

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09703

研究課題名(和文) MSCsを用いたオートファジー系を介する高度骨吸収治療法の開発研究

研究課題名(英文) Developmental research of a severe bone resorption therapy by using MSCs via autophagic modulation

研究代表者

原田 佳枝 (Harada, Kae)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：60432663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高齢(78-80週齢)および若齢(10週齢)の雄性マウス顎骨より細胞の採取に成功し、高齢マウス由来細胞(OMSC)と若齢マウス由来細胞(YMSC)とを比較した。その結果、顎骨OMSCでは形態学的にも老化細胞の性質を持ち、老化マーカー遺伝子についてもmRNAレベルで亢進していることが分かった。一方でオートファジーに関してはマーカー遺伝子LC3、Beclin1、Atg7いずれも顎骨OMSCはYMSCよりもmRNAレベルで亢進しており、基底レベルでオートファジーが更新していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療において、顎骨MSCは歯科医師でも簡単に採取出来る有望な細胞ソースであるが、長管骨MSCと比較した研究は乏しく、どのような点が顎骨再生に優れているか不明な点が多い。今回マウスからの高齢・若齢マウス顎骨MSCからの採取に成功し、マウス顎骨OMSCはYMSCよりも老化している一方、オートファジーは亢進していることがわかった。一般的に老化細胞ではオートファジーが抑制されると言われているが、顎骨MSCは一般的な老化細胞と異なる性質を持つことが示され、老化個体におけるMSCsの性質の一端を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：We prepared MSCs from the jawbones of aged (78-80 weeks) and young (10 weeks) male mice and compared the cells derived from aged mice (OMSC) with those from young mice (YMSCs). The jaw OMSCs had morphological characteristics of senescence, and the senescence marker genes were increased at the mRNA level. On the other hand, autophagy marker genes LC3, Beclin1, and Atg7 of the jaw OMSCs was increased at the mRNA level compared to those of YMSCs, suggesting that autophagy of jaw OMSCs is accelerated at the basal level.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 オートファジー 骨再生 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、健康寿命の延長に伴い歯を喪失しても以前と同様な食生活を送りたいと考える患者が増加している。しかし歯牙喪失後は、時間経過に従い高度顎堤吸収を呈することが多く、その場合従来の補綴治療での機能回復は困難である。そこで、顎骨・歯周組織の組織再生治療が重要となってくる。顎骨再生治療において間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells; MSCs) は、有力な細胞ソースの一つである。しかし、MSCs の臨床応用実現のためには改善すべき問題点もあり、例えば高齢ドナー由来 MSCs では、分化能低下や細胞増殖の減退がある (Rando, 2006; Drummond-Barbosa, 2008; Gao et al., 2017)。今の日本では、移植後の拒絶反応・感染症の面から他人からの他家移植は受け入れられにくく、免疫反応や感染等の危険性が少ない自己細胞のニーズが高い。よって高齢ドナーから採取された少量の MSCs を、安全にかつ更に劣化・老化させることなく増殖させて移植に持ち込むことが必要であるにもかかわらず、未だその手法は開発途上である。

老化は、細胞内にて様々なストレスにより生じた老廃物 (異常タンパク質・老化タンパク質) が、細胞内に蓄積して細胞機能が低下することが一因である。真核細胞における老化防止システムの一つであるオートファジーは、細胞内小器官を含む細胞質成分の代謝回転を担う。具体的には、細胞内の老廃物 (老化タンパク質等) が小胞 (オートファゴソーム) で被覆され、リソソームとの融合により分解される。細胞が老化するとオートファジー機能が低下することが知られているが、最近オートファジー系の刺激により幹細胞老化の抑制が可能であると提唱されており、注目を集めている。しかし、ヒト腎由来 MSCs や腸骨由来 MSCs でオートファジー亢進をさせると組織分化能が長期間保持出来るという報告 (Chiu et al. 2017; Pantovic et al., 2013) や、高齢ドナー骨由来 MSCs に関しては、高齢患者からの採取例 (Hang et al., 2009) と高齢マウスからの採取例 (国友ら, 2017) があるものの、*in vivo* での骨再生研究が行われた論文報告はない。また、顎骨の再生においては、発生を同じくする顎骨由来 MSCs の方が骨の再生に一般的に使用される腸骨よりも効果的と予想されるが、オートファジーに関する専門的な知識を持って顎骨由来 MSCs の骨再生研究が行われた例も少なく、研究が求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、高齢ドナー由来 MSCs の特徴を明らかとし、その欠点を補い骨再生能の回復を目的とした研究である。高齢マウス顎骨からの MSCs 採取はこれまでに報告例がなく、採取に成功してその特徴の解明は大きな成果となる。さらに、オートファジーは真核生物細胞全般に存在する調節機構であるので、MSCs だけでなく他の組織幹細胞の品質向上も可能となる。さらに本研究を基にして高齢ドナーからの少量の MSCs を使用した高度顎骨吸収症例等における広範囲部位の骨増生治療法が開発されることにより、既存の欠損補綴治療に対して大きな影響を及ぼすと考えられる。

3. 研究の方法

C57BJ 高齢マウス (78-80 週齢程度)・若齢マウス (10 週齢) より顎骨・大腿骨を採取し Houlihan ら¹⁾ の方法に従って骨組織を粉碎し、コラゲナーゼ処理を経て骨片除去後、10cm ディッシュに播いて単層培養し、増殖した細胞を採取した。採取した細胞は、(1)顕微鏡下での観察(2)FACS による細胞表面抗原解析(3)*In vitro* の骨分化・脂肪分化刺激実験による解析(4)リアルタイム PCR を用いた細胞老化・幹細胞がもつ多能性・オートファジー・SASP・組織分化に関するマーカー遺伝子の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 顕微鏡下の観察: 高齢マウスから得られた顎骨由来細胞 (顎骨 OMSC) と対照群としての若齢マウス顎骨由来細胞 (顎骨 YMSC) を観察すると、顎骨 YMSC は紡錘形、顎骨 OMSC は扁平で肥大化した形態の細胞が多い傾向があり、顎骨 OMSC は YMSC よりも形態的に老化細胞の特徴を持つ傾向があった (図 1)。また、顎骨 OMSC と大腿骨 OMSC 間では特に形態的な違いの傾向は認められなかった。

(2) FACS 解析: 細胞マーカー抗体 (CD34, CD45, CD73, CD90) を用いた FACS 解析を行ったところ、顎骨 OMSC は YMSC 間では各種マーカーの陽性率に違いは認められなかった (表 1)。

(3) 骨分化・脂肪分化実験: *In vitro* にて細胞分化実験を行ったところ、脂肪分化では顎骨 OMSC は YMSC よりも脂肪滴の数が多く分化が亢進し、骨分化実験では OMSC の方が

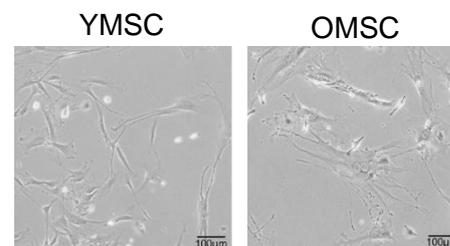


図 1: 顎骨 MSCs の顕微鏡像

YMSC は紡錘形、OMSC は扁平で肥大化した形態の細胞が多かった。

表面抗原		YMSC	OMSC
MSC Negative	CD34	0.15	0.85
	CD45	28.1	20.1
MSC Positive	CD73	13.5	15.2
	CD90	68.4	69.1

陽性率 (%)

表 1: FACS 解析

YMSC・OMSC 間で MSC 陰性・陽性マーカーの陽性率に違いは認められなかった。

抑制されている傾向が示された (図 2)。

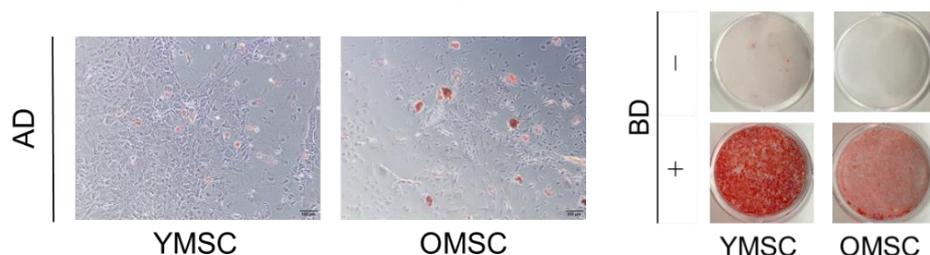


図 2 : マウス顎骨細胞の脂肪分化 (AD) と骨分化 (BD) の誘導の結果

脂肪分化では OMSC・YMSC 共にオイルレッドで染色される脂肪滴を認め、脂肪分化を認めた。骨分化は OMSC・YMSC 共にアリザリンレッドで染色される石灰化像を認めたが、染色域は OMSC では YMSC よりも抑制傾向を認めた。

(4) リアルタイム PCR 法による解析 :

老化マーカーとして細胞周期調節遺伝子 p21、p53、p16 について解析を行ったところ、いずれも顎骨 OMSC の方が YMSC よりも mRNA レベルが亢進しており、特に p21 に関してはその傾向が顕著であり (図 3-a)、一方、多能性マーカーである NANOG、SOX については YMSC よりも低下傾向であった (図 3-b)。以上より顎骨 OMSC には YMSC よりも老化細胞が多く含まれ、多能性が抑制されていることが示唆された。オートファジーに関しては、マーカー遺伝子

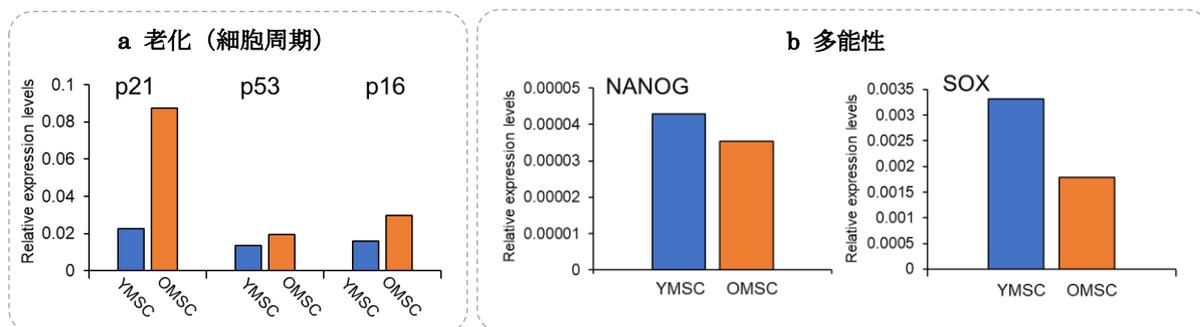


図 3 : マウス顎骨由来細胞の老化・多能性のマーカー遺伝子に関するリアルタイム PCR 解析

老化マーカー (左) p21、p53、p16 に関して OMSC は YMSC よりも亢進傾向、多能性マーカー (右) NANOG、SOX に関しては抑制傾向を示した。

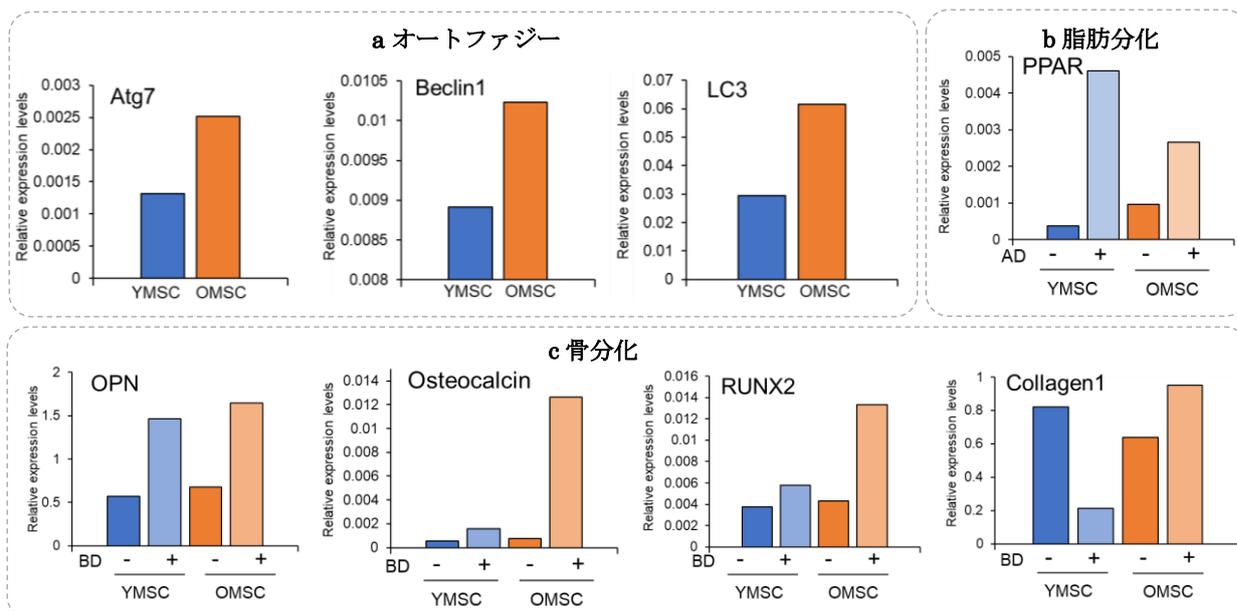


図 4 : マウス顎骨由来細胞のオートファジー・骨分化・脂肪分化でのマーカー遺伝子に関するリアルタイム PCR 解析

オートファジー遺伝子 (右上) Atg7、Beclin1、LC3 については OMSC は YMSC よりも亢進傾向で、脂肪分化 PPAR γ (左上) については、誘導により OMSC は YMSC より高値だったが、脂肪分化刺激 (AD) 後の YMSC よりも低値となった。骨分化 (下) については、関連遺伝子 OPN、Osteocalcin、RUNX2 は骨分化刺激 (BD) 前後共に OMSC では YMSC よりも亢進傾向だったが、Collagen1 は刺激前は OMSC は YMSC よりも抑制傾向で、刺激後は OMSC の方が YMSC よりも亢進傾向であった。

Atg7、Beclin1、SOX は共に顎骨 OMSC で YMSC よりも亢進傾向であった (図 4-a)。脂肪分化に関して関連遺伝子 PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ) の mRNA レベルは、脂肪分化誘導により OMSC は YMSC より亢進傾向だったが、脂肪分化刺激は逆に抑制傾向となった (図 4-b)。さらに骨分化誘導に関しては、OPN (Osteopontin)、Osteocalcin、RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) に関しては OMSC・YMSC 共に分化刺激で亢進し、分化刺激前後を通し OMSC は YMSC よりも亢進傾向であり、Collagen1 では YMSC で分化刺激で抑制される一方、OMSC では亢進傾向となった (図 4-c)。よってマウス顎骨 OMSC では、オートファジーが基底レベルで亢進し、骨分化能に関しては *in vitro* での実験では石灰化現象が抑制されたにも関わらず、骨分化マーカーが mRNA レベルで亢進していることがわかった。

以上の結果より、マウス顎骨 OMSC は YMSC よりも老化しているにもかかわらず、基底レベルではオートファジーが亢進しており、さらに骨分化能に関しては分化が抑制されていることが示された。

参考文献

- 1) Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . Nat Protoc. 2012; 7: 2103-2111.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murakami M, Nishi Y, Harada K, Masuzaki T, Minemoto Y, Yanagisawa T, Shimizu T, Tsuboi A, Hamada T, Nishimura M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of Oral Intake of Glucosylceramide Extracted from Pineapple on Xerostomia: A Double Blind Randomized Cross-over Trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu11092020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mamoru Murakami, Kei Fujishima, Yasuhiro Nishi, Kae Harada, Masahiro Nishimura	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of Storage Temperatures and Type of Oral Moisturizers on their Antifungal Effects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Health and Dental Management	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田佳枝, 堀之内玲耶, 神園健人, 濱坂厘杏, 下田平直大, 村上 格, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 義歯安定剤使用者に向けた新しい義歯洗浄法の開発
3. 学会等名 第12回日本義歯ケア学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀之内玲耶, 原田佳枝, 村上 格, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 適正範囲のHLB値をもつ界面活性剤はクリームタイプ義歯安定剤除去にて有用である
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田佳枝, 村上 格, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 適正なHLB値の界面活性剤は義歯安定剤ユーザーに向けた新しい義歯洗浄法に有用である
3. 学会等名 第30回日本老年歯科医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 格, 藤島 慶, 原田佳枝, 西 恭宏, 西村正宏
2. 発表標題 口腔保湿剤の保管温度と種類がその抗真菌性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 第127回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新屋俊明, 西 恭宏, 中村康典, 村上 格, 原田佳枝, 鎌下祐次, 西村正宏
2. 発表標題 舌苔付着の主観評価と舌背細菌数の関係
3. 学会等名 日本老年歯科医学会 第29回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 駒走尚大, 末廣史雄, 石井正和, 柳澤嵩大, 原田佳枝, 西村正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間質細胞の骨形成能判定のためのマーカー探索
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀之内玲耶、原田佳枝、西村正宏
2. 発表標題 界面活性剤のHLB値はクリームタイプ義歯安定剤除去に影響する
3. 学会等名 第8回補綴若手研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西村 正宏 (Nishimura Masahirso) (00294570)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	
研究分担者	石井 正和 (Isii Masakazu) (00456683)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	
研究分担者	末廣 史雄 (Suehiro Fumio) (40524781)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------