

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 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：2013～2014

課題番号：25893148

研究課題名(和文) 血管誘導能に優れた未分化間葉系幹細胞の骨再生技術の確立と顎裂閉鎖治療への展開

研究課題名(英文) Expansion into the establishment of jaw cleft treatment with bone regeneration by use of mesenchymal stem cells with excellent ability to induce blood vessel

研究代表者

鷲見 圭輔 (Sumi, Keisuke)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：00707078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は口唇裂口蓋裂(CLP)患者におけるより侵襲の少ない間葉系幹細胞(MSCs)を用いた骨再生医療を目標とし、骨再生に必須である血管新生にMSCsが及ぼす影響について検討を行った。本実験結果より、MSCsは骨分化誘導後と比較してVEGF発現量が増加すること、MSCsと血管内皮細胞を共培養することにより血管新生が促進されることが明らかとなった。さらに、動物実験においても、MSCsを移植することで移植部の血管新生が亢進され、初期血流量が増加しそれに続く早期の骨再生が起こることが明らかとなった。これらより本研究がCLP患者の顎裂部の骨再生に有用であることが示され、臨床応用の可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is bone regeneration of Jaw cleft of patients with cleft lip and palate (CLP) by use of mesenchymal stem cells (MSCs), so we examined the effects of MSCs on angiogenesis. From the results, it was suggested VEGF expression of MSCs was increased as compared with which of osteoblast differentiation, the angiogenesis of endothelial cells was promoted by coculture with MSCs. Additionally, vascularization of the transplanted area initial blood flow was increased and enhanced by transplantation of MSCs in vivo. So it was suggested that applications of this method may be available as a new therapeutic tool for CLP.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 未分化間葉系幹細胞 矯正歯科

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂 (CLP) は、複数の遺伝子要因と環境要因から発症する多因子性の疾患であり、日本人における発症率は 0.19% である。病態は、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。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、ほとんどの症例において同部への腸骨移植が学齢期に行われるが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、種々の問題が伴う。そこで、我々の研究グループでは、腸骨採取に伴う侵襲を低減しながら骨再生を達成する方法として、MSCs 移植による骨再生療法の検討を重ねてきた。骨再生過程においては、移植後に形成された結合組織に血管が侵入し、栄養と酸素を供給する環境が整えられた時点で、骨芽細胞による類骨の形成と石灰化の誘導が行われる。顎裂部への MSCs と CAP の移植においても、骨形成に先立って結合組織と血管網の構築が良好に達成されることが重要と考えられる。したがって、骨再生後に骨小窩に検出されることのない大多数の移植 MSCs においても、初期再生組織における血管形成に何らかの役割を果たしている可能性が推察される。

2. 研究の目的

骨髄由来 MSCs の血管内皮細胞への分化段階に応じた VEGF 産生様相を検討するとともに、液性因子による VEGF 産生調節機構を解明すること、さらに、移植後の MSCs による血管誘導と、これに続く骨再生の亢進が生じるか否かを検討すること。さらにその結果を元に、MSCs による血管新生能を高めた骨再生法を確立し、顎裂閉鎖治療に応用することを究極の目的とした。

3. 研究の方法

実験 1 では MSCs の分化による VEGF 産生能への影響の検討を行った。ビーグル犬の腸骨および顎骨骨髄から単離培養した MSCs を用いて各々の MSCs について、未分化の状態および骨分化誘導後の VEGF の発現レベルについて定量 PCR 解析を行った。実験 2 では CAP 上での培養による VEGF 産生能への影響の検討を行った。CAP ディスクを作製し、MSCs を CAP を静置した培養皿および通常の培養皿上で培養した。実験 1 と同様に骨分化誘導前後の VEGF 発現レベルについて定量 PCR 解析を行い、CAP の存在が、血管新生能に対してどのような影響を及ぼしているかを検討した。実験 3 では血管内皮細胞に対する MSCs の及ぼす影響を angiogenesis assay により経時的に血管新生の比較検討を行った。実験 4 ではビーグル犬顎裂モデルを用いて MSCs の血管新生に及ぼす影響についてレーザー Doppler 血流計による再生骨の血流量の計測を行った。

4. 研究成果

実験 1 では骨分化誘導した MSCs では、VEGF-A の遺伝子発現は、有意に低下した (図 1)。さらに、ウエスタンブロット解析により VEGF-A のタンパク質発現が減少することが示された (図 2)。

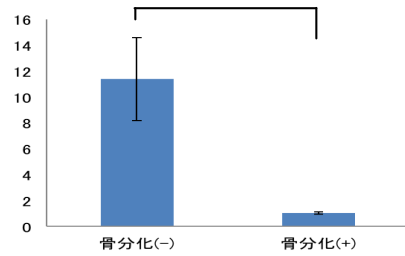


図 1 骨分化誘導の有無による VEGF-A 遺伝子発現

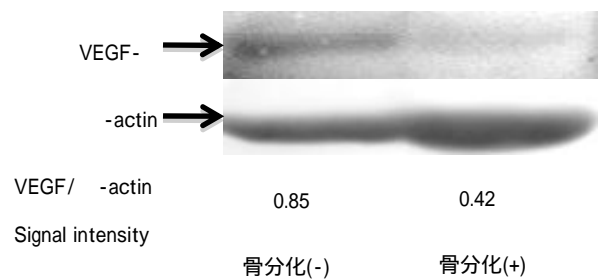


図 2 骨分化誘導による VEGF-A 蛋白発現の変化

実験 2 において CAP 上での培養においても未分化 MSCs の方が VEGF 発現量は高いことが明らかとなり、また発現量は通常培養と優位な差は認めなかった。

実験 3 では MSCs と血管内皮細胞を共培養することにより MSCs と HUVEC の coculture 群において、培養開始 3 日目より管腔様構造が認められた。その後も、複数の管腔様構造の連なりが認められた (図 3)。一方、HUVEC に VEGF を添加した群と HUVEC の monoculture 群においては、明確な管腔様構造の形成は認められなかった。

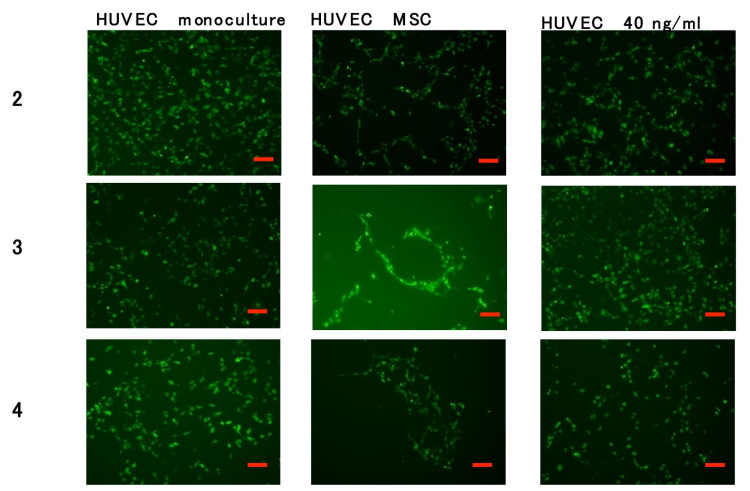


図 3 培養開始 2、3 および 4 日目における蛍光顕微鏡細胞培養像 200 μm

また、MSCs と HUVEC の生細胞 indirect coculture 群において、moi 群に比較して、有意に高い増加が認められ、一方、direct coculture 群では coculture 群ほど高い増加は認められた (図 4)。

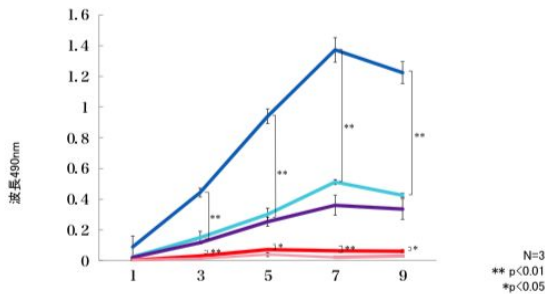


図4 培養条件の違いによる MSCs と HUVEC の生細胞数の変化

実験 4 では雌ビーグル犬の両側上顎切歯相当部に口蓋裂の顎裂様に人工的な欠損部を作製し、口蓋裂モデルとした (図 5)。MSCs 移植後、レーザー Doppler 血流計を用いて、移植部の血流量の変化を検討したところ、実験側、対照側ともに 3 日目、5 日目ではほぼ血流は計測されず、7 日目に両側ともに血流が認められ、実験側は 9 日目にピークを迎えた。一方、対照側は 11 日目にピークを迎えた。その後、両側ともに血流は減少したが、実験側では著しい血流の減少が起こり、MSCs を用いた実験側では、対照側と比較して計測部における血流の回復と減少が早いことが示された。その後、血流は、実験側は移植後 23 日目より、対照側は移植後 47 日目よりともにプラトーとなったが、実験側においては移植後 11 日目より再び血流の増加が認められた (図 6)。

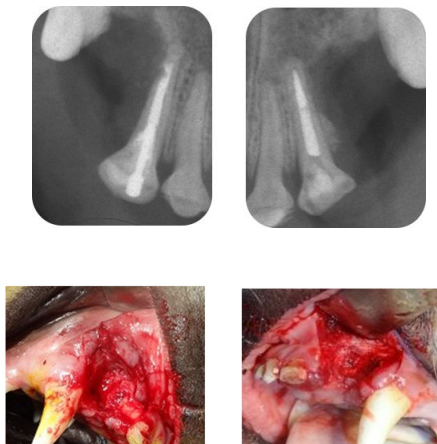


図5 顎裂作製直後の口腔内写真

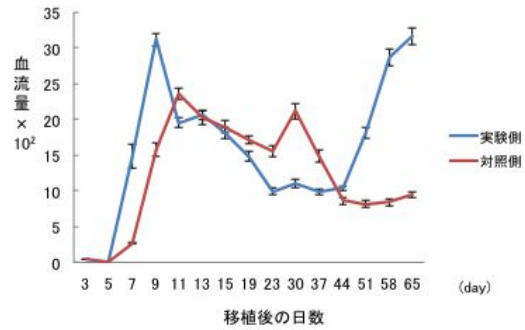


図6 移植後のビーグル犬血流変化

以上の結果より、MSCs は、直接的に HUVEC による血管新生に影響を及ぼすとともに HUVEC にパラクライン的に作用して血管新生因子の産生を亢進させる可能性が示唆された。また、移植部において、血管新生を亢進し、初期血流量が増加し、それに伴い運ばれた破骨細胞により、CAP が吸収され、早期に骨形成がおこると考えられた。

これらのことより、本術式が CLP 患者の顎裂部の骨再生に有用であることが明確に示され、臨床応用の可能性が強く示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 沖奈苗 鷲見圭輔 阿部崇晴 國松亮 丹根由起 吉見友希 粟田哲也 杉山勝 丹根一夫 谷本幸太郎
骨再生過程の血管新生における骨髄由来間葉系幹細胞の役割
第 38 回日本口蓋裂学会(札幌)平成 26 年 5 月 29~30 日

(2) 阿部崇晴 鷲見圭輔 沖奈苗 國松亮 杉山勝 谷本幸太郎
顎裂部骨再生における骨髄由来間葉系幹細胞による破骨前駆細胞への影響
第 39 回日本口蓋裂学会(東京)平成 27 年 5 月 21~22 日

(3) 沖奈苗 鷲見圭輔 阿部崇晴 谷本幸太郎
骨髄由来間葉系幹細胞を用いた顎裂閉鎖治療 - MSCs が血管新生に果たす役割 -
第 39 回日本口蓋裂学会(東京)平成 27 年 5 月 21~22 日

〔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：
出願年月日：
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

鷺見 圭輔 (Sumi Keisuke)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：00707078

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：