

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17042

研究課題名（和文）骨髄間葉系幹細胞をターゲットとした骨質改善治療法の開発

研究課題名（英文）Development of Bone Quality Improvement Therapies Targeting Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

國友 由理（Kunitomo, Yuri）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30837381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：口腔インプラント治療の成功には骨量と骨質が重要であり骨粗鬆症患者に対して骨質改善が求められている。これまでに我々はトリプトファンが骨髄間葉系幹細胞（MSCs）の幹細胞性維持に関与することを発見した。本研究では、そのメカニズム解明を試みた。その結果、キヌレニンがトリプトファンの代謝産物として、幹細胞性維持に関与し、骨再生や骨質の改善に関与していることが明らかとなった。また、RNA-seq解析にて、老化に伴うMSCsの質的に大きく変化していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は骨髄MSCsを対象としているが、本知見が他の組織に存在する組織幹細胞にも有効であれば、骨粗鬆症のみならず、加齢と関連して発症する歯周病、変形性関節症、認知症等の予防や病態改善に貢献する可能性を有している。このような点から、本研究は創造性が高く、社会的意義も大きい。本研究が成就すれば、ステムセルエイジングの制御に向けた大きなブレイクスルーとなることに疑いの余地はない。さらに、高齢化社会において、健康寿命の延伸や生活の質の向上に寄与し、医療費削減にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The success of dental implant treatment depends on bone quantity and quality, necessitating bone quality improvement for patients with osteoporosis. We previously discovered that tryptophan plays a role in maintaining the stemness of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs). In this study, we aimed to elucidate the mechanism behind this phenomenon. Our results revealed that kynurenine, a metabolite of tryptophan, is involved in maintaining stemness and contributes to bone regeneration and improvement in bone quality. Furthermore, RNA-seq analysis indicated significant qualitative changes in MSCs associated with aging.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨 老化 間葉系幹細胞

て様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント治療は、人工歯根が歯槽骨や顎骨と結合することにより強固な骨支持を得るため、口腔インプラント治療の成功には、骨量と骨質が重要な因子となる。しかし、日本人は欧米人と比べ歯槽骨が解剖学的に菲薄で、インプラント体埋入のために骨造成が必要な場合も少なくない。また、高齢化に伴い増加している骨粗鬆症患者に口腔インプラント治療が必要となる場合も多い。そのため、多くの研究者が骨造成や骨質改善に関する研究を進めてきた。

一方、近年、加齢が引き起こす疾患群に共通する本質的変化として、ステムセルエイジング（幹細胞老化）が注目されるようになった。我々の研究グループは、骨髄中の間葉系幹細胞（MSCs）が、組織の恒常性維持に寄与するのみならず、全身の免疫や炎症を調節するために重要な働きをなすことを明らかにした（Akiyama et al., *Cell Stem Cell*, 2012）。そして、加齢に伴い、この骨髄 MSCs の免疫調節能が著明に低下すること、さらには、骨芽細胞分化能が低下し脂肪細胞分化に偏向するため、海綿骨量が減少し脂肪髄を呈することを報告してきた（Aung, Ono et al., *IJMS*, 2020）。したがって、幹細胞性の高い MSCs のフラクショナルをいかに保つかが、加齢性疾患（骨粗鬆症、歯周病、サルコペニア等）の予防と治療に寄与するものと考えられる。このような学術的背景の中で申請者らは、骨のリモデリングにおいて重要な働きを担っている骨芽細胞や破骨細胞ではなく、骨髄内に存在し骨/骨髄という組織全体の老化に関与する骨髄 MSCs に焦点を置き、骨質改善を目的とした研究を進めてきた。

そして、申請者らは、最終的な臨床応用を見据えてサプリメントや日常生活から摂取可能な必須アミノ酸に着目し、骨髄 MSCs の幹細胞性維持に関わる新規因子の同定を目的に *in vitro* にてスクリーニングを行った。その結果、必須アミノ酸の一つであるトリプトファンが骨髄 MSCs の幹細胞性維持に関わる新規因子として同定された（特願 2015-69222『骨形成促進剤』）。

具体的には、*in vivo* におけるトリプトファンの効果を検討するため、トリプトファンを全身投与したマウスから採取した骨髄 MSCs の解析を行った。その結果、コントロール群の骨髄 MSCs と比較し、幹細胞性の指標であるコロニー形成能（右図）および細胞遊走能が高く、また、骨芽細胞への分化指向性が高く脂肪細胞への分化指向性が低いことが明らかとなった。さらに、トリプトファン投与群はコントロール群と比較し大腿骨の海綿骨骨塩量、海面骨体積率が増大しており、骨の創傷治癒に与える影響を検討したところ、トリプトファン投与群では骨の創傷治癒が促進されるという大変興味深い結果が得られた。しかし、骨髄老化において、このトリプトファンがどのようなメカニズムで骨髄間葉系幹細胞の幹細胞性維持・促進に関わっているのか、未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、トリプトファンの幹細胞性維持メカニズムを明らかにするとともに、骨髄由来間葉系幹細胞の老化制御メカニズムの解明することである。

3. 研究の方法

キヌレニンとは、トリプトファンの代謝産物の一つである。そこで、本研究では、キヌレニンが骨代謝に与える影響を検討した。

(1) キヌレニンの全身投与が骨の創傷治癒に与える影響の検討

キヌレニンを 7 日間毎日腹腔内投与した 5 週齢雌性 C57BL/6 マウス大腿骨の膝関節から中枢側に 5 mm の位置に歯科用ラウンドバーを用いて骨髄腔内に達する直径 1 mm の骨欠損を作製した。その後、14 日間毎日キヌレニンの腹腔内投与を行った。骨欠損作製 14 日後に大腿骨を回収し、micro-computed tomography (micro-CT) にて解析を行った。

また、大腿骨のサンプルは4%パラホルムアルデヒドにて固定した後、通法に従い、脱灰点パラフィン包埋し、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を行い、顕微鏡下で観察した。

(2) キヌレニンの全身投与が骨質に与える影響の検討

5週齢雌性C57BL/6マウスにキヌレニンを21日間毎日腹腔内投与した。投与21日後にマウス的大腿骨を回収し、micro-CTにて解析を行った。解析対象は、大腿骨顆部成長板から1mm近位の位置を遠位端とし、海綿骨の骨塩量(Bone Mineral Density; BMD)、海綿骨体積率(Bone Volume/Tissue Volume; BV/TV)を計測した。

(3) RNA-seqを用いた骨髄老化メカニズムの検討

若齢マウスおよび老齢マウスから骨髄細胞を採取し、間葉系幹細胞をセルソーターにて単離、RNA-seqによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1) キヌレニン全身投与が実験的骨欠損の創傷治癒に与える影響

マウス大腿骨骨欠損モデルを用いて、キヌレニンが骨再生に与える影響を検討した。micro-CT解析の結果、キヌレニン投与群は骨欠損作製部位に、対照群と比較して著名なX線不透過像が観察された。定量解析の結果、キヌレニン投与群において有意に骨が再生していた。また、組織学的解析の結果、キヌレニン投与群では対照群と比較して、再生骨が多数観察された。

(2) キヌレニン全身投与がマウス大腿骨海綿骨量に与える影響

キヌレニンの全身投与が大腿骨海綿骨量に与える影響を検討するため、上記の実験同様、21日間マウス腹腔内にキヌレニンを投与したマウスより大腿骨を回収し、micro-CTを用いて骨形態計測学的に評価した。その結果、キヌレニン投与群は対照群と比較して、大腿骨の海綿骨量の増加を認めた。定量解析の結果、Bone Mineral Density量、Bone Volume/Total Volumeが有意に増大していた。

(3) RNA-seqを用いた骨髄老化メカニズムの検討

若齢マウス骨髄由来骨間葉系幹細胞と老齢マウス骨髄由来骨間葉系幹細胞を用いたBulk RNA-seq解析を行った。下図に、heat mapおよびvolcano plotの結果を示す。Gene Ontology解析およびPathway解析を実施した結果、老化が原因で、間葉系幹細胞に質的变化が生じていることが明らかとなった。

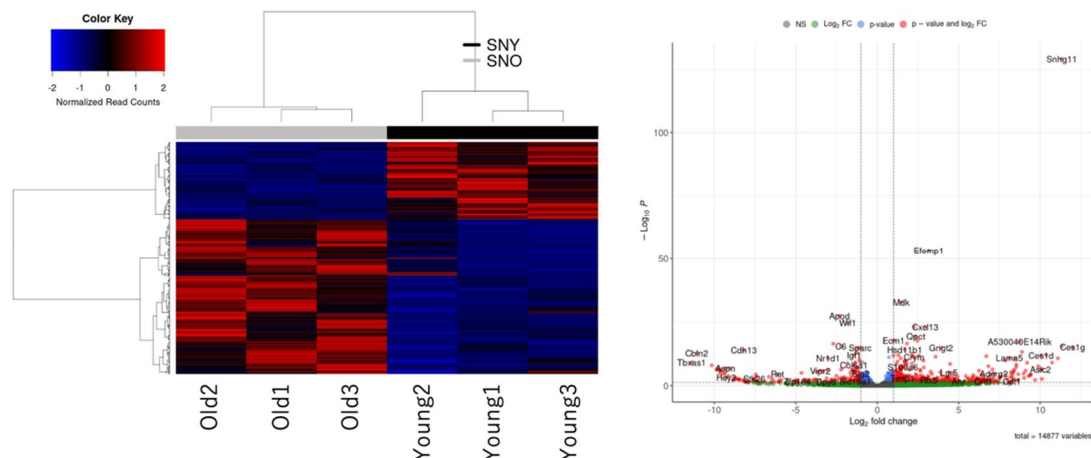


図. Bulk RNA-seqのheat mapおよびvolcano plotの結果を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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