

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792145

研究課題名(和文) Muse細胞を用いた早期成熟骨再生法の開発

研究課題名(英文) Stress-enduring cells from oral tissues for bone engineering

研究代表者

田島 暢崇 (Tajima, Nobutaka)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：00447492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、虚血環境下で機能を発揮し得る耐ストレス性の細胞を抽出し、それを自己fibrin gelに応用することで、予知性の高い骨再生法を開発することである。細胞源は歯科医が比較的アクセスしやすい歯根膜に求め、ヒト歯根膜細胞の培養中に短期間の重度低酸素環境下に細胞を晒すことで、耐ストレス性幹細胞群を抽出した。この細胞群は、未分化細胞関連因子を高発現しており、抽出後に再酸素化した条件下で骨、軟骨、脂肪の各成熟細胞への高い可塑性を発揮した。特に骨芽細胞分化への誘導性は高く、ラット頭蓋骨欠損モデルにおける移植実験においても、この細胞群とfibrin gelの複合体は生体内で高い骨誘導性を示した。

研究成果の概要(英文)：Human periodontal ligament cells were exposed to severe hypoxic ($O_2 < 0.1\%$) condition in culture to isolate the stress-enduring cells for bone engineering. Cells survived under this condition for 12 hours showed the high expression of pluripotent stem cell markers as well as mesenchymal stem cell markers, and also displayed the highest pluripotency in vitro. In particular, these surviving cells after re-oxygenation could form abundant calcified-nodules in osteogenic medium. Furthermore, a complex with these stress-enduring cells and fibrin-gel showed the remarkable osteoinducibility in vivo.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：骨再生 ストレス耐性 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、上顎洞底挙上術の際には、自家骨移植の他、骨補填材の移植、あるいはそれらの混合移植が広く行なわれている。しかし、自家骨移植は2次的外科侵襲を必要とし、また骨補填材移植は骨形成能が十分とは言い難いのが現状である。

最近、Stefanらは自家骨や骨補填材などの移植を必要とせず、挙上した上顎洞粘膜下へ血餅を満たすことで、スペースメイキングを行い、骨再生を誘導する新しい上顎洞底挙上術を提案した(Periodontol 2000. 2008;47:193-205)。しかしながら、再生された骨組織は不安定で、術後早期に吸収しやすいため(Br J Oral Maxillofac Surg. 2005 43:493-9)、本法はさらなる改善が必要である。ただし、骨再生に血液以外の移植材を必要としないことは、大きな魅力である。

われわれも以前より、上記の研究で主体となった血餅、すなわち fibrin gel の骨再生の足場としての可能性について着目し、実験を行ってきた。われわれが過去に行なった自己 fibrin gel と bone marrow-derived stem cells(BMSCs)の移植実験では、fibrin を用いた場合、fibrin gel を足場として旺盛な新生骨が全体的に形成されることが明らかになっている(Tajima et al. Materials Science and Engineering C, 2007;27:625-32)。さらに fibrin gel を足場とした *in vitro* の培養系でも、骨芽細胞系への分化が促進されていることが確認された。このことから、細胞を組み込んだ fibrin gel の移植により早期の骨形成が期待でき、インプラント治療における治療期間の短縮へとつながるのではないかと考えた。しかしながら、大きな骨欠損部に対して BMSCs を用いた移植を行う場合、移植した細胞のうちの多くは生存困難である。効率的に良好な骨再生を行うためには、より早い新生血管形成と移植した細胞への栄養の供給を実現させ、細胞の viability を向上させることが不可欠である。

一方、近年ヒトの皮膚や骨髄に、ストレスに強い多能性幹細胞である Multilineage differentiating Stress Enduring cells (Muse cells) が存在することが報告された。(Proc Natl Acad Sci U S A. 2010, 11;107:8639-43; 2011, 14;108:9875-80)。Muse 細胞は、ES 細胞や iPS 細胞に比べて増殖率は低いものの、癌化の危険性が低く、再生医療における新たな cell source として注目されている。そこで、fibrin gel を足場として Muse 細胞のようなストレス環境下に強い細胞を取り込み作製したストレス耐性幹細胞 / fibrin 複合体を、上顎洞底挙上術の際に移植することを考えた。即ち、強い viability を示す幹細胞により、骨 / 血管系双方の形成が促進されると考えられ、さらに、fibrin gel がスペースメイキングの役目を果たすことで、より確実に早期の骨形成が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血環境のようなストレスに耐性を持ち、骨芽細胞系と血管内皮細胞系の両方に分化することができる多能性幹細胞 (Muse-like cells) と自己 fibrin gel の二つを応用することで、骨の成熟期間を短縮し、かつ予知性が高い骨再生法を開発することである。

3. 研究の方法

本研究では、下記の3つの順に実験を行なうことを計画した。

ストレス耐性幹細胞の細胞源は、歯科医が容易にアクセスできる歯根膜組織に求めることにした。歯根膜組織より単離した間葉系細胞の培養に低酸素刺激を応用することで、より未分化な幹細胞の抽出を試み、その抽出条件を確立する。われわれは、歯髄の間葉系幹細胞(MSCs)を重度低酸素下にて培養すると、胚性幹細胞の維持に関わる初期化因子の発現が誘導されることを既に確認している (Agata H, et al. 2008)。

ストレス環境下に晒された細胞の可塑性を、骨、軟骨、脂肪への分化誘導を行なうことで評価する。

ストレス環境下で抽出された幹細胞と fibrin gel による複合体を動物に移植することで、複合体の生体での骨誘導性を評価する。

1) 歯根膜細胞の単離・培養；

ヒト歯根膜組織からコラゲナーゼとセルストレーナーを用いて細胞を単離した後、接着培養にて増殖させた。増殖した歯根膜細胞は、3 継代目まで培養を行なった。3 継代目の歯根膜細胞は、予め Vimentin や Stro-1 による免疫染色や、MSCs マーカーによるフローサイトメトリーの解析により、その特性解析を行なった。MSCs マーカーには、CD90, 105, 146, 271, 45, 34 や Stro-1 などの抗体を使用した。

2) 重度低酸素刺激によるストレス耐性幹細胞の抽出；

3 継代目まで培養した歯根膜細胞を、10cm dish に播種し、70%コンフルエントまで培養した後、培地から血清を除いた上で、 $O_2 < 0.1\%$ の重度低酸素環境下に細胞を置き、6, 12, 16, 18, 24, 48, 72 時間後の細胞の viability と生存細胞の特性を評価した。特性解析には、胚性幹細胞や MSCs に関連する因子の発現変化を評価した。その上で、細胞の viability が維持されると共に、最も幹細胞マーカーが上昇する時点を探り、ストレス耐性幹細胞群として、抽出することにした。

3) ストレス耐性幹細胞の可塑性の検討；
重度低酸素環境下で生存した細胞を回収し、再酸素化環境下において、改めて骨、軟骨と脂肪の各成熟細胞への分化誘導を行なった。

骨細胞への分化誘導には、0.1mM dexamethasone と 50mg ascorbate-2-phosphate、10mM b-glycerophosphate を添加したものの使用して、2週間培養を行なった。評価には、ALP 活性の計測と Alizarin Red 染色を使用した。

軟骨細胞への分化誘導には、TGF-β3 を添加した chondrogenic-induction medium を使用して、4週間ペレット培養を行なった。評価は、白色細胞塊の形成状態とその Toluidine blue 染色により行なった。

脂肪細胞への分化誘導には、0.5mM isobutyl-methylxathine と 1mM dexamethasone、10mM insulin、200mM indomethacin を添加した adipogenic-induction medium を使用して、3週間培養を行なった。評価は、Oil red O 染色により行なった。

4) ラット頭蓋骨欠損モデルへの移植；

Citrate phosphate dextrose 液を添加してラットより採血を行ない、血漿成分のみ採取し、それにストレス耐性幹細胞、あるいは骨分化誘導を行なったストレス耐性幹細胞を混和攪拌し、細胞浮遊液を作製した。そして、移植直前に塩化カルシウムを添加し、fibrin 網を形成させてストレス耐性幹細胞 / fibrin gel 複合体を作製した。

移植は、ラット頭蓋骨に直径 8mm の円形の骨欠損を形成し、複合体を移植した。移植試料は、移植後 2, 4, 8 週後に回収し、組織学的、免疫組織学的に骨の形成状態を評価した。

4. 研究成果

1) 歯根膜細胞の特性解析；

3 継代した歯根膜細胞は、Vimentin 陽性で、その一部に Stro-1 陽性細胞が認められた。フローサイトメリーによる解析では、MSCs マーカーの発現は、CD90; 90.17%、CD105; 25.73%、CD146; 3.49%、CD271; 1.11%、Stro-1; 8.72%、CD45; 0.21%、CD34; 0.04%であった。3 継代目の歯根膜細胞は、MSCs の混在した間葉系細胞の heterogeneous な細胞群であることが分かった。

2) ストレス耐性幹細胞の抽出；

O₂<0.1%の重度低酸素環境下に細胞を晒し、培養を継続したところ、生存細胞には、12~24 時間で CD105、CD166、Stro-1 などの MSCs マーカー陽性の細胞群が濃縮され、さらに多能性幹細胞のマーカーである Oct4、Sox2 や Nanog の発現上昇が認められた。しかしながら、16 時間以上の暴露によって、生存細胞数は顕著に減少し、通常酸素濃度に回復後もその生存性は有意に低くなることが分かった。一方、12 時間程度の暴露であれば、細胞の生

存性には大きな影響は認めず、上記の幹細胞マーカーの発現も 6 時間暴露と比較して有意に上昇を認めた。そのため、この条件にて heterogeneous な歯根膜細胞群からある程度均一な多能性幹細胞群が抽出可能であると考え、その可塑性を確認した後に、生体において骨誘導を試みることにした。

3) ストレス耐性幹細胞の可塑性の評価；

12 時間重度低酸素環境下に晒された歯根膜細胞を回収し、通常酸素濃度下において、骨、軟骨、脂肪の各成熟細胞への分化誘導を *in vitro* において試みた。その結果、これら全ての細胞系列への分化が確認されたものの、骨細胞への誘導性が特に高いことが分かった。

4) 頭蓋骨欠損モデルへの移植；

移植試料については、回収できた試料にて詳細な解析を行なっているところであるが、骨分化誘導を行なったストレス耐性幹細胞との複合体にて、組織学的に有意な骨形成を認めている。現在、移植の早期に回収した試料を含めて、骨形成量の解析と共に、骨芽細胞や血管内皮細胞の局在に着目し、詳細な解析を進めているところである。

以上のことから、歯根膜細胞を重度低酸素環境下におくことで抽出できる細胞群と自己 fibrin gel を応用することで、効果的に骨再生を誘導できる可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計1件)

1. Tajima N, Ohba S, Sawase T, Asahina I. Evaluation of sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using platelet-rich fibrin as sole grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants* (査読有), vol.28(1):77-83, 2013. DOI: 10.11607/jomi.2613.

[学会発表](計1件)

1. Tajima N, Ohba S, Sawase T, Asahina I. Evaluation of sinus floor augmentation with autologous fibrin clot in concentrated growth factors (CGF) as sole grafting material. 20th Annual Scientific Meeting of the European Association of Osseointegration (Denmark), 2012.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 暢崇 (Nobutaka Tajima)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00447492

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：