

## 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 25年 5月 17日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890136

研究課題名（和文）顎骨骨髓に由来する未分化間葉系幹細胞の骨誘導能の解析と顎裂閉鎖治療への応用

研究課題名（英文）Analysis of bone regeneration by mesenchymal stem cells from jaw bone and application for the treatment of jaw cleft

研究代表者

吉岡 基子 (YOSHIOKA MOTOKO)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：00612003

研究成果の概要（和文）：顎骨由来の間葉系幹細胞（MSC）採取と培養に関して、少量でも安定した採取と初代培養が可能となった。細胞増殖能や骨芽細胞への分化能に関しては、腸骨由来MSCと比べて遜色は認められなかった。また、口蓋裂ビーグル犬を用いた in vivo での骨再生についての検討では、実験側である顎骨由来MSCと炭酸アパタイト担体、対照側である腸骨由来MSCと炭酸アパタイト担体との間に特別な差異は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：A collection and a primary cell culture even little steady of mesenchymal stem cell (MSC) derived from jaw bone became possible. No significant differences in the cell proliferation and the differentiation in osteoblasts between MSCs from iliac bone and jaw bone. Moreover, any significant differences were not shown between the experimental side, jaw bone origin MSC mixed with the carbonated hydroxyapatite particles and the control side, iliac origin MSC with the carbonated hydroxyapatite particles in vivo experiment for bone regeneration on the beagle dogs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：顎骨由来MSC、口唇裂・口蓋裂、骨再生、再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

口蓋裂では、胎生期における顔面突起の癒合不全に起因する顎裂を特徴とし、構音障害や顔面の変形が認められる。顎裂の存在により歯列の連続性が失われ、上顎歯列弓の狭窄や先天的な歯の欠損、歯の位置異常による様々な不正咬合を発症し、矯正歯科治療が必要となることが多い。さらに、骨架橋の確立や歯槽堤の形成、鼻口腔瘻の完全閉鎖などを目的

として、大多数の症例で学童期に顎裂部への腸骨移植が行われる。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は患者の大きな負担となり、長期入院の必要性や腸骨採取後の疼痛とそれに伴う歩行障害など、数々の問題が伴うのも現実である。そこで我々は以前より顎裂部の骨再生に腸骨由来MSCを利用する検討を行い、安定した結果を得てきたのであるが、顎口腔領域に限局した、より低侵襲な骨再生

を目指し、顎骨骨髓に着目した。顎骨骨髓由来 MSC は長管骨骨髓由来 MSC とは異なる性質を有しているという報告があり、顎口腔領域の再生医療における応用が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では顎骨由来 MSC と腸骨由来 MSC の性質の違いを詳細に比較検討し、さらに顎骨由来 MSC と炭酸アパタイト担体を組み合わせて顎裂部骨再生に用いることの有効性を明らかにすることを目的とした。その際、少なくとも腸骨由来 MSC を応用したものの結果と同程度の結果を得られることを目指した。最終的には、顎骨由来 MSC を応用した、より低侵襲に口蓋裂患者顎裂部の骨再生法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 顎骨骨髓由来 MSC の炭酸アパタイト上での代謝に関し、初期接着性および細胞増殖能について *in vitro* により検討を行う。

(2) これまでの *in vivo* 実験により、移植後の炭酸アパタイト担体周囲の吸収窩において破骨細胞の発現が認められ、MSC の存在により炭酸アパタイトの吸収が亢進した。その理由として MSC による破骨細胞の誘導、活性化が推察される。本仮説を検証するために、MSC と歯骨前駆細胞である造血幹細胞の共培養を行い、破骨細胞の分化や骨吸収活性に対して MSC が及ぼす影響について検討する。

(3) *In vivo* では、顎骨由来 MSC および炭酸アパタイト担体の移植による顎裂部再生の検討を行う。実験にはビーグル犬両側顎裂モデルを用いる。顎骨由来 MSC と炭酸アパタイトで構成される移植体を作製し、顎裂部の骨再生を誘導し、再生骨の評価を行う。骨解析は組織切片を作製し、血管新生数の計測や、破骨細胞の染色、新生骨の染色などにより評価を行う。また、各種骨代謝マーカーの発現について、免疫組織学的検討を行う。

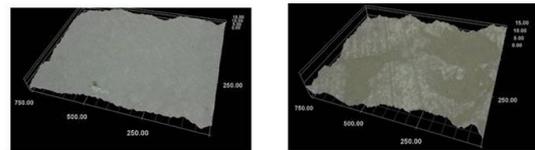
## 4. 研究成果

(1) 顎骨骨髓から、低侵襲にかつ安定した量の MSC を回収するために、骨髓採取手技および、顎骨骨髓由来 MSC 培養方法の確立を行う必要があった。従来の腸骨に比して、形態的に薄い顎骨は骨髓が乏しく、そこから採取できる骨髓液の量は非常に少ない。さらに、骨髓液中の MSC 存在率も低く、その結果、移植用細胞の単離成功率は大幅に低下した。また、細胞の初期接着率は腸骨由来 MSC に比して有意に低く、初期培養成功率に関しても大幅な低下を生じた。

そこでまず、顎骨からの骨髓採取場所、採取方法および培養手技についての徹底した

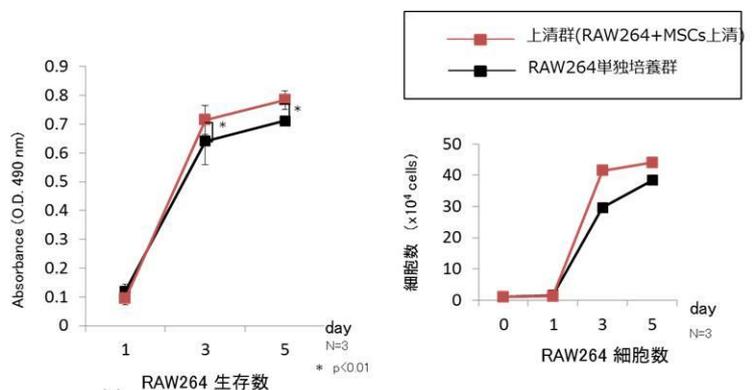
検討を、ビーグル犬を用いて行う必要が生じた。骨髓採取に使用するツールや培養液に至るまで、従来の腸骨に対するものから再検討を行った結果、主に使用するツールの素材を変更することで、骨髓液が効率よく確実に採取可能となった。また、細胞の初期培養時に使用する培養液の種類を変更し、従来の手技に若干の変更を加えることで、安定した細胞初期培養が行えるようになった。同じ骨髓由来でも、腸骨由来のものと同様に顎骨由来のものとは性質がやや異なり、同一の手法では扱えないことが明らかとなった一方で、顎骨骨髓から安定した MSC の単離・培養手技を確立できたことは、今後の検討にとって有益であった。

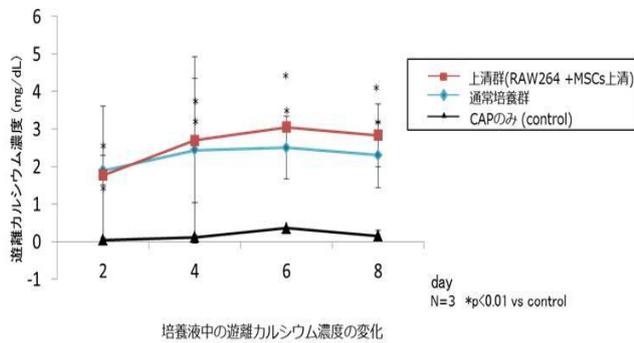
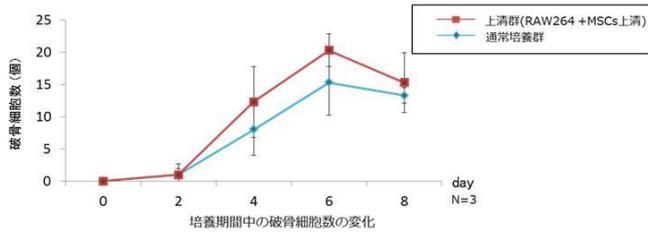
(2) 採取・初期培養時の細胞取扱いに関する違いを除けば、腸骨骨髓由来 MSC と比して、その後の細胞増殖能や骨芽細胞分化能に顕著な違いは確認されなかった。また、初期培養以降の細胞接着性に関しても、両者の間に大きな違いは認められなかった。さらに、炭酸アパタイト担体との培養に際しても、通常培養と比して変化は認められなかった。



実培養前後のCAPディスク表面の変化 左図: 培養開始 右図: RANKL添加後8日目

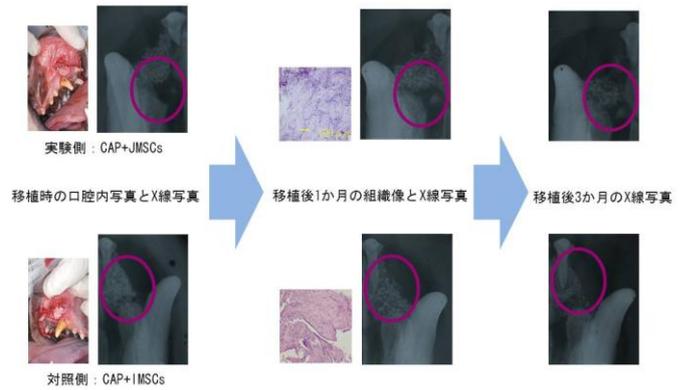
(3) 破骨細胞前駆細胞を MSC 培養上清で培養した結果、通常培養液で培養を行ったものに比して、有意に高い増殖能を示した。また有意差は認められなかったものの、細胞生存数に関しても高い傾向が認められた。MSC は破骨細胞の生存に対して何等かの影響を及ぼす可能性が示唆されたが、環境依存性などの条件について今後さらなる検討が必要である。



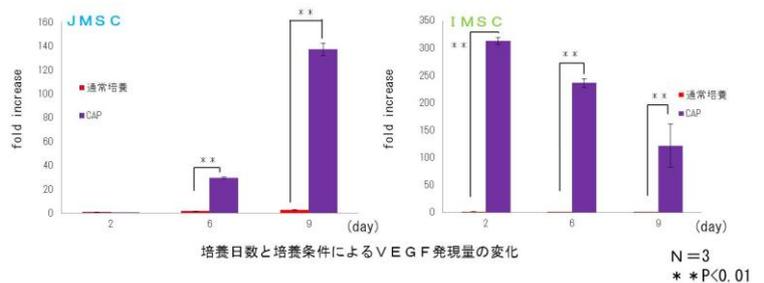
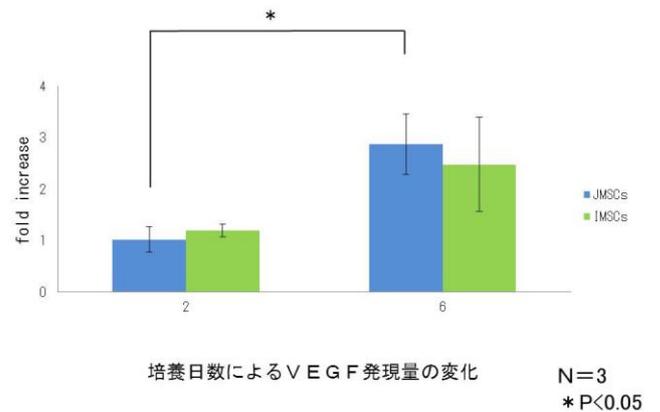


(4) In vivo では、顎骨由来 MSC と炭酸アパタイト担体を組み合わせた移植体を作製し、口蓋裂モデルビーグル犬の上顎顎裂部に移植を行った。実験側には顎骨由来 MSC と炭酸アパタイト担体を、対照側には腸骨由来 MSC と炭酸アパタイト担体をそれぞれ移植し、骨再生を誘導した。腸骨由来 MSC と炭酸アパタイト担体の移植は、以前より本研究チームで検討を行い、安定した成績と国内外における評価を得ているが、それと比しても、実験側の骨再生自体に遜色は認められなかった。

再生骨部について血流量の測定を行ったところ、実験群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。X線写真上でも同様に差異は認められなかった。本研究期間中に組織標本の作製と病理組織学的検討まで達成されなかった。そのため血管数の測定や新生骨の組織学的なデータを得ることができなかったが、現在引き続きデータを回収中である。今後さらにN数を増やして検討するとともに、再生骨への歯の移動により、再生骨の代謝について検討を行う必要がある。



(5) in vivo での骨再生が研究期間内に終了できない見込みであったため、新生骨と関連が強いと考えられた新生血管数に関して、in vitro にてリアルタイム PCR 法を用いた検討を行った。その結果、MSC の一部が血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を発現しているというデータを得ることができた。さらに詳細な細胞の性質について検討を行うため、FACS 解析を行った。CD105, 29, 44, 73 陽性、CD34, 45 陰性という結果を得ることができたが、現時点までに VEGF の分泌機能を有するものに特徴的とされる結果を得ることができていない。今後さらなる手法の改善が必要と思われる。



(6) 腸骨骨髓からのMSC採取は、歯科医師にとってハードルが高く、またその管轄外である。しかしながら顎骨骨髓からの細胞採取であれば、皮膚に傷を付けることなく、チェアサイドで局所麻酔のみで歯科医師が行うことが可能となる。骨再生誘導能において腸骨由来MSCと遜色がなければ、現在の方法に比べてはるかに低侵襲に顎裂部の骨再生が行えることとなり、再移植や顎裂の大きな症例など、従来の方法では手術の困難であった患者にも適応範囲が広がる可能性がある。顎骨からの安全で確実な細胞採取と適切な細胞培養、および骨再生法についての検討は、今後さらに詳細に進めていく必要があると考えられる。

#### 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)

[雑誌論文] (計1件)

1. 吉岡基子、谷本幸太郎、丹根由起、鷺見圭輔、栗田哲也、沖奈苗、杉山勝、加藤幸夫、丹根一夫、Bone regeneration in artificial jaw cleft by use of carbonated hydroxyapatite particles and mesenchymal stem cells derived from iliac bone、International Journal of Dentistry、査読有、2012、2012:352510

[学会発表] (計6件)

- ① 沖奈苗、谷本幸太郎、吉岡基子、鷺見圭輔、丹根一夫、口蓋裂治療における骨髓由来間葉系幹細胞の役割、第37回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2013年5月30日～31日、佐賀市
- ② 吉岡基子、谷本幸太郎、丹根由起、鷺見圭輔、沖奈苗、杉山勝、丹根一夫、Bone Regeneration by use of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Jaw Cleft: Part II, Orthodontic Tooth Movement into the Regenerated Bone Area、8th Asian Pacific Orthodontic Conference、2012年11月29日～12月2日、New Delhi、INDIA
- ③ 谷本幸太郎、吉岡基子、鷺見圭輔、沖奈苗、坂井裕大、杉山勝、丹根一夫、Bone Regeneration by use of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Jaw Cleft: Part I, Evaluation of a New Carbonated-hydroxyapatite Scaffold、8th Asian Pacific Orthodontic Conference、2012年11月29日～12月2日、New Delhi、INDIA
- ④ 沖奈苗、谷本幸太郎、吉岡基子、鷺見圭輔、杉山勝、丹根一夫、骨髓由来間葉系幹細胞を用いた顎裂閉鎖治療：顎骨骨髓

有用性、第36回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2012年5月24日～25日、京都市

- ⑤ 吉岡基子、他、骨髓由来未分化間葉系幹細胞を用いた顎裂部の骨再生と再生骨への歯の移動、第70回日本矯正歯科学会大会&第4回国際会議、2011年10月18日～20日、名古屋市
- ⑥ 丹根一夫、吉岡基子、鷺見圭輔、丹根由起、谷本幸太郎、Bone regeneration in the treatment of bone defect in the cleft lip and palate patients with mesenchymal stem cells、87th Congress of the European Orthodontic Society、2011年6月19日～23日、Istanbul、Turkey

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉岡 基子 (YOSHIOKA MOTOKO)  
広島大学・病院・歯科診療医  
研究者番号：00612003

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：