

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11169

研究課題名（和文）老化に伴う骨組織再生能低下と脈管再生との関連性の解明

研究課題名（英文）Relationship between the reduction of bone regeneration and angiogenic potential in the senescence-associated mesenchymal stem cells.

研究代表者

石井 正和（ISHII, Masakazu）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00456683

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）：老化による骨再生能低下における血管新生の役割について探索するために、長期培養によって細胞老化を誘導した間葉系幹細胞および血管内皮細胞を用いて、細胞老化に伴う骨分化能と血管新生能低下の関連性について評価を行った。また、老化マウス（20ヶ月齢）と若年マウス（10週齢）から採取した間葉系幹細胞および脂肪由来幹細胞を用い、骨分化能と血管新生因子発現比較を行い、老化によって起こる骨再生能の低下には、間葉系幹細胞自体の機能低下と、血管新生誘導効果の低下の両面によって起こる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigate the relationship between the reduction of bone regeneration and angiogenic potential in the senescence-associated mesenchymal stem cells (MSCs). 20 times passaged aged MSCs (P20) were decreased the proliferation and osteogenic potential than the 3 times passaged young MSCs (P3). Furthermore, angiogenic cytokine expression levels were also decreased in aged MSCs. We next compared the angiogenic effect between the aged HUVECs (P20) and young HUVECs (P3). Aged HUVECs were significantly decreased the angiogenic potential. We next collected the bone marrow MSCs and adipose derived stem cells (ADSCs) from aged mice (20 months old) and young mice (10 weeks old). In aged MSCs and ADSCs the proliferation and osteogenic potential was decreased. Angiogenic cytokine expression levels were also declined. The senescence-associated reduction of bone regeneration may be induced by both MSCs functional disorder and reduction of angiogenic potential.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学 骨再生 老化 血管新生

1. 研究開始当初の背景

高齢者における歯の喪失の原因の大半は歯周疾患による歯槽骨吸収である。歯の欠損部位はインプラントを含めた義歯によって補綴されるが、吸収した歯槽骨でそれらを安定させることは極めて困難である。現在、歯槽骨の造成を図るために自家骨移植が行われているが、採取できる骨量にも限りがあり、採骨部に知覚麻痺が残るなどの副作用が残るなど問題点も多い。歯槽骨の骨量が不足した患者への治療法として、近年では骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) と人工骨等のスキャフォールドを組み合わせた再生医療の研究が注目されている。MSC 移植による効果的な骨組織の再生には、分化能の高い細胞の移植が重要となるが、加齢に伴い MSC の多分化能は低下するため、高齢者において、いかに効果的に骨組織を再生させることが重要な課題となる。

骨組織再生を効果的に行うためには、再生部位に血管・リンパ管を含む微小循環系の構築が重要となるが、老化によってこれらの脈管新生能が低下することが報告されている。一方で、老化に伴う骨再生能の低下と脈管再生能低下との関連性については依然不明な点が多い。現在までに「老化による骨再生能低下」、「老化による血管新生能低下」に関する報告は多数ある。しかし、「老化」「骨再生」「血管新生」を直接的に結び付けて詳細に検討された報告はない。

2. 研究の目的

本研究では老化に伴う骨再生能低下を、間葉系幹細胞の機能変化と、脈管新生の2つの視点から詳細に検討を行い、老化による骨再生能低下を脈管再生・誘導の面から解析を行い、高齢者においても効果的に機能的な骨組織再生を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 老化による間葉系幹細胞 (MSC) の機能変化

ヒト腸骨由来間葉系幹細胞 (MSC) を長期培養によって細胞老化誘導を行う。3 継代目の Young MSC (P3) と 20 継代行った Old MSC (P20) において幹細胞表面抗原発現、増殖能、骨分化能の比較を行う。また MSC から分泌される血管新生因子発現比較も行う。

(2) 細胞老化による血管内皮細胞の機能評価

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を長期培養によって細胞老化の誘導を行う。3 継代目の Young HUVEC と 20 継代行った Old HUVEC (P20) の in vitro での血管新生効果 (増殖能、管腔形成能、遊走能、血管新生因子発現) の比較を行う。

(3) 老化マウス由来 MSC と若年マウス由来 MSC を用いた骨分化能および血管新生効果の比較

老化マウス (20 ヶ月齢) と若年マウス (10

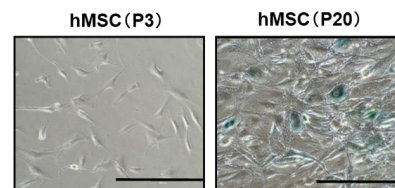
週齢) を用いて、それぞれのマウスから骨髄由来 MSC、さらに皮下脂肪より脂肪由来幹細胞 (ADSC) を採取し、それぞれの細胞において幹細胞表面抗原発現、増殖能、骨分化能、血管新生能について評価を行う。

4. 研究成果

(1) 老化による間葉系幹細胞 (MSC) の機能変化

MSC を長期培養し、細胞老化を誘導することにより、細胞の肥大化・扁平化がおこり、20 継代行った Old MSC において、 β -galactosidase で染色される老化細胞が多数出現してくることが確認された (図1)。

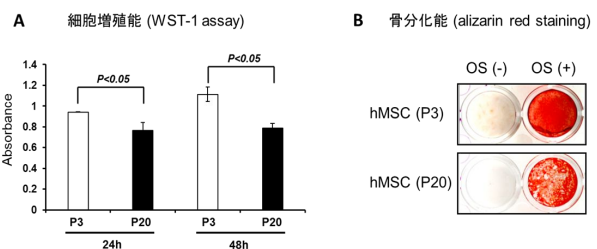
Senescence associated β -galactosidase



(図1) 長期継代培養によるMSCの細胞老化誘導

次にフローサイトメトリーによって代表的な MSC マーカーの測定を行った。陽性マーカーである CD73, CD90, CD105 において、P20 の MSC において陽性率の減少が認められた。一方、陰性マーカーである CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR に関しては P20 および P3 の MSC において差は認められなかった。

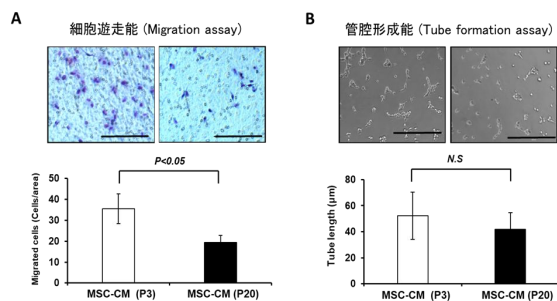
細胞老化による増殖能と骨分化能比較を行った結果、P20 の MSC において有意な増殖能の低下と石灰化能の低下が認められた (図2)。



(図2) 老化によるMSCの増殖能、骨分化能変化

MSC は複数の血管新生因子を発現しており、MSC 自身に血管新生促進効果があることが知られている。そこで、細胞老化による MSC の血管新生効果について評価を行った。P20 の MSC は、P3 の MSC に比べ bFGF および細胞遊走因子の SDF-1 の発現が有意に低下していることが明らかとなった。次に、P20 および P3 の MSC から採取した培養上清を用いて血管内皮細胞 (HUVEC) に対する遊走促進、管腔形成促進効果について評価を行った。管腔形成効果については、いずれの培養上清添加群においても有意な差は認められなかったが、P20 の培養上清群で、HUVEC の遊走が有意に

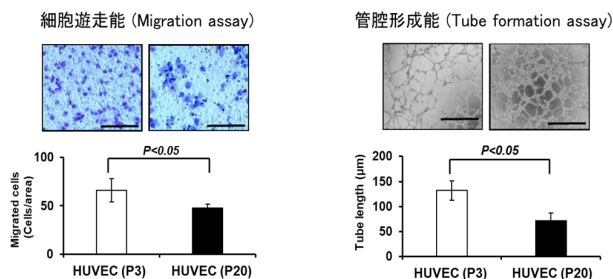
低下することが明らかとなった（図3）。



（図3）MSCの培養上清を用いたHUVECの遊走、管腔形成効果の比較

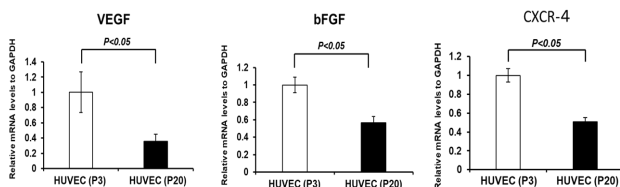
（2）細胞老化による血管内皮細胞の機能評価

次に血管内皮細胞（HUVEC）を用いた系によって、細胞老化と血管新生効果との関連性について評価を行った。前述の（1）の項目と同様に、長期継代培養によってHUVECに細胞老化誘導を行った結果、P20のHUVECにおいてβ-galactosidaseで染色される老化細胞の出現が確認された。また、細胞増殖能に関しては、老化細胞において有意な低下が認められた。さらに、P20とP3のHUVECを用いて遊走能と管腔形成能の比較を行った結果、P20のHUVECにおいていずれも低下することが見いだされた（図4）。



（図4）細胞老化によるHUVECの遊走、管腔形成能の変化

次に細胞老化に伴うHUVECにおける血管新生因子発現について評価を行った。P20の老化HUVECにおいては、VEGF、bFGFの発現が有意に低下しており、さらにSDF-1のレセプターであるCXCR4の発現低下が確認された（図5）。



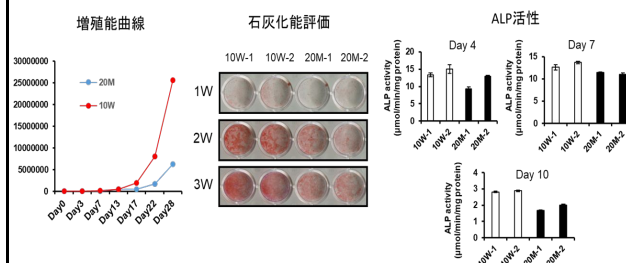
（図5）長期継代培養によるHUVECの血管新生因子発現変化

上記（1）（2）の結果により、老化によって骨再生能が低下するメカニズムとして、老化MSC自身の機能低下（増殖能、骨分化能）によるもの。細胞遊走因子であるSDF-1αの発現が低下し、MSC自身が有する血管新生誘導能が低下すること。老化によって血管内皮細胞のCXCR4の発現が低下することから、

SDF-1α/CXCR4シグナルが低下し、骨組織再生部位で血管新生が効果的に起こらない可能性が示唆される。

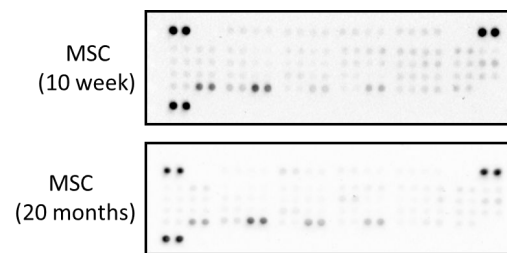
（3）老化マウス由来MSCと若年マウス由来MSCを用いた骨分化能および血管新生効果の比較

20カ月齢の老化マウスおよび10週齢のマウスから骨髄MSCおよび皮下脂肪より間葉系幹細胞（ADSC）を採取し、増殖能、骨分化能、血管新生因子発現について評価を行った。フローサイトメトリーにて表面抗原を測定した結果、代表的なMSCマーカー発現は週齢の違いによる差は認められなかった。老化マウス由来MSCは若年マウスより採取したMSCに比べ、増殖能、骨分化能、石灰化能が減弱していることが明らかとなった（図6）。また、ADRCにおいても骨髄MSCと同様に増殖能、分化能の低下が認められた。



（図6）老化マウス由来MSCの機能変化

次に老化マウスおよび若年マウスMSCの培養上清を採取し、angiogenic protein arrayにかけ、血管新生因子発現パターンの解析を行った結果、老化マウスより採取したMSCの培養上清中において、複数の血管新生因子発現が低下しているのが確認された（図7）。



（図7）血管新生発現パターンの変化（angiogenic protein array）

以上の結果から、老化による骨再生能の低下の原因として血管新生作用の低下が一つの原因と考えられ、高齢者において骨再生を効果的に実現させるためには、MSCの骨分化能の亢進はもちろん、内在性の血管内皮細胞の遊走能を亢進させる方法も有効であると考えられる。

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 7 件）

Ishii M, Nakahara T, Araho D, Murakami

J, Nishimura M. Glycolipids from spinach suppress LPS-induced vascular inflammation through eNOS and NK- κ B signaling. *Biomed Pharmacother*. 2017;91:111-120. 査読有 doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.052.

Suehiro F, Ishii M, Asahina I, Murata H, Nishimura M. Low-serum culture with novel medium promotes maxillary/mandibular bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation ability. *Clin Oral Investig*. 2017;21:2709-2719. 査読有 doi:10.1007/s00784-017-2073-7.

Murakami J, Ishii M, Suehiro F, Ishihata K, Nakamura N, Nishimura M. Vascular Endothelial Growth Factor-C Induces Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells through the ERK and RUNX2 Pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;484(3):710-718. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.001.

Ahmed GJ, Nishimura M, et al. 11 人中 10 番目. Regulation and Biological Significance of Formation of Osteoclasts and Foreign Body Giant Cells in an Extraskelatal Implantation Model. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 2016: 49:97-107. 査読有 doi: 10.1267/ahc.16007.

Morishita K, Nishimura M, et al. 10 人中 9 番目. Diversity of multinucleated giant cells by microstructures of hydroxyapatite and plasma components in extraskelatal implantation model. *Acta Biomaterialia*. 2016;39: 180-191. 査読有 doi: 10.1016/j.actbio.2016.05.002.

Ishii M, Nakahara T, Ikeuchi S,

Nishimura M. β -Amyrin induces angiogenesis in vascular endothelial cells through the Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;467(4):676-682. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.085.

Niwa M, Numaguchi Y, Ishii M, Kuwahata T, Kondo M, Shibata R, Miyata K, Oike Y, Murohara T. IRAP Deficiency Attenuates Diet-induced Obesity in Mice Through Increased Energy Expenditure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;457(1):12-18. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.071.

〔学会発表〕(計 6 件)

益崎与泰ら、3次元連通気孔を有する炭酸アパタイトブロックの骨新生能の検討 2016.11.21、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016.11.21

石井正和ら、 β -amyrin による血管新生促進効果の検討、2016.10.21、第 23 回日本歯科医学会総会

金田尚子ら、老化に伴う骨組織再生能低下と血管新生との関連性、2016.10.22、第 23 回日本歯科医学会総会

村上寿理ら、VEGF-C による骨髄間葉系幹細胞の骨分化促進効果の検討、2016.3.17、第 15 回日本再生医療学会総会

石井正和ら、 β -amyrin による血管新生促進効果の検討、2016.3.17、第 15 回日本再生医療学会総会

石井正和ら、 β -amyrin による血管新生促進効果の検討、2015.12.11、第 23 回日本血管生物医学会学術集会

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称：細胞接着因子発現抑制剤
 発明者：石井正和，西村正宏，中原達雄
 権利者：丸善製薬株式会社、鹿児島大学
 種類：特許
 番号：特願 2016-245727
 出願年月日：2016.12.19
 国内外の別：国内

名称：血管新生促進剤
 発明者：中原 達雄、池内 慎悟，石井 正和、西村 正宏

権利者：丸善製薬株式会社、鹿児島大学
種類：特許
番号：特願 2015-099488
出願年月日：2015.5.14
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/prostho2/index.htm>

6．研究組織

(1)研究代表者

石井 正和 (ISHII, Masakazu)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教
研究者番号：00456683

(2)研究分担者

西村 正宏 (NISHIMURA Masahiro)
鹿児島大学医歯学域歯学系・教授
研究者番号：00294570