

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04394

研究課題名(和文) 自己体性幹細胞の多軸的制御と可視的評価による委縮顎骨の増生治療開発

研究課題名(英文) Multiple control and visualization of self-somatic- stem cells for atrophic jaw bone augmentation

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨骨髓中に存在する間葉系幹細胞(MBMSC)は顎骨増生のための有望なセルソースである。MBMSCの特性解析により、MBMSCは腸骨骨髓由来MSC(IBMSC)に比べ、骨・軟骨分化能は同等であるが、脂肪分化能が低いことが判明した。またMBMSCとIBMSCにおいて多数のmiRNA発現パターンが異なることが判明した。また、リンパ管新生因子であるVEGF-CにMSCの遊走促進効果があることが見出された。さらに、ホウレンソウ由来糖脂質にLPS誘導性の血管炎症の抑制効果があることが示された。これらの研究成果をMBMSCによる骨増生療法に応用することにより、治療効果を向上させる可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎骨骨髓はインプラント手術の際に、新たな侵襲を加えずに簡便に採取ができ、ごく少量の骨髓液からでもMBMSCの培養が可能である。また、患者の年齢に関わらず細胞を得ることができる。この点が他の組織由来MSCよりも優れた点である。しかし、これまでMBMSC移植による骨増生効果にはバラツキが大きく、治療効果を一定にコントロールすることができなかった。本研究成果によって、MBMSCの機能を制御する分子が見出され、これらの分子の発現解析が新たな細胞評価基盤技術となる可能性がある。また、本研究成果は歯科領域のみならず、幅広い領域の細胞移植治療にも応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells present in jaw bone marrow (MBMSCs) are a promising cell source for jaw bone regeneration. The function of MBMSCs is still unclear, and it is important to understand its characteristics accurately for successful bone regeneration therapy by MBMSCs. For the characterization of MBMSCs, we compared the differentiation potential of MBMSCs and iliac bone marrow derived MSCs (IBMSCs). It was revealed that MBMSCs had a low adipose differentiation potential, although bone and cartilage differentiation potential were equivalent. It was revealed that there are many miRNAs with different expression patterns in MBMSC and IBMSC. It was found that VEGF-C has an effect of promoting MSC migration. In addition, spinach-derived glycolipids were shown to have an inhibitory effect on LPS-induced vascular inflammation. It is suggested that the application of these research results to the bone regeneration therapy by MBMSC may improve the therapeutic effect.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 骨再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

顎堤が高度に委縮した患者に対し、適切な補綴治療を行うためには委縮した骨を増生させる必要がある。現在の一般的な骨増生法は自家骨移植であるが、採取できる骨量に限りがある点や、採骨部に知覚麻痺が残るなどの問題点も多く、骨移植に代わる骨増生療法の開発が切望されている。骨移植に代わる新しい骨増生療法として、幹細胞を用いた骨増生法が期待され、そのためのセルソースとして、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell:MSC)が注目されている。MSCは腸骨骨髓、脂肪組織、滑膜、歯髄など生体内の様々な組織に存在することが報告され、これまで多数の基礎研究が実施されている。近年、国内において腸骨骨髓由来MSC(ilic bone marrow MSC:IBMSC)や、脂肪由来間葉系幹細胞(Adipose Derived Stem Cell:ADSC)を用いた顎骨再生の臨床研究も実施されている。

我々は、顎骨骨髓中に存在するMSC(Mandible/Maxillofacial bone marrow MSC:MBMSC)はIBMSCと同等かそれ以上の骨分化能を有することを見出し、以前よりその有用性に着目してきた。IBMSCやADSCは組織採取の際の侵襲性が問題となるが、顎骨骨髓はインプラント手術の際に、新たな侵襲を加えずに簡便に採取ができ、ごく少量の骨髓液からでもMBMSCの培養が可能である。また、患者の年齢に関わらず細胞を得ることができる。この点が他の組織由来MSCよりも優位な点である。MBMSCを用いた骨再生療法を実施するにあたり、有効性の担保は最も重要な課題である。しかしながら、MBMSCを用いて骨分化能評価を行ったところ、MBMSCの骨分化能はドナー間での個体差が大きく、中には全く骨分化しない細胞や、移植した際に生体内での骨形成能が極めて低い細胞があることも判明した。したがって、MBMSCによる骨増生療法を成功させるためには、MBMSCの特性を十分に解析し、正確に理解することが重要である。また、分化能や生体内での再生能の低い細胞に対しては、何らかの手法を用いて細胞機能の向上や、移植効果を高める必要があるが、現時点では効果的な手法が見つかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、MBMSC移植による骨増生効果を向上させる手法を確立することが目的である。この目標をクリアするために、(1)MBMSCの特性を多面的に解析し、MBMSCの機能制御分子の解明、(2)MSCに対する新規遊走促進法の探索、(3)フィトケミカルを用いた新規組織再生法の探索の3課題について評価し、最終的な目標であるMBMSCを用いた顎骨増生療法の早期臨床応用を目指す。

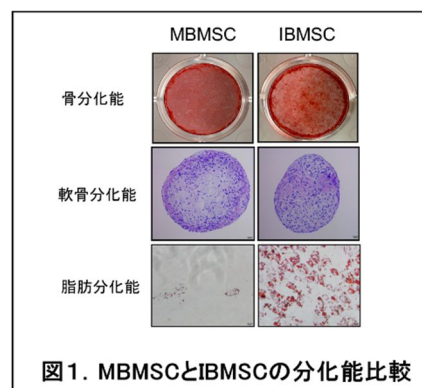
### 3. 研究の方法

ヒト顎骨由来間葉系幹細胞(MBMSC)の採取は、鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得て(承認番号:170263 課題名:「ヒト口腔組織由来骨原性細胞の分離、同定と骨再生療法の開発」)、インプラント手術の際に患者の同意のもとで骨髓液を採取した。採取した骨髓液を播種し、MBMSCの培養をおこなう。腸骨骨髓由来MSC(ilic bone marrow MSC:IBMSC)および、血管内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell:HUVEC)はLonza社より購入したものをを使用した。MBMSCの特性解析は、MBMSCおよびIBMSCにおいて、増殖能、分化能、MSC特異的細胞表面抗原発現の評価をおこなった。また、多能性マーカーおよび神経堤細胞マーカー発現比較はリアルタイムPCRによって評価した。MSCに対する新規遊走促進法の探索において、血管内皮細胞増殖因子C(VEGF-C)を用い、細胞遊走の評価はトランズウェルチャンバー法を用いた。さらに、VEGF-C添加による細胞内シグナル変化をウエスタンブロットにより評価した。フィトケミカルを用いた新規組織再生法の探索では、ホウレンソウ由来糖脂質(digalactosyl diacylglycerol:DGDG, monogalactosyl diacylglycerol:MGDG)を用いて、血管内皮細胞に対する抗炎症効果について評価した。HUVECにおいて、LPS刺激による炎症に対する抗炎症反応、および糖脂質添加による細胞内シグナル変化について評価をおこなった。

### 4. 研究成果

#### (1) MBMSCの特性解析

顎骨からの骨髓液の採取は、専用の骨髓穿刺針を用いることによって、簡便に安定的に採取することが可能である。初代培養に成功したMBMSCを5株、IBMSCを3株用意した。本研究に用いたMBMSCはドナー年齢が39歳~69歳、IBMSCのドナー年齢は25歳~41歳であった。継代数はいずれの細胞もP5~P7のものを使用した。各細胞間の増殖能の評価をおこなった結果、株間による増殖能の差は認められるが、MBMSCとIBMSC間での顕著な差は認められなかった。次に、フローサイトリーによる細胞表面抗原発現比較をおこなった。本研究では、CD11、CD13、CD29、CD34、



CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-DR, HLA-ABC について評価をおこなった。CD105 において、株間で陽性率 (13.4% ~ 92.8%) にバラツキが認められたが、MBMSC と IBMSC 間で有意な差は認められなかった。

次に、MBMSC と IBMSC の骨・軟骨・脂肪分化能の比較をおこなった。骨・軟骨分化能は同等であったが、MBMSC の脂肪分化能は5株すべての細胞において著しく低いことが明らかとなった (図1)。MBMSC において脂肪分化が抑制されるメカニズムの解明のため、多能性幹細胞マーカー (Oct-4, SOX2, Nanog) 遺伝子発現を比較した。また、顎骨は神経堤由来組織であるため、神経堤細胞マーカー (SOX10, p75NTR, FOXD3) 遺伝子発現比較をおこなった (図2) これらの遺伝子は株間における差は認められるが、MBMSC において顕著に低い傾向は示さなかった。

近年、幹細胞の分化制御に重要な役割を果たしていると報告されている因子として、マイクロ RNA(miRNA)が注目されている。次に、我々は5株のMBMSCと3株のIBMSCを用いて、細胞内に発現するmiRNAについて網羅的に解析をおこなった。MBMSCとIBMSCにおいて多数のmiRNA発現に差があることが判明した (図3)。

本研究成果により、由来する組織 (顎骨、腸骨) の違いでmiRNA発現パターンが大きく異なることが初めて見出された。MBMSCとIBMSCにおける分化能の差異はこれらのmiRNAによって制御されている可能性があり、現在これらのmiRNAの機能解析を実施中である

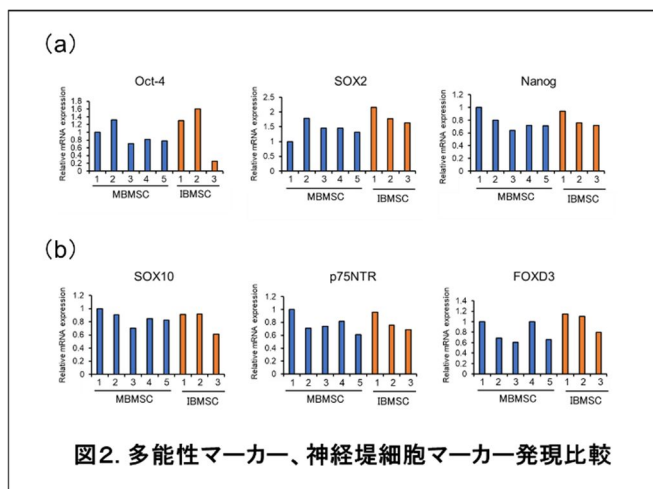


図2. 多能性マーカー、神経堤細胞マーカー発現比較

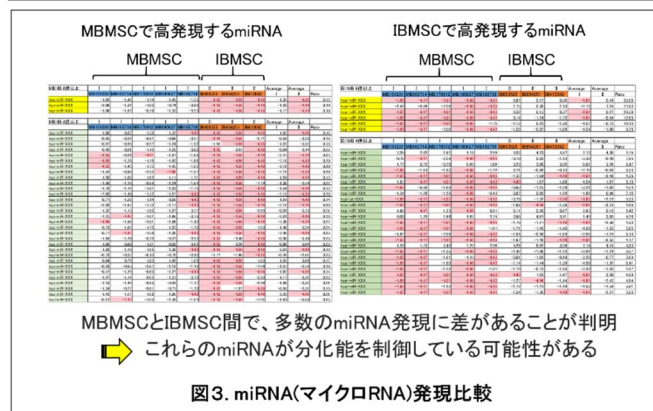


図3. miRNA(マイクロRNA)発現比較

## (2) VEGF-CによるMSC遊走促進効果の検討

MSCは移植後に傷害部位に遊走することが知られており、局所の環境により様々な細胞に分化する。しかし、過去の研究で、移植されたMSCの大部分が傷害部位に到達できないことや、移植されたMSCが移植部位から流出してしまい、これらによって治療効果が制限される可能性があることが指摘されている。したがって、MSCの遊走能力を強化することにより、損傷した組織の再生と修復が促進されると考えられる。MSCの遊走を促進する因子として、PDGF-BB, SDF-1, bFGFなどが知られている。

血管内皮細胞増殖因子C (VEGF-C)はVEGFファミリーメンバーであり、さまざまな生物活性を示すことが報告されている。VEGF-Cは、特異的受容体 (VEGFR2/VEGFR3) を介して、リンパ管内皮細胞および血管内皮細胞の増殖と遊走を促進し、リンパ管新生や血管新生を誘導することが知られている。我々は以前の研究で、VEGF-Cが間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) においてERKシグナルを介して *in vitro*での骨分化を促進することを報告した (Murakami J, BBRC, 2017)。ERKシグナルは細胞の増殖や遊走に関与することが知られているが、VEGF-CがMSCの遊走に及ぼす影響については不明である。そこで、本研究では、VEGF-CによるMSCsの遊走促進効果について評価をおこなった。

VEGF-CはMSCにおいてアクチン再重合、接着斑形成を促進することにより、MSCsの遊走を促進した。また、遊走促進作用はVEGFR2/VEGFR3を介して、ERKおよびFAKシグ

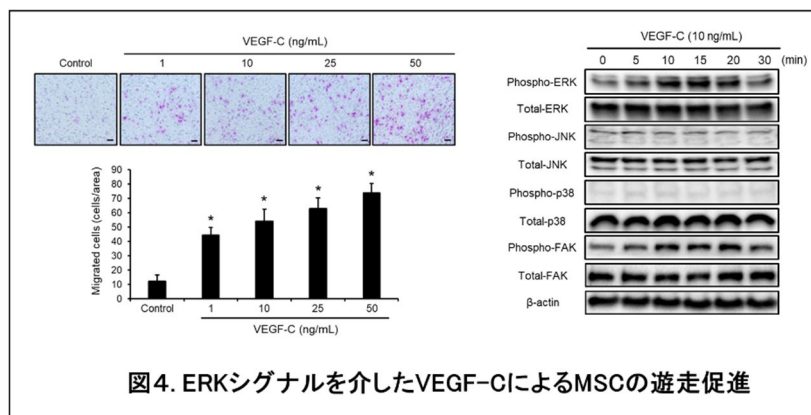


図4. ERKシグナルを介したVEGF-CによるMSCの遊走促進

ナルを活性化して誘導されることが明らかとなった(図4)(Ishii M, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2018)。以上の結果から、VEGF-CはMSCsの遊走および骨分化を促進することが明らかとなり、VEGF-CはMSCを用いた骨再生治療に役立つ可能性が示された。

### (3) フィトケミカルによる新規生理活性の探索

植物中に含有する天然化合物(フィトケミカル)は抗酸化作用など様々な作用を示し、近年非常に注目されている。これまで判明しているフィトケミカルは約1500種類あるが、未知の成分も多くあり、その効果についても不明なものが多い。我々はフィトケミカルを再生医療の分野にも応用可能であるか、現在さまざまな探索をおこなっている。我々の過去の研究では、ソウハクヒなどに多く含有する  $\gamma$ -アミリンが血管内皮細胞に対して Akt/eNOS シグナルを活性化することにより、血管新生を促進することを報告している(Ishii M, *BBRC*, 2015)。

組織再生において、血管・リンパ管を含む脈管系の形成は非常に重要である。我々は様々なフィトケミカルを用いて、血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞に対する影響の評価をおこなってきた。これらの探索を行う中で、ハウレンソウに多く含有する糖脂質(digalactosyl diacylglycerol:DGDG, monogalactosyl diacylglycerol:MGDG)が血管内皮細胞に対して、LPS誘導性の炎症を抑制することを見出した。この抗炎症作用はeNOSおよびNF- $\kappa$ Bシグナルを介して誘導されることを明らかとした(図5)(Ishii M, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017)。

組織再生における血管の重要性が多数報告されていることから、本研究成果をさらに発展させ、上記のフィトケミカルが組織再生に応用できる可能性を探索していく予定である。

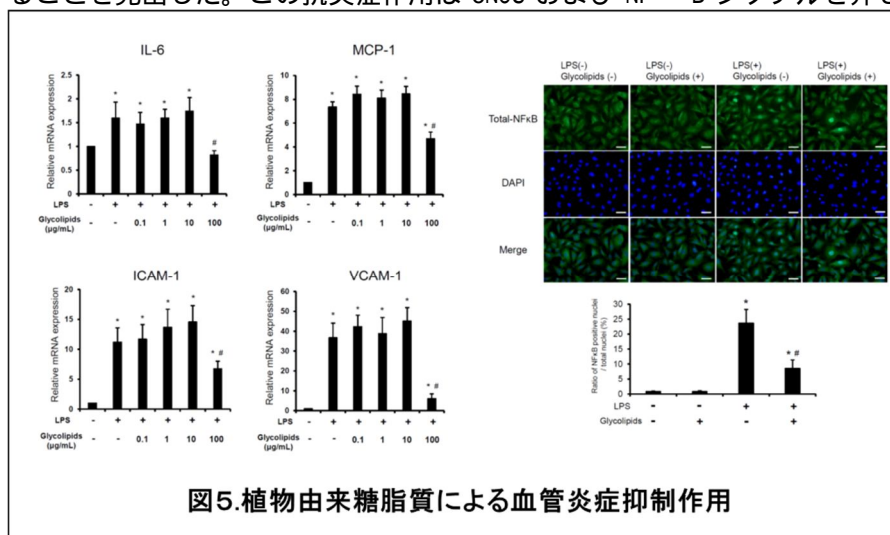


図5.植物由来糖脂質による血管炎症抑制作用

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishii M, Takahashi M, Murakami J, Yanagisawa T, Nishimura M.	4. 巻 455
2. 論文標題 Vascular Endothelial Growth Factor-C Promotes Human Mesenchymal Stem Cell Migration via an ERK- and FAK-dependent Mechanism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 185-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-018-3481-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 末廣史雄, 西村正宏	4. 巻 10
2. 論文標題 シリーズ/補綴医に贈る再生医療の話 第1回	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本補綴歯科学会誌	6. 最初と最後の頁 105-110
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii M, Nakahara T, Araho D, Murakami J, Nishimura M	4. 巻 91
2. 論文標題 Glycolipids from spinach suppress LPS-induced vascular inflammation through eNOS and NF- B signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2017.04.052.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 駒走 尚大, 末廣 史雄, 石井 正和, 柳澤 高大, 西村 正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間質細胞の骨分化能判定のためのマーカー探索
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suehiro F, Ishii M, Komabashiri N, Masuzaki T, Kawamoto S, Nishimura M
2. 発表標題 The efficacy of maxillary/mandibular bone marrow stromal cells for bone regeneration
3. 学会等名 EAO 28th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田春香, 石井正和, 西村正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間葉系幹細胞の特性解析
3. 学会等名 第1回南九州歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 駒走 尚大, 末廣 史雄, 益崎 与泰, 西村 正宏
2. 発表標題 骨再生に対する顎骨骨髓間質細胞の有効性
3. 学会等名 令和元年度日本補綴歯科学会九州支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村正宏
2. 発表標題 企画講演 顎骨の造成・増生の未来
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019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 柳澤嵩大, 石井正和, 高橋まなみ, 村上寿理, 西村正宏
2. 発表標題 VEGF-Cによる骨髓間葉系幹細胞の遊走促進効果
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 西村正宏
2. 発表標題 口腔インプラント治療と材料に関わる近年の動向
3. 学会等名 H29年度鹿児島市歯科医師会・前期学会（鹿児島県歯科医師会館）（招待講演）
4. 発表年 2017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	石井 正和  (ISHII Masakazu)  (00456683)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教   (17701)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	朝比奈 泉  (ASAHINA Izumi)  (30221039)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授    (17301)	
研究分担者	山田 和彦  (YAMADA Kazuhiko)  (40241103)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授    (17701)	削除：2019年9月17日
研究分担者	小賤 健一郎  (KOSAI Kenichirou)  (90258418)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	
研究分担者	佐原 寿史  (SAHARA Hisashi)  (90452333)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・准教授    (17701)	追加：2019年9月17日