

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861994

研究課題名(和文)幹細胞を用いた顎骨再生に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study on bone regeneration with stem cells

研究代表者

福島 久夢 (FUKUSHIMA, Kumu)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：10632408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化過程における造血幹細胞と作用について検討を行った。間葉系幹細胞のみを移植した実験群および間葉系幹細胞と造血幹細胞継代数ごとに再生した骨量を比較したところ、継代が多いほど再生している骨量が少ないことが判明した。しかし、継代を重ねた間葉系細胞においても、造血幹細胞とともに移植することによって、新生した骨量が回復することが判明した。以上の結果から、造血幹細胞は、間葉系幹細胞に作用することで、間葉系幹細胞の分化能を増強している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the process of differentiation into osteoblasts of mesenchymal stem cells (MSCs) was examined. We co-transplanted MSCs with hematopoietic stem cells (HSCs) and investigated bone regeneration in mice. We found that co-culturing the MSCs and HSCs significantly improved MSCs expansion in vitro. More importantly, co-transplantation of MSCs and HSCs markedly increased the plasticity of the MSCs. Our study demonstrated that HSCs markedly accelerated the osteogenesis of MSCs and significantly improved bone formation on the critical size of osseous defect. Therefore, HSCs could have therapeutic value by improving the efficacy of clinical ossification in patients.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：歯学 幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂患者における顎裂欠損部の閉鎖は、正常な口腔機能を獲得するためにも重要な治療である。通常は、顎裂欠損部の閉鎖には、腸骨から採取した自家骨の移植が行われている。しかし、自家骨を採取するためには、侵襲の激しい手術を行わなければならない。さらに、自家骨の移植であっても、移植した骨が生着せずに吸収してしまう症例がたびたび見受けられる。

一方、幹細胞を用いた再生医療はさまざまな疾患において、治療法を一新させる可能性を秘めている。歯科領域においても歯牙や歯槽骨の再生の他に、唇顎裂・唇顎口蓋裂患者における顎骨再建術として画期的な治療法として確立することができれば、多くのメリットが見出されることになる。本研究では、幹細胞を用いた効率的な骨再生法について検討を行った。

全ての幹細胞は、特定の支持細胞による微小環境(ニッチ)によって、未分化な状態が維持されている。幹細胞の特性の一つである不均等分裂(一方は未分化の性質を保持し、他方は分化しているという)という分裂様式もニッチによる動態制御機構によるものと考えられている。幹細胞はニッチ細胞の制御状況に応じて必要な時に分化あるいは自己複製を調整し、必要な細胞を組織に供給している。本研究執行者は、このニッチによる動態制御機構を解明することが出来れば、効率的な骨組織の再生法を提示することが可能となると考え以下の仮説を立てた。骨髄には、造血幹細胞(hematopoietic Stem Cell: HSC)と骨髄由来間葉系幹細胞(Bone marrow Mesenchymal Stem Cell: MSC)の二種類の体性幹細胞が存在している。これら二種類の幹細胞は、それぞれ独立して制御されているのではなく、お互いに相互作用を及ぼすとしたら、MSCの骨組織への分化機転は、HSCによって制御されると考えた。

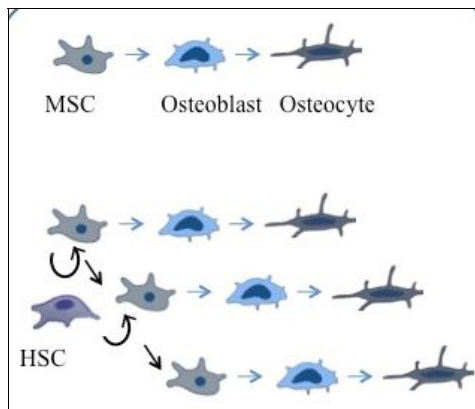


図1. 仮説の概略図 HSCがMSCと相互作用することによって、MSCの不均等分化を制御する。

### 2. 研究の目的

本研究では、MSCを用いた唇顎裂・唇顎口

蓋裂患者の骨組織再生療法を確立することおよびMSCの制御機構について解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) MSCおよびHSCの培養下における細胞増殖能の検討

C3H/He Slcマウスの脛骨および大腿骨骨髓より通法に従い、MSCの初代株を確立した。

C3H/He Slcマウス脛骨および大腿骨骨髓中の骨髓細胞をから、magnetic cell sorting (MACS) (CD105+ Sca-1+ LTR-)システムを用いてHSCを分離した。

単離したMSCとHSCをそれぞれの条件下における共存培養下における、colony forming unit fibroblast (CFU-F) assayを行い、細胞増殖能を検討した。

(2) MSCとHSCの培下におけるMSCの分化能についての検討

骨誘導培地を用いて通法に従いMSCとHSCとの骨芽細胞への分化能について検討した。ALP活性、フォンコッサ染色・アリザリンレッド染色による石灰化を検討した。

RT-PCRにて骨芽細胞の分化に關与する遺伝子である1(collagen、ALP、Runx2)のmRNAの発現について検討した。

脂肪細胞分化培地を用いて培養し、細胞の位相差顕微鏡による形態所見およびOil Red O染色により検討した。

(3) マウスの頭蓋骨への移植実験

マウスの頭蓋部に歯科用ドリルを用いて直径2mmの骨欠損を作成する。骨欠損部にMSCおよびHSCを多孔性炭酸含有アパタイト、第三リン酸カルシウム顆粒もしくは多孔性リン酸三カルシウムと共に移植した。

移植8週後に、移植体とその周囲組織を摘出した。摘出した移植体に形成された新生骨の状態について評価を行った。

また、継代を重ねたMSCについて、同様に新生骨の状態について評価を行った。

### 4. 研究成果

(1) MSCおよびHSCの培養下における細胞増殖能の検討

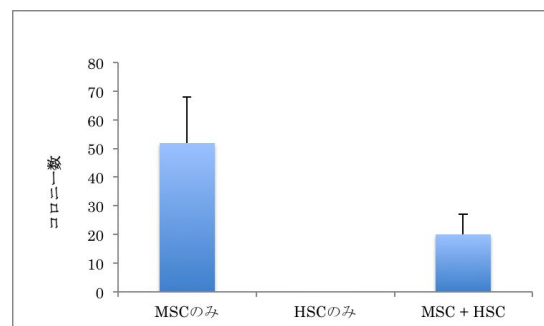


図2 CFU-Fの結果

図2のとおり、MSC単独培養およびMSCとHSCの共存培養において、コロニーを形成した。また、HSC単独培養では、コロニーの

形成を認めなかった。HSC は、MSC に作用することで、MSC の細胞増殖を抑制することを明らかになった。

(2) MSC と HSC の培養条件下における MSC の分化能についての検討

図 3 のとおり、骨誘導培地による分化能を評価した結果、MSC 単独培養および MSC と HSC の共存培養において、石灰化を確認した。また、HSC 単独培養では、石灰化を認めなかった。また、ALP 活性、フォンコッサ染色の結果も、同様の傾向が確認された。

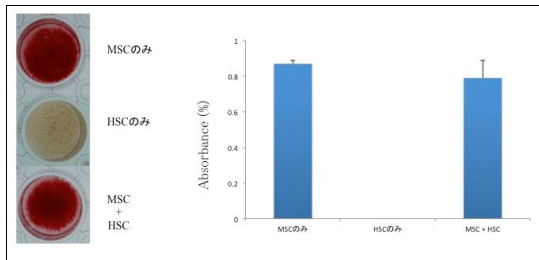


図 3 石灰化能の結果

図 4 は、骨細胞の分化に関与する遺伝子発現量についての結果である。MSC 単独培養と MSC と HSC の共存培養間において、関連遺伝子が発現していることが確認された。MSC 単独培養と MSC と HSC の共存培養間において、遺伝子の発現量に有意差は確認されなかった。

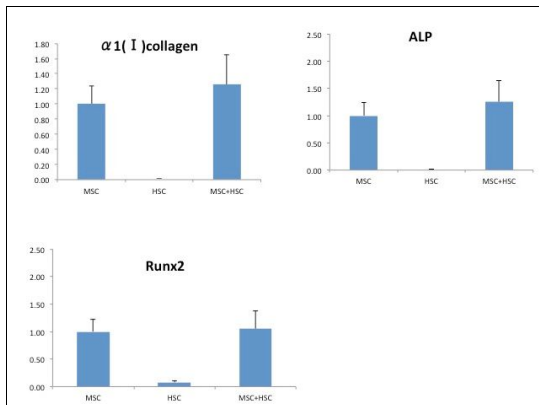


図 4 遺伝子発現量の比較

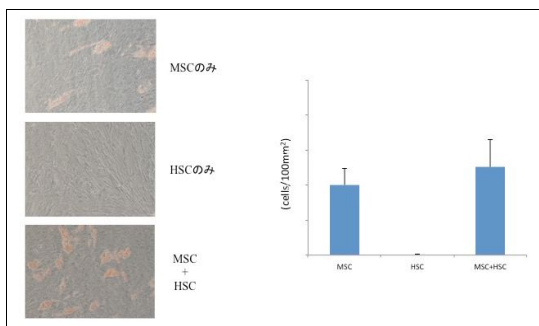


図 5 脂肪細胞誘導の結果

図 5 のとおり、脂肪細胞分化培地による

分化能を評価した結果、MSC 単独培養および MSC と HSC の共存培養において、脂肪細胞が誘導されることを確認した。また、HSC 単独培養では、脂肪細胞の誘導を認めなかった

(3) マウスの頭蓋骨への移植実験

多孔性炭酸含有アパタイトのみを移植した実験群と、HSC のみを移植した実験群では、骨組織の再生はみられなかった。一方、MSC を移植した実験群では、多孔性炭酸含有アパタイトの周囲に層板状の新生骨の再生が確認された。MSC と HSC を同時に移植した実験群では、MSC のみを移植した実験群と比較して、有意に多くの骨組織が形成されており、形成された骨組織は活発な骨のリモデリングが活発に行なわれと思われる網状構造を呈していた。

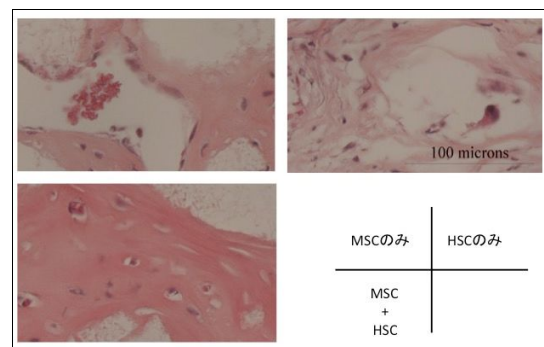


図 6 頭蓋部に新生した骨様組織

継時的に再生した新生骨の状態について検討を行った結果、間葉系幹細胞のみを移植した実験群では、1 ヶ月後には移植した第三リン酸カルシウム顆粒の周囲にわずかに石灰化が幼若な骨様構造物が確認されたが、第三リン酸カルシウム顆粒は吸収されずに残留していた。2 ヶ月後には第三リン酸カルシウム顆粒の粒径の減少が認められ、第三リン酸カルシウム顆粒の周囲に石灰化が亢進した骨様組織が新生していることが確認された。一方、MSC とともに HSC を移植した実験群では、すでに 1 ヶ月後において第三リン酸カルシウム顆粒の吸収と、第三リン酸カルシウム顆粒周囲に成熟した骨様組織が新生していることが確認された。

初代培養を行った MSC に対して継代培養を継続した。様々な継代数の MSC をそれぞれ多孔性リン酸三カルシウムとともに移植した。移植 2 か月後、骨欠損部に再生した骨組織の解析を行った。継代数ごとに、再生した骨量を比較したところ、継代数が多いほど再生している骨量が少ないことが判明した。しかし、継代数が多い MSC においても、HSC と同時に多孔性リン酸三カルシウムとともに移植することによって、再生した骨量が回復することが判明した。

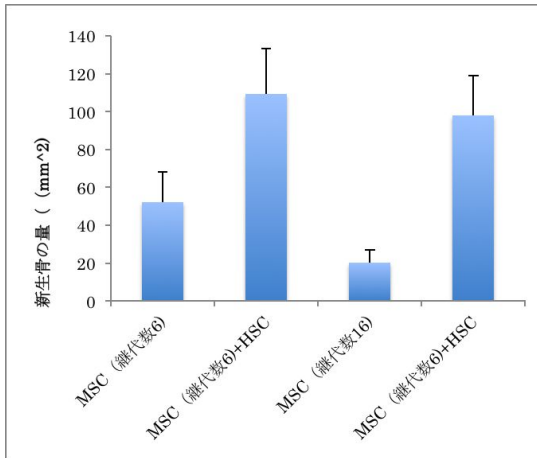


図7 継代による影響

(3)連携研究者  
なし

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 久夢 (FUKUSHIMA, Kumu)

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号：10632408

(2)研究分担者

なし