

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659926

研究課題名（和文）

骨原性細胞の誘導による再生治療の試み

研究課題名（英文）

Study for tissue regeneration therapy by induced osteogenic cells

研究代表者

中村 浩彰（NAKAMURA HIROAKI）

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50227930

研究成果の概要（和文）：

硬組織再生医療における骨原性細胞の応用の可能性について検討するために、骨髄間質細胞から CD90 発現細胞と SP (Side population) 細胞を分離し、骨芽細胞への分化能を *in vitro* と *in vivo* で検討した。骨髄間質細胞のほとんどは間葉系幹細胞のマーカーである CD90 を発現し、SP 細胞が 0.5% 存在することがわかった。CD90 細胞と SP 細胞ともに骨原性細胞の特徴を有していたが、骨原性細胞の特異的な遺伝子を明らかにするまでには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

We elucidated osteogenic capacity of CD90-positive cells and side population (SP) cells derived from bone marrow stromal cells to establish the hard tissue regeneration therapy. Most of bone marrow stromal cells expressed CD90, one of mesenchymal stem cell markers, and contained 0.5% SP cells. CD90-positive cells and SP cells could differentiate osteoblastic cells in *in vitro* and *in vivo*. However, we could not clarify specific genes of osteoprogenitor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：骨原性細胞、骨髄間葉系細胞、CD90、Side population

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会において口腔機能を生涯にわたって維持することは Quality of Life (QOL) の向上に欠くことができないものである。また、顎裂、口蓋裂などの骨欠損に対する治療、歯の喪失の原因である歯周疾患の治療およびインプラント治療には、歯槽骨を再生し機能回復をはかる再生歯科治療法の開発、確立が必要であり、再生医療に対する社会的要求も高まっている。現在、歯科領域で行われているエムドゲインや Guided Tissue Regeneration (GTR) による歯槽骨再生では十分な機能回復を得るまでの効果は得られ

ていない。また、インプラント治療の前処置として骨髄間質細胞移植による骨造成が行われているが、細胞採取の際の患者さんへの負担も大きく、移植医療に十分な細胞数を確保することも困難である。我々は、間葉系幹細胞マーカーの 1 つである CD90 (Thy-1) 陽性細胞の分布を形態学的、細胞生物学的に解析することにより、CD90 陽性細胞が骨原性細胞として機能することを報告した (Nakamura et al. J Histochem Cytochem 58:455-462)。

2. 研究の目的

近年、先端医学領域において再生医学が注目されている。歯科医学領域でも歯の喪失を防ぎ機能を維持するためには、歯周組織の再生が不可欠である。すなわち、将来の歯科医療には、機能回復を効率よく達成するための再生歯科治療法の開発が急務である。我々は生体内に存在する骨原性細胞に手がかりを求め、CD90 陽性骨原性細胞が骨組織再生に有用な細胞群であることから、組織幹細胞を多く含む Side Population (SP)細胞との形質を比較検討することにより、骨原性細胞の維持に重要な遺伝子群を明らかにしようと考えた。そのため、CD90 陽性細胞と SP 細胞を用いて骨芽細胞への分化制御機構を解明し、骨原性細胞と組織幹細胞に発現する遺伝子群を明らかにすることを目的とした。さらに、山中らの induced Pluripotent Stem (iPS)細胞誘導法に注目し、体細胞に遺伝子導入することにより、骨組織再生に有用な骨原性細胞が誘導できるのではないかと着想し、再生歯科医療への応用の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨髄間質細胞からの CD90 陽性細胞の分離と性状解析

4 週齢ラットの脛骨および大腿骨から骨髄を取り出してプレートにて培養し、プレート接着細胞を骨髄間質細胞とした。トリプシン処理により細胞を採取し、フローサイトメーターにより CD90 発現細胞の割合を検討した。CD90 陽性細胞の骨芽細胞分化能および石灰化基質形成能については、骨芽細胞誘導培地にて培養し、アルカリホスファターゼ活性染色とアリザリンレッド染色にて検討した。

(2) 骨組織における CD90 陽性細胞の局在についての形態学的解析

4 週齢ラットを 4%パラホルムアルデヒドを含む固定液にて灌流固定し脛骨を採取した。10%EDTA にて 2 週間脱灰を行い、アルコール系列脱水、パラフィン包埋後、ミクロトームにて厚さ 4 μ m 切片を作製した。脱パラフィン後、抗 CD90 抗体と 4 $^{\circ}$ C にて 12 時間、シンプルステインラット Max-P0 と室温にて 1 時間反応後、DAB にて発色させて光学顕微鏡にて観察した。さらに、骨原性細胞との関連を明らかにするために、骨芽細胞マーカである Osterix 陽性細胞と CD90 陽性細胞との関連を蛍光 2 重染色にて検討した。

(3) 骨髄間質細胞からの SP 細胞の分離と性状解析

骨髄間質細胞をトリプシン処理により集め、Hoechst33342 と反応後 Fluorescence activated cell sorter (FACS)により SP 細胞

群 (SP) と non-SP 細胞群 (NSP) を分離した。また、コントロールとして verapamil 処理により SP 細胞群を確認した。SP と NSP の増殖活性をアラマブルー法により検討し、骨芽細胞分化能および石灰化基質形成能について、アルカリホスファターゼ活性染色、アリザリンレッド染色により検討した。

(4) CD90 陽性細胞と SP 細胞の in vivo における骨組織形成能の検討

骨髄間質細胞由来の CD90 陽性細胞と SP 細胞をハイドロキシアパタイト担体に接着後ラットに皮下移植し、骨組織形成能について組織学的に検討した

4. 研究成果

(1) 骨髄間質細胞をフローサイトメーターで解析した結果、ほとんどすべての細胞が未分化間葉細胞のマーカである CD90 陽性を示すことがわかった。また、骨誘導培地で培養したところ、培養 2 週でアルカリホスファターゼ陽性を示し、4 週でアリザリンレッド陽性の石灰化基質を形成した。

(2) 骨組織における CD90 陽性細胞の分布を検討したところ、骨膜においては外層の紡錘形細胞が陽性を示し、骨基質表面の骨芽細胞や骨基質内の骨細胞は陰性であった。また、骨髄側では血管周囲の線維芽細胞様細胞が陽性を示したが、骨芽細胞、骨細胞は陰性であった。骨芽細胞マーカである Osterix との 2 重染色により、血管周囲の CD90 陽性細胞の一部は核内に Osterix 陽性反応を認めた。(図 1) すなわち、血管周囲の CD90 陽性細胞には骨原性細胞が存在し、骨芽細胞への分化に伴い CD90 陰性となることが示唆された。一方、骨髄においては間質細胞に加えて、リンパ球系細胞も CD90 陽性を示し、両者を区別することは困難であった。

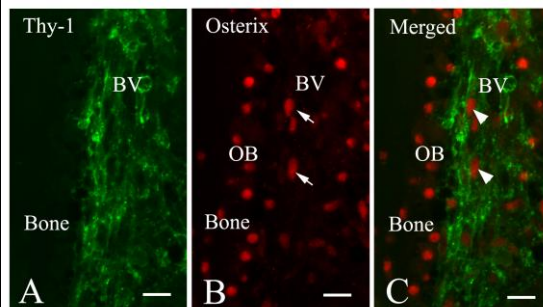


図 1

(3) 骨髄間質細胞における SP 細胞の存在を FACS 解析したところ、0.5%の SP 細胞が存在することがわかった。(図 2) また、SP 細胞の増殖活性は NSP 細胞に比べて低い傾向を示した。(図 3) SP 細胞を骨芽細胞誘導培地にて培養すると、アルカリホスファターゼ

FACS解析

+ verapamil

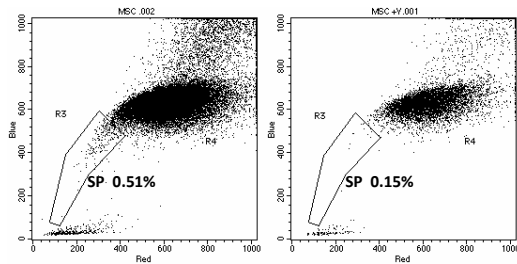


図 2

細胞増殖

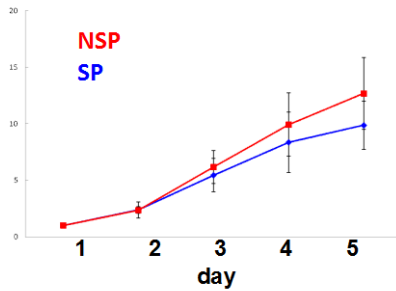


図 3

陽性の骨芽細胞様細胞に分化し、アリザリンレッド陽性の石灰化基質を形成した。しかしながら、NSP細胞もSP細胞と同様にアルカリホスファターゼ陽性、アリザリンレッド陽性の石灰化基質形成能を示し、両者に有為な差は認められなかった。(図4)

骨芽細胞分化および石灰化

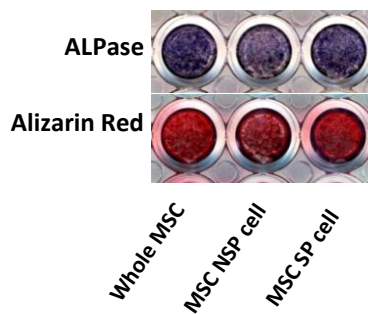


図 4

(4) CD90陽性細胞とSP細胞をハイドロキシアパタイトと共にラット皮下に移植したところ、8週において担体周囲に硬組織形成が認められた。形成された硬組織はオステオポンチン陽性を示したことから、骨組織であることが示唆された。しかしながら、CD90陽性細胞とSP細胞とに骨組織形成量においては有為な差はみられなかった。

以上のことから、骨髄間質細胞にもSP細胞は存在するものの、骨形成能においては

NSP細胞と差はなく、真の骨組織幹細胞を同定するためには従来の組織幹細胞研究で行われている薬剤排出能や細胞表面マーカーのみでは困難であることがわかった。また、in vitroではほとんどの骨髄間質細胞がCD90陽性を示し、骨組織内におけるCD90陽性細胞の分布とは異なるように思われた。このことは生体の細胞はin vitro系に移行した時点から、未分化な細胞となる傾向を示し、in vitro研究結果の解釈についても十分な注意が必要であると思われた。本研究では当初目的とした骨原性細胞の形質維持に特異的な遺伝子を見出すことはできず、遺伝子導入による誘導骨原性細胞を作製するまでには至らなかった。しかしながら、歯科領域における骨再生治療の必要性は拡大することが予想され、より良い担体の開発とともに、有用な細胞療法を目指した基礎・臨床研究が必要である。本研究はin vivoとin vitroのそれぞれの利点を生かして、両者を比較検討しつつ進めた点に特色があり、今後の再生歯科医学における問題点についても提起できたと思う。

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) Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A and Hiraga T: Role of heparan sulfate proteoglycans surrounding osteoblast lineage cells. J Oral Biosci 査読有 54(1):43-47, 2012.
10.1016/j.job.2012.01.005

[学会発表] (計1件)

(1) 雪田聡、細矢明宏、中村浩彰 : FKBP5 の骨組織における局在とデキサメタゾン応答に対する制御、日本骨代謝学会、2012年7月20日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 浩彰 (NAKAMURA HIROAKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50227930

(2) 研究分担者

細矢 明宏 (HOSOYA AKIHIRO)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：70350824
雪田 聡 (YUKITA AKIRA)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80401214
二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：00360222

(3) 連携研究者

()

研究者番号：