葉細胞に由来している。SHED の持つ重要な機能のひとつとして、SHED が数百種類以上のサイトカインや成長因子、ケモカイン、エクソソームなど多くの生理活性物質を分泌している。SHED から分泌されるこれらの生理活性物質は、さまざまな疾患の治療が可能であることが報告されている。

骨粗鬆症は僅かな外力で骨折を起こす疾患であり、我が国においても近年の急速な超高齢社会の進行で増加傾向にあることが報告されている。骨粗鬆症の進行は腰椎の圧迫骨折や大腿骨の頸部骨折を引き起こし、歩行困難や寝たきりにつながる。そのため、骨粗鬆症の進行を防ぐことは極めて重要である。骨粗鬆症の予防には様々な骨吸収抑制剤が治療に用いられているが、骨吸収抑制効果の高い第三世代ビスフォスフォネート製剤あるいは抗 RANKL モノクローナル抗体製剤は、その副作用として抜歯等の処置後に顎骨壊死を引き起こすことが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SHED が分泌する生理活性物質の骨吸収抑制効果について明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

北海道大学病院自主臨床研究審査委員会承認(自 010-0116)のもと、北海道大学病院小児・障害者歯科で患者の同意を得て提供された脱落乳歯より SHED を分離・培養した。比較対照群として、Lonza 社から購入したヒト永久歯歯髄由来間葉系幹細胞(DPSCs)を使用した。各細胞を培養し、80%コンフルエント状態で無血清培地に交換、さらに 48 時間培養した後に上清を回収した。上清を遠心し細胞残骸などを除去したものを condition medium(CM)として使用した。

2) 動物実験

実験には、生後 8 週齢の C3H/HeJ メスマウス(三協ラボサービス)を用いた。ネブタール麻酔下で卵巣摘出手術(OVX)または開腹のみの偽手術を行い、骨粗鬆症モデルマウスおよび対照マウスを作製した。OVX 直後から週 2 回の頻度で CM(200 μ l) 腹腔内に投与を行った。OVX から 6 週間後に CO₂ ガスにて安楽死させ、各種の解析を行った。本研究の動物実験にあたっては北海道大学動物実験指針を遵守し北海道大学動物実験委員会承認(15-0015)を得て行った(図 1-A)。

3) 試料の観察

採取した大腿骨は 4%パラホルムアルデヒドで 2 日間浸漬固定を行った。固定した試料は、日立製作所 Latheta LCT200 を用いて管電圧: 50kV、ピクセルサイズ 24.0 μ m の条件で μ CT 撮影を行った。撮影試料における測定は、Latheta LCT200 標準付属の解析ソフトウェアを使用して計測した。 μ CT 撮影後に 10%EDAT 溶液で 10 日間脱灰を行い、通法に従いアルコール脱水およびパラフィン包埋を行った。パラフィン包埋した資料は 4 μ m の切片を作成し、通法に従い H.E.染色および TRAP 染色を行った。切片画像の取り込みと解析は Image-Pro Premier(日本ローバー)を用いた。

4) フローサイトメトリー分析

末梢血はヘパリンコートしたガラス毛细管を用いて眼底静脈叢より採血した。採取した末梢

血は、抗 CD3, CD4, CD8a, / TCR 抗体で染色を行い、リンパ球区画の解析を行った。骨髓細胞は、大腿骨を摘出し、骨端部を外科用剪刀で切断した。切断面に 30 ゲージ注射針を挿入し 1% BSA 添加 PBS で骨髓細胞を洗い流し、回収した。回収した骨髓細胞に対して、抗 CD3, / TCR 抗体で染色を行い、解析を行った。さらに、腹腔内からマクロファージ (M) を回収し、抗 F4/80, CD80 抗体で染色を行い M 分画の解析を行った。すべての解析は FACSVerse™ (BD Biosciences) を用いた。

5) 血清中のサイトカイン濃度測定

血中の IL-17, TNF-alpha, INF-gamma, Osteoprotegrin, RANKL 濃度は、R&D 社 Quantikine ELISA Kit を用いて測定した。

6) in vitro における破骨細胞誘導

末梢血から TCR / + T Cells Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を使用した磁気細胞分離法によって T 細胞を得た。骨髓細胞, T 細胞, M1 M あるいは M2 M との共存培養を行い、破骨細胞を誘導した。

7) 統計分析 各群間は、解析ソフトウェア Statview (SAS) を用いて多重比較検定による有意差検定を行なった。

4 . 研究成果

1) SHED-CM の注入は OVX 後の早期の骨量喪失を予防した

OVX 後に発症する骨粗鬆症に対して SHED-CM が骨吸収に対して抑制効果について解析を行なった。μCT 解析の結果、大腿骨遠位骨端部の骨量 (BV/TV) 値は、OVX 群では Sham 群と比較して有意に低い値を示したが、SHED の培養上清を投与した OVX SHED-CM 群では、Sham 群と有意差のない値を示した。一方、DPSCs の培養上清を投与した OVX DPSCs-CM 群では、Sham 群と比較して有意に低い値を示した (図 1-E)。全骨体積、骨梁体積、全骨塩量、皮質骨塩量、骨梁塩量、海綿骨塩量、骨梁密度および海綿骨密度においても同様の結果となった (図 1C-G)。以上の結果は、SHED の培養上清には OVX 後に起こる早期の骨吸収に対して抑制効果があることが判明した。DPSCs の培養上清には骨吸収に対する抑制効果が低いことから、この現象は SHED に特異的な機能である可能性が示唆された。

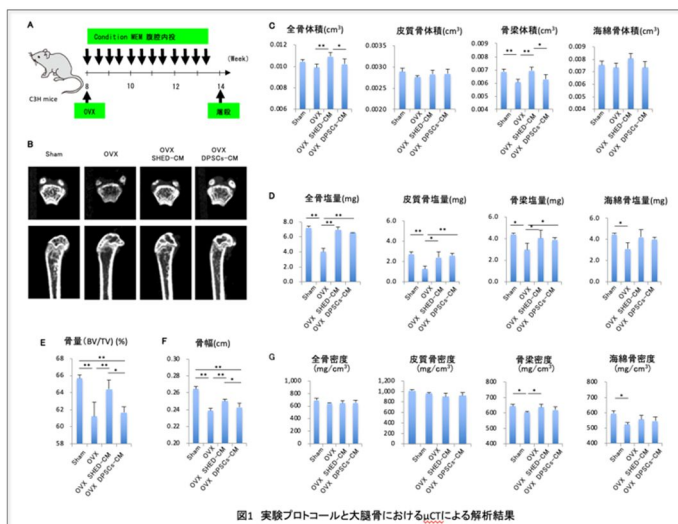


図1 実験プロトコールと大腿骨におけるμCTによる解析結果

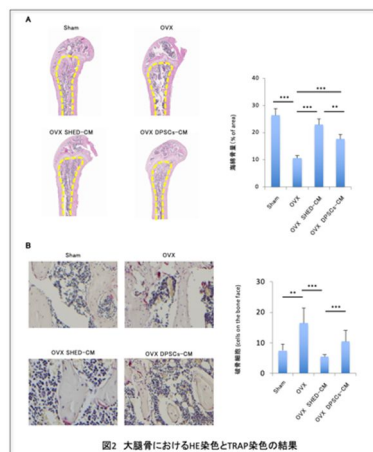


図2 大腿骨におけるHE染色とTRAP染色の結果

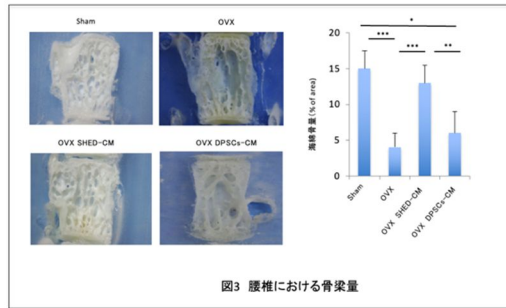


図3 腰椎における骨量

脱灰後に作成した薄片辺においても、 μ CT解析を裏付ける結果を示した(図2A)。さらに、OVX SHED-CM投与OVX群では、OVX群と比較して大腿骨遠位骨幹部の破骨細胞数が有意に減少していた(図2B)。

大腿骨遠位骨端部はエストロゲン欠乏によって、骨吸収が発症しやすい部位であることが報告されている。そこで、体のなかで最も体重が掛かる部位である腰部に対しても、OVX SHED-CM群による骨吸収抑制効果があるか確認を行なった。OVX後の腰椎の骨梁構造を観察したところ、OVX群マウスでは中央部の骨梁の吸収が顕著であったのに対して、SHEDの培養上清を投与したOVX SHED-CM群では、OVXを行ったにもかかわらず骨梁の小柱構造はSham群と同様形態が維持されていた(図3)。SHEDの培養上清は、大腿骨の骨の吸収を抑制するだけでなく、全身の骨組織に対して有効であることが判明した。

エストロゲン欠乏の存在下では、T細胞からのIL-17, IFN- γ および TNF- α などの炎症性サイトカインの産生が増強され、骨吸収を促進することが報告されている。そこで、SHEDの培養上清の投与によって、末梢血中のIL-17, IFN- γ および TNF- α の濃度がどのように変化するか測定を行なった。その結果、OVX群のIL-17, IFN- γ および TNF- α はSham群よりも有意に高い値を示したが、OVX SHED-CM群では、OVX群でOVXを行ったにもかかわらず、IL-17, IFN- γ および TNF- α の血漿中の濃度は増加しなかった(図3A-C)。興味深いことに、OVX群、OVX SHED-CM群およびOVX DPSCs-CM群の血清中のOPG濃度は、Sham群マウスと比較して有意に低い値を示したが、OVX群とOVX SHED-CM群およびOVX DPSCs-CM群の間には、有意差は認められなかった(図3D)

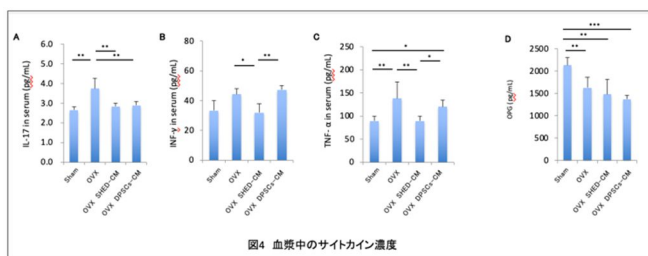


図4 血清中のサイトカイン濃度

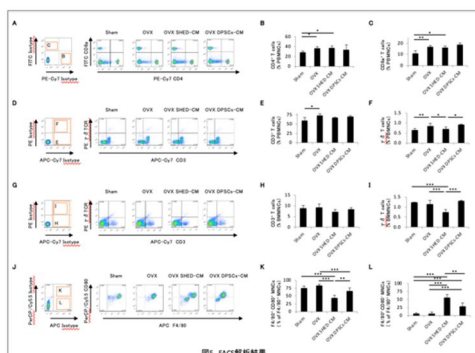


図5 FACS解析結果

末梢血中における炎症性サイトカインである IL-17, IFN- γ および TNF- α が OVX 群では上昇し, OVX SHED-CM 群では減少していることから (図 4), 末梢血中と骨髄中の CD3 陽性細胞, CD4 陽性細胞, CD8a 陽性細胞および Treg 細胞数について FACS で検索を行なった。さらに, 腹腔内からマクロファージ (M1, M2) を回収し, 抗 F4/80, CD80 抗体で染色を行い M1, M2 分画の解析を行った。M2 陽性細胞の発生率は Sham 群と OVX 群の間で有意差はなかったが, OVX SHED-CM 群で有意に増加した (図 5)。

Sham 群, OVX 群, OVX SHED-CM 群および OVX DPSCs-CM 群における体重変化と内臓脂肪と皮下脂肪の量について検討を行なった。OVX 群では OVX 後に体重の増加傾向を示していたのに対して OVX SHED-CM 群では体重の増加は抑えられていた (図 6A)。さらに, OVX 群では OVX 後に内臓脂肪が顕著に増加しているのに対して, OVX SHED-CM 群では OVX を行っているにもかかわらず内臓脂肪の増加は確認されなかった (図 6B-D, 青色が脂肪組織)。

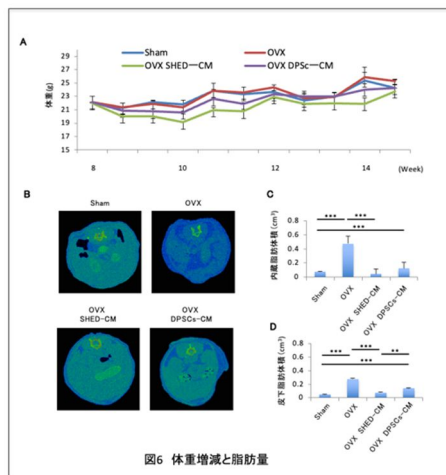


図6 体重増減と脂肪量

今回のマウスを用いた実験結果から, SHED-CM を投与することで, OVX 後に発症する骨量減少が抑制されることが示された。このことから, SHED から放出した何らかの分泌因子が, 骨粗鬆症の進行を抑制する効果を有していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda Ayako, Kikuiiri Takashi, Yoshimura Yoshitaka, Yawaka Yasutaka, Shirakawa Tetsuo	4. 巻 23
2. 論文標題 Bone resorption improvement by conditioned medium of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in ovariectomized mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	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） 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	吉村 善隆 (YOSHIMURA Yoshitaka) (30230816)	北海道大学・歯学研究院・准教授 (10101)	

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