

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390540

研究課題名（和文） 舌筋由来幹細胞を用いた骨再生法

研究課題名（英文） Bone regeneration procedure with tongue muscle-derived stem cell

研究代表者

上山 吉哉 (UEYAMA YOSHIYA)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00168668

研究成果の概要（和文）：Jcl-ICR マウス舌筋由来 Sca-1 陽性細胞(TDSCs)を自動磁気細胞分離装置にて採取した。TDSCs を骨分化誘導培地にて培養すると、骨芽細胞マーカーの発現増強とアリザリンレッド・フォンコッサ陽性の石灰化細胞外基質の形成が認められ、骨芽細胞への分化能が確認できた。さらに TDSCs を β -TCP ゼラチンスポンジと共に培養し、骨分化誘導培地を用いて分化誘導させ、ヌードマウス背部皮下へ移植したところ、移植後骨様組織の形成を認めた。以上の結果から、TDSCs は骨分化能を有しており骨再生医療に有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Tongue muscle-derived Sca-1 positive cells (TDSCs) were isolated from Jcl-ICR mice tongue muscle by magnetic cell separation system with microbeads. TDSCs differentiated to osteoblast lineage demonstrated by up-regulation of osteoblastic makers and formation of mineralized matrix with alizarin red or Von Kossa positive *in vitro*. The bone formation was observed in the gelatin sponges of β -TCP. These data suggest that TDSCs retain its osteogenic differentiation potential, and may be useful for regenerative medicine of bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：マウス舌筋由来幹細胞, 分化誘導, 骨再生, β -TCP ゼラチンスポンジ

1. 研究開始当初の背景

口腔外科的疾患の治療により失った顎骨の再建は、咬合回復につながり QOL の観点からも大変重要であると考えられる。そこで申請者は以前から骨欠損部への骨再生を

tissue engineering の基本戦略から、骨再生の足場となる基質や骨再生の場所を確保するための材料について開発研究を行ってきたが、scaffold 内で十分な骨再生は認められなかった。その原因として一つに

は間葉系幹細胞の数が少なく十分な量の骨芽細胞様細胞が増殖できなかったこと、さらにたとえ多孔性の scaffold であってもその内部に骨再生に十分な骨芽細胞様細胞が行き渡っていなかったことによると考えた。

これまで発表された骨再生に関する研究においては、骨再生のための細胞としては骨髄細胞に含まれる間葉系幹細胞を用いた研究がほとんどで、骨髄由来の幹細胞を分化させ骨芽細胞様細胞として実験に用いている。しかし実験結果では骨再生までには長時間を要し、大量の骨髄を必要とするため骨再生への臨床応用は困難である。また骨髄間葉系幹細胞に含まれている stem cell の数は非常に少ないとの報告がある。このことはこれまで各種生体材料を scaffold としその中に骨髄由来間葉系幹細胞を注入して骨再生を試みた実験において骨の再生が十分に行われなかった理由の一つには骨再生に必要な細胞に問題があると考えられる。以上のことより骨髄由来間葉系幹細胞の採取方法や採取量の問題を含め、臨床応用において骨髄由来間葉系幹細胞を骨再生の細胞に用いるのは困難である。近年 ES 細胞による再生医療が注目されるようになったが、ES 細胞には卵子を用いるための倫理的な問題や多分化能を持つため癌を発生させる可能性があり即実用化は困難である。また ES 細胞に変わり注目されている iPS 細胞からの各臓器再生については、現在のところ動物 iPSA 細胞から軟骨への分化は確かめられているが、骨芽細胞から骨への再生については報告されておらず未知数である。また iPS 細胞も現時点では作製過程においてレトロウイルスベクターを使うことや、癌遺伝子 c-myc を導入する必要性から細胞のがん化を引き起こす可能性がある。

そこで我々は骨再生のための細胞を ES 細胞や iPS 細胞ではなく実用化に向け安全な間葉系幹細胞を用いることにした。ただこれまで通り骨髄由来間葉系幹細胞を用いたのでは上記に記載した理由により臨床応用は難しい。そこで幹細胞の由来を骨髄ではなく、幹細胞の存在が報告されている筋組織、特に口腔内で採取が容易な舌筋から幹細胞を分離することを考えた。

2. 研究の目的

(1) 舌筋組織から分離した舌筋由来組織

幹細胞から誘導された細胞が骨芽細胞様細胞であることを証明する。

(2) 舌筋由来組織幹細胞から骨芽細胞様細胞に分化誘導させる骨分化誘導因子の培養条件を決定する。

(3) 舌筋由来組織幹細胞を培養し分化誘導させた骨芽細胞様細胞を直接マウスの皮下、顎骨歯肉に注入し骨形成を確認する。

(4) マウスの皮下に骨再生の scaffold として生体材料を埋入しその中に骨芽細胞様細胞を注入し骨形成を確認する。

3. 研究の方法

(1) マウスの舌筋組織からの Sca-1 陽性細胞の分離

8 週齢 Jc1-ICR マウスから採取した舌筋を酵素液(Collagenase+DNase)にて処理後、細胞浮遊液を作製する。抗 Sca-1 抗体、Anti-FITC Micro beads を処理後、自動磁気細胞分離装置を用いて Jc1-ICR マウス Sca-1 陽性細胞を収集する。

(2) Sca-1 陽性細胞の全筋細胞に対する割合の検索

上記にて Jc1-ICR マウスから採取した舌筋の細胞浮遊液に抗 Sca-1 抗体を反応させた後、フローサイトメーターを用いて Sca-1 陽性細胞の全細胞数における割合を算定する。

(3) Jc1-ICR マウス Sca-1 陽性細胞の増殖

Jc1-ICR マウス Sca-1 陽性細胞を増殖培地を用いて増殖培養させる。

(4) Jc1-ICR マウス Sca-1 陽性細胞から骨芽細胞様細胞への分化誘導

上記にて増殖培養した Jc1-ICR マウス Sca-1 陽性細胞を骨分化誘導培地にて培養し分化誘導させる。培養 3 日目、7 日目の培養細胞を用いてアルカリフォスファターゼ染色を行い Jc1-ICR マウス Sca-1 陽性細胞からの分化誘導の状態を評価する。

(5) 舌筋由来 Sca-1 陽性細胞から骨分化の評価

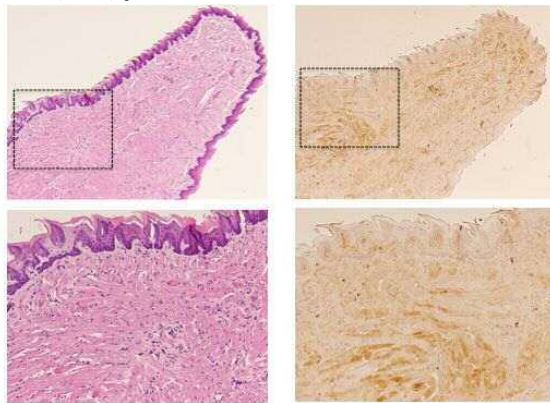
舌筋由来 Sca-1 陽性細胞から分化誘導された骨芽細胞様細胞における骨芽細胞マーカー、骨形成マーカーの発現を Western blotting にて評価する。

(6) 骨再生の足場に骨芽細胞様細胞を注入した場合の骨再生の経時的観察および検討

ヌードマウスの背中に scaffold を埋入し、その中に骨芽細胞様細胞を注入後、骨再生の状態を経時的、組織学的に評価、検討を行う。

4. 研究成果

マウス舌筋には Sca-1 蛋白の発現が認められた(図 1)。



HE染色

免疫組織染色

図 1 マウス舌筋におけるSca-1蛋白の発現

マウス舌筋から舌筋由来 Sca-1 陽性細胞は、筋細胞の 4.0%以上採取可能であった(図 2, 3)。

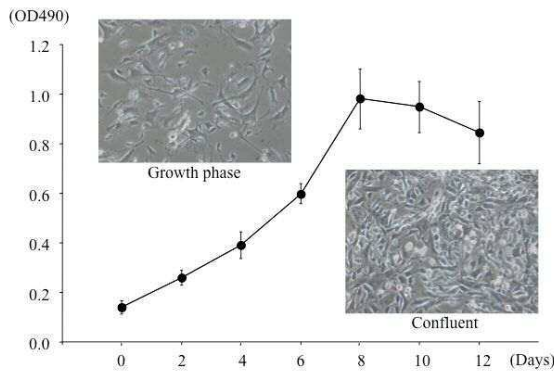


図 2 マウス舌筋由来Sca-1陽性細胞の増殖

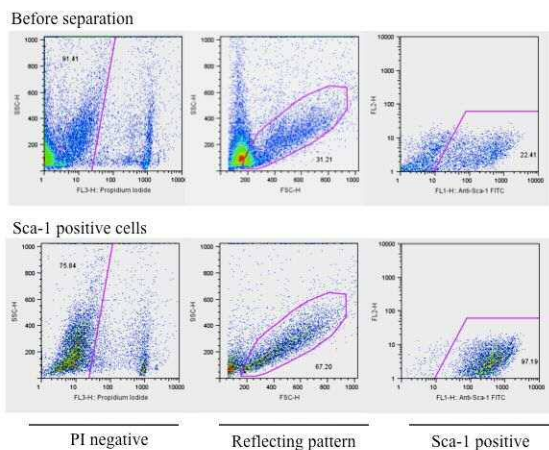


図 3 フローサイトメトリー

舌筋由来 Sca-1 陽性細胞を骨分化誘導培地処理することにより、間葉系幹細胞マーカー Sca-1 は 5 日目以降、c-kit は 7 日目以降に発現減弱を認め、前骨芽細胞マーカー Osterix は 3 日目まで発現増強し 5 日目以降発現減弱を示し、分化のマスター遺伝子

RUNX2 は 5 日目まで発現増強し、7 日目以降発現減弱を示した。接着因子 Fibronectin は 7 日目まで発現増強し、骨関連蛋白である Osteocalcin は 7 日目以降 21 日目までにその発現を認め、Osteonectin は 10 日目以降 21 日目まで発現増強し、Osteopontin は 10 日目以降 21 日目まで発現増強を示した(図 4)。

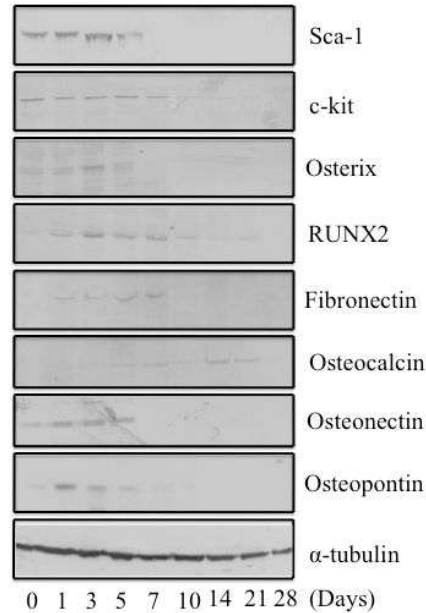


図 4 ウェスタンブロッティング

また骨芽細胞マーカー Alkaline phosphatase の活性は 10 日目まで上昇し、以降低下した(図 5)。

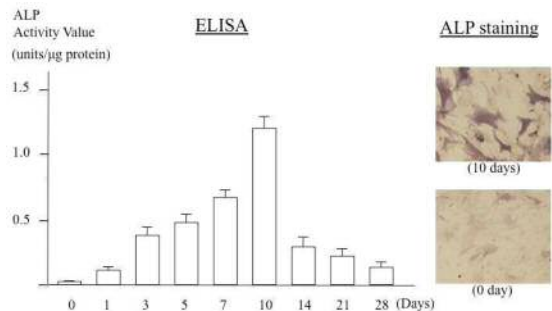


図 5 アルカリフォスファターゼの活性

さらに Sca-1 陽性細胞の骨分化誘導培地 4 週間処理ではアリザリンレッド S ならびに von Kossa 陽性の石灰化細胞外基質の形成が認められた(図 6)。

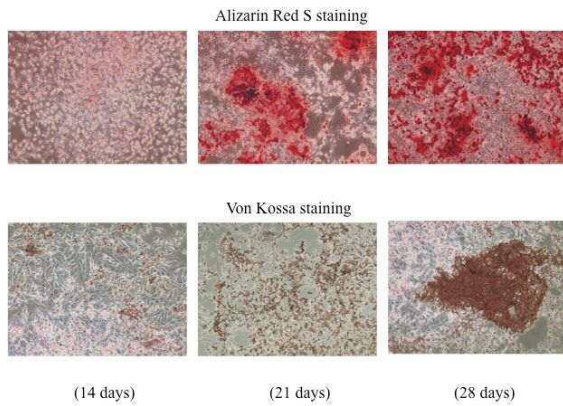


図6 石灰化細胞外基質の形成

以上の結果からマウス舌筋由来 Sca-1 陽性細胞は、骨芽細胞への分化能を有しており、骨再生に有用である可能性が示唆された。そこで、ハイドロキシアパタイト+乳酸系ポリマーハイブリッド材料 (GC 研究用 scaffold) や、ハイドロキシアパタイト骨補填剤 (Neobone®)、さらにわれわれが開発した多孔性炭酸アパタイトフォームと共に Sca-1 陽性細胞を培養し、骨分化誘導培地を用いて分化誘導させ、4 週齢 Balb/c ノードマウス背部皮下へ移植し骨組織再生を試みたところ移植後 4W、8W、12W の時点では、血管に富んだ骨髄様組織は見られたものの骨組織の形成は認められなかった。次に、マウス舌筋由来 Sca-1 陽性細胞を β -TCP ゼラチンスポンジ (MedGel®) と共に培養し、骨分化誘導培地を用いて分化誘導させ、4 週齢 Balb/c ノードマウス背部皮下へ移植し骨組織再生を試みたところ、移植後 28 日目の時点で骨様組織の形成を認めた。またこの骨様組織を免疫組織学的に検索したところ Osteocalcin、Osteonectin、陽性であった(図 7)。

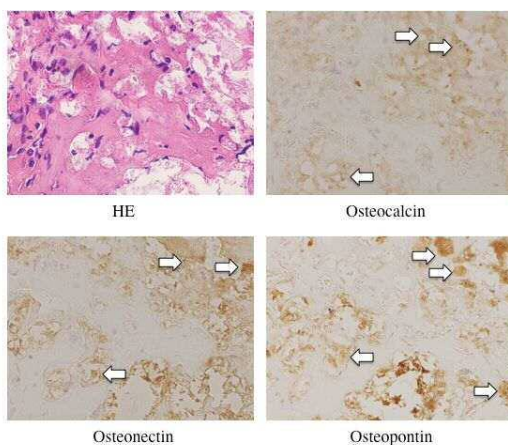


図7 ノードマウス背部皮下における骨様組織の形成

臨床で用いられている骨髄組織由来の間葉系幹細胞は骨髄組織採取による侵襲が大きい、舌筋由来幹細胞は舌筋の採取が比較的簡便かつ低侵襲であり、骨再生医療の向上に大きく貢献できると考えられた。

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 3 件)

① Koji Harada, Yasutaka Itashiki, Takanori Takenawa, Toyoko Harada, Yoshiya Ueyama. Basic investigation of regenerative therapy for bone using Sca-1 positive cells derived from mouse tongue muscle.

20th Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery September 14, 2010, Bruges, Belgium

② 板敷康隆, 原田耕志, 竹縄隆徳, 加藤芳明. 上山吉哉. マウス舌筋由来幹細胞を用いた骨再生医療に関する基礎的研究. 第 9 回日本再生医療学会総会 2010. 3. 19 広島国際会議場, 広島

③ 原田耕志, 板敷康隆, 竹縄隆徳, 加藤芳明. 上山吉哉. マウス舌筋由来幹細胞を用いた骨再生医療に関する基礎的研究. 第 56 回日本口腔外科学会総会 2009. 10. 11. 札幌コンベンションセンター, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上山 吉哉 (UEYAMA YOSHIYA)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00168668

(2) 研究分担者

原田 耕志 (HARADA KOJI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60253217

板敷 康隆 (ITASHIKI YASUTAKA)
山口大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70530236