

令和元年6月4日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11604

研究課題名(和文) 神経誘導による顎骨再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of alveolar bone augmentation by nerve guidance

研究代表者

末廣 史雄 (Suehiro, Fumio)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：40524781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨骨髓由来間質細胞(MBMSC)は脳由来神経栄養因子(BDNF)の受容体であるTrkBを発現するとともに、培養上清中にBDNFを分泌していることが示唆された。腸骨骨髓由来間葉系幹細胞の細胞増殖能および骨分化能は、*in vitro*においてはBDNFの影響を受けないことが明らかとなったが、MBMSCの骨分化におけるBDNFの影響については今後のさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、再生医療に関する研究は飛躍的な発展を遂げており、再生医療等製品の承認も進んでいる。しかしながら、いまだ骨再生を目的とした再生医療等製品の承認はなされていない。本研究結果が骨再生医療に直結するわけではないが、骨再生のメカニズムを解析することで骨形成を促進させることが出来れば、我々の目指す顎骨再生医療だけでなく、医科領域における骨粗鬆症予防や骨折治癒薬開発への波及効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：Maxillary/Mandibular Bone Marrow Stromal Cells (MBMSC) express TrkB, which is a receptor for brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and it is suggested that BDNF is secreted in the culture supernatant. Cell proliferation ability and bone differentiation ability of iliac bone marrow-derived mesenchymal stem cells were found to be not affected by BDNF *in vitro*, but further investigations on the influence of BDNF on bone differentiation of MBMSC is necessary.

研究分野：補綴・理工系歯学

キーワード：骨髓由来間質細胞 顎骨骨髓 顎骨再生 BDNF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 骨補填材を含めた顎骨再生のための新規材料の開発や新たな骨再生手法の開発によって、歯科領域における骨再生医療は目覚ましい発展を遂げているが、それでもなお骨再生に用いられる最も予知性の高い移植材は自家骨であるとされている。しかし、自家骨採取は採取時の負担が大きい、採取量に制限がある、知覚麻痺などの後遺症の可能性のある等の欠点があるため患者に敬遠されがちであり、より低侵襲で広範囲の骨欠損に対応できる新たな治療法が開発が望まれている。このような状況の中、歯科領域においても間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) /骨髄由来間質細胞 (Bone Marrow Stromal Cells : BMSC) を用いた骨再生医療が臨床応用され始めており、腸骨 BMSC 移植は自家骨を用いた GBR と比較して有意に骨の形成が促進されたとの報告もあり、その効果は大きな期待を集めている。MSC は様々な組織から分離可能であるが、由来によってその分化の程度は異なるとされている。さらに、同じ骨髄由来間質細胞であっても、顎骨由来の細胞は腸骨由来の細胞より骨分化能が高いとの報告もあることから、顎骨を効率よく確実に再生するためには顎骨骨髄由来間質細胞 (Maxillary/Mandibular Bone Marrow Stromal Cells : MBMSC) 移植が効果的であると予想される。
- (2) 申請者らは MBMSC の in vitro での骨分化能と in vivo での骨形成能が必ずしも一致しないことを報告した。骨髄中にはヘテロな細胞集団が存在しており、骨分化能の高い細胞だけではなく、血管形成 (誘導) 能が高い細胞や神経誘導能が高い細胞が存在すると考えられ、in vitro での培養時に低骨分化細胞が混在することは細胞集団全体の骨分化能を低下させる可能性がある。また、詳細なメカニズムは解明されていないものの、骨形成には新生骨内への血管新生が不可欠であるとされ、さらに、骨代謝および正常な骨の形成は骨内に伸展している神経系の調節を受けているとの報告もある。

2. 研究の目的

- (1) MSC/BMSC を用いて骨再生を図る研究が報告されて以来、自己細胞を用いた骨増生のための研究は数多く行われており、免疫反応や未知ウイルス等による感染の危険性が少ない自己細胞移植のニーズは高い。骨増生には血管新生が必要であるとの報告がある一方で、骨代謝は神経系の調節を受けているとの報告もある。そこで本研究では、MBMSC を用いて神経誘導 (神経突起の伸展) と骨形成との関わりを解析し、骨形成に必要な細胞の性質を明らかにすることで新規骨再生法の実現を行う。さらに骨形成に必要な細胞の新規評価法を開発することで確実な顎骨再生医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

- (1) MBMSC の採取・培養
神経堤由来である顎骨を再生するには、発生を同じくする MBMSC が効果的であると予想される。また、顎骨骨髄は腸骨骨髄とは異なり歯科医師単独での採取が可能であり、歯科医師が行う顎骨再生の有用な細胞ソースとなりうる。顎骨からの細胞採取は、インプラント埋入時に余剰になる骨髄液を、申請者らが既に開発したバイオブシーニードル (一般医療機器 : 09B2X00010G00056) を用いて極めて低侵襲に行う (鹿児島大学倫理委員会承認済 : 課題名「ヒト口腔組織由来骨原性細胞の分離、同定法の確立および骨再生療法の開発」承認番号 170263 疫)。採取した骨髄液は全自動血球計数機を用いて計測を行い、一定の細胞密度で TC plate 上に播種・培養する。
- (2) 脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor : BDNF) が腸骨骨髄由来 MSC に及ぼす影響の検討
MBMSC の採取と並行して、BDNF が腸骨骨髄由来 MSC に及ぼす影響を予備実験として検討する。購入したヒト腸骨由来 MSC の TrkB (BDNF の受容体) の発現をリアルタイム RT-PCR と Western Blotting を用いて検討する。また、購入した BDNF を培地中に添加して細胞増殖能に及ぼす影響は累積細胞増殖曲線を用いて、骨分化に及ぼす影響は ALP 活性定量とアリザリンレッド染色を用いて検討する。
- (3) MBMSC の character 解析
培養・増殖させた MBMSC を用いて抗体アレイおよび TrkB のリアルタイム RT-PCR を行い、MBMSC の character 解析を行う。

4. 研究成果

(1) MBMSC の採取

患者からの顎骨骨髓採取は図1に示すバイオプシーニードルを用いた。患者の同意を得たうえで、インプラント埋入手術時に骨髓採取を行った。本研究期間中に10名の患者から骨髓を採取し、うち7株のMBMSC培養に成功した。



図1

(2) BDNF について

神経栄養因子とは神経細胞に細胞外から作用する液性の蛋白質の総称であり、BDNFはその1つである。骨、軟骨、腎臓、歯胚などの非神経系の組織にも発現しており、細胞レベルでも、歯周靭帯細胞、骨芽細胞、免疫担当細胞、血管内皮細胞、上皮細胞が産生するとの報告がある。また、骨折治癒過程において、骨芽細胞様細胞によって産生されるとの報告や、歯の形成初期において、未分化な上皮系・間葉系細胞の増殖、そして象牙芽細胞やエナメル芽細胞への分化に関与していることが示唆されている。BDNFの受容体にはTrkBとp75があり、高親和性受容体であるTrkBと結合することで様々な作用が発現している。

(3) BDNFが腸骨骨髓由来MSCに及ぼす影響の検討

BDNFの受容体であるTrkBの発現レベルをリアルタイムPCRを用いて検討した結果、骨分化誘導が進むにつれてTrkBの発現量も上昇していることが示唆された(図2)。

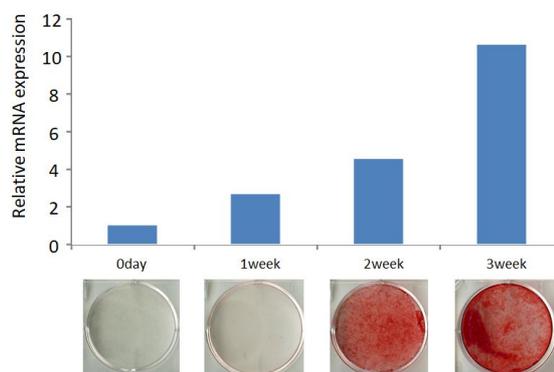


図2

一方で、Western BlottingにてタンパクレベルでのTrkBの発現を調べたところ、TrkBの発現は認められたものの、骨分化誘導に従い発現が上昇する傾向はみられなかった(図3)。

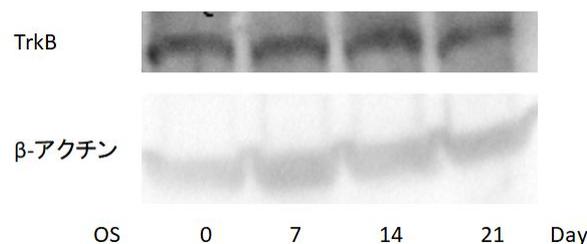


図3

80%コンフルエントに培養したMSCの培地中にBDNFを添加してWST-1 assayを行ったところ、BDNFの添加は、24時間および48時間経過時点で細胞増殖には影響を及ぼさないことが示唆された(図4)。

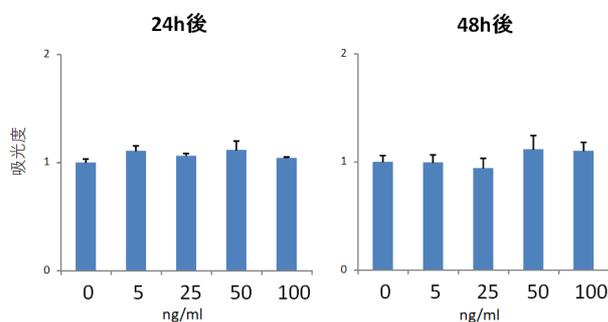


図4

コンフルエントまで培養したMSCの培地を骨分化誘導培地に変更した時点でBDNFを添加し、骨分化への影響を検討したところ、BDNFの添加はALP活性およびアリザリンレッド染色に影響を及ぼさないことが示唆された(図5)。

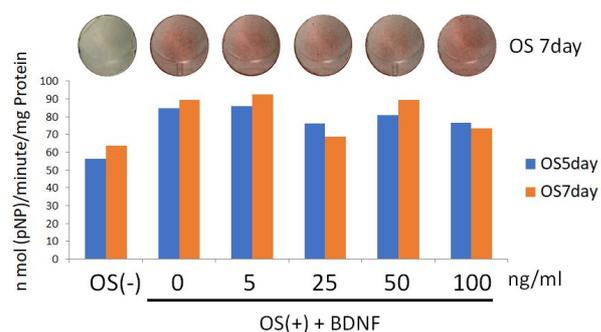


図5

(4) MBMSC のサイトカイン分泌についての検討

採取した MBMSC の培養上清を Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit(R&D systems)を用いて解析したところ、培養上清中への BDNF の分泌が示唆された(図 6)。また、MBMSC の TrkB の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて検討した結果、細胞株によるバラツキはあるものの、TrkB が発現していることが示唆された(図 7)

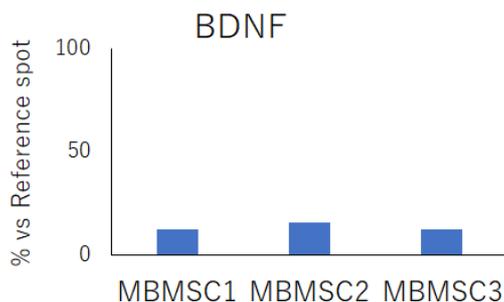


図 6

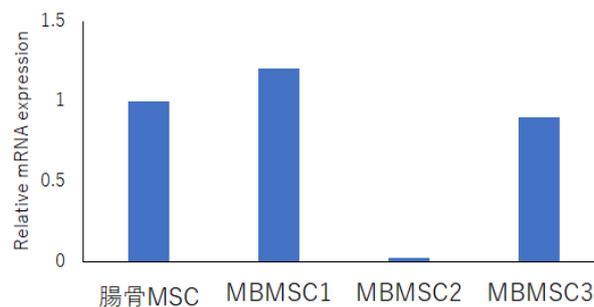


図 7

< 引用文献 >

Kaigler, et al. Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial. *Cell Transplant*, 22, 2013, 767-77

DOI: 10.3727/096368912X652968

西村正宏 他 . 骨増生に向けた顎骨骨髓液採取と間質細胞培養法 . 日口腔インプラント学会誌, 26, 2013, 668-75

Takeda S, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system, *Cell*, 111, 2002, 305-17

DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01049-8

Fukuda T, et al. Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations, *Nature*, 497, 2013, 490-3

DOI: 10.1038/nature12115

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

末廣史雄, 西村正宏. シリーズ/補綴医に贈る再生医療の話 第 1 回「補綴領域で目指す再生医療」. 日本補綴歯科学会誌(査読無), 10(2), 105-110, 2018.

Niibe K, Suehiro F, Oshima M, Nishimura M, Kuboki T, Egusa H. Challenges for Stem Cell-Based "Regenerative Prosthodontics". *Journal of Prosthodontic Research*(査読無), 61, 3-5, 2017.

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. *Clinical Oral Investigations*(査読有), 21(9), 2709-19, 2017.

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*(査読有), 484, 710-718, 2017,

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.001.

Morishita K, Tatsukawa E, Shibata Y, Suehiro F, Kamitakahara M, Yokoi T, Ioku K, Ueda M, Nishimura M, Ikeda T. Diversity of multinucleated giant cells by microstructures of hydroxyapatite and plasma components in extraskeletal implantation model. *Acta Biomaterialia*(査読有), 39, 180-191, 2016.

DOI: 10.1016/j.actbio.2016.05.002

Ahmed GJ, Tatsukawa E, Morishita K, Shibata Y, Suehiro F, Kamitakahara M, Yokoi T, Koji T, Umeda M, Nishimura M, Ikeda T. Regulation and Biological Significance of Formation of Osteoclasts and Foreign Body Giant Cells in an Extraskeletal Implantation Model. *Acta Histochemica et Cytochemica*(査読有), 49, 97-107, 2016.

DOI: 10.1267/ahc.16007

[学会発表] (計 5 件)

末廣 史雄、顎増生治療を目的とした顎骨骨髓由来間質細胞の採取成績、第 36 回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会、2019

末廣 史雄、顎骨骨髓由来間質細胞を用いた骨増生法の開発、平成 30 年度日本補綴歯科学会九州支部会、2018

末廣 史雄、吸収性乳酸/グリコール酸共重合体 (PLGA) 膜と非吸収性高密度 4 フッ化エチレン樹脂 (d-PTFE) 膜を用いた GBR の比較検討、第 47 回日本口腔インプラント学会学術大会、2017

末廣 史雄、顎骨再生を目的とした顎骨骨髓間質細胞培養法の開発、第 127 回日本補綴歯科学会、2017

末廣 史雄、顎骨増生を目的とした低侵襲・効率的な顎骨骨髓間質細胞培養法の開発、平成 28 年度日本補綴歯科学会九州支部、中国・四国支部合同学術大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：西村 正宏

ローマ字氏名：Nishimura Masahiro

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域歯学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：00294570

研究分担者氏名：石井 正和

ローマ字氏名：Ishii Masakazu

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域歯学系

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：00456683

(2)研究協力者

研究協力者氏名：駒走 尚大

ローマ字氏名：Komabashiri Naohiro