

令和 3 年 5 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：2018～2020

課題番号：18K09687

研究課題名(和文)顎骨間葉系幹細胞由来エクソソームを利用した新規顎骨増生療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel mandibular bone augmentation therapy using exosomes derived from mandibular/maxillary bone marrow derived 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨骨髓中に存在するMBMSCは顎骨増生のための有望なセルソースである。本研究により、MBMSCは他の組織由来MSCと脂肪分化能やmiRNA発現パターンが異なり、特徴的な性質を持つことが判明した。本研究で、MBMSC由来エクソソームの単離に成功したが、収量が非常に少なく、今後、単離方法の改善が必要である。また、本研究では、抗菌性ペプチドおよび植物由来活性物質による新規生物活性(リンパ管新生、骨分化促進)を見出した。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、MBMSC移植による骨増生効果を向上させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでMBMSC移植による骨増生効果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の特性や機能分子の一部が明らかとなった。さらに、リンパ管新生や骨分化促進といった組織再生を促進する新規物質を見出すことにも成功した。これらの研究成果を活用することにより、より効果的な骨増生治療を実施できる可能性が見出された。また、本研究成果は歯科領域のみならず、幅広い領域の骨再生治療にも応用可能であると考えられ、社会的意義の高い研究成果であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Mandibular/Maxillofacial bone marrow mesenchymal stem cells (MBMSCs) is a promising cell source for mandibular bone regeneration. MBMSC was found to have characteristic properties because it differs from other tissue-derived MSCs in adipogenic differentiation ability and miRNA expression pattern. In this study, we succeeded in purifying MBMSC-derived exosomes, but the yield of exosomes was very low. So, isolation method is need to improved. In addition, in this study, we succeeded in identifying novel biological activities in antimicrobial peptides and plant-derived bioactive substances. It was suggested that applying these research results to bone regeneration therapy by MBMSC transplantation may improve the bone regenerative effect.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 骨再生 エクソソーム miRNA

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/Maxillary bone marrow MSC:MBMSC)が 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単に採取ができ、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 *in vitro* で全く骨分化しない細胞や、移植した際に生体内 (*in vivo*) 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。従って、骨増生を安定的に行うことができる新規の治療法の開発が望まれている。

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) MBMSC に発現する分子を用いたセルフリー骨増生法の可能性探索のため、MBMSC から分泌されるエクソソームの発現解析、および miRNA 発現解析、(3) 組織再生促進を目的とした抗菌性ペプチド、および植物由来活性成分の新規作用の探索をおこない、最終的な目標である新規の顎骨増生療法の開発を目指す。

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 疫 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)は Lonza 社より購入したものを使用した。本研究では、MBMSC を 5 株、IBMSC を 3 株用いて評価をおこなった。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。MBMSC の特性解析を目的として、MBMSC と IBMSC において、骨、軟骨、脂肪分化能比較、フローサイトメトリーにて MSC 特異的細胞表面抗原発現 (CD11, CD13, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-DR, HLA-ABC) の評価をおこなった。

MBMSC の培養上清中に分泌するエクソソームの採取は、それをフォスファチジルセリン (PS) アフィニティー法 (MagCapture: Wako)、ポリマー沈殿法 (ExoQuick-TC: SBI)、カラム精製法 (Capturem: Takara) を用いた。採取したエクソソームの評価は、エクソソームマーカータンパク (CD9, CD63, CD81, HSP70) 発現をウエスタンブロットングによって評価をおこなった。

miRNA 発現解析は、5 株の未分化 MBMSC および 3 株の未分化 IBMSC を用いておこなった。それぞれの細胞からセルライゼートを作成し、3D-Gene マイクロ RNA チップ (東レ) によって網羅的に発現を解析した。

抗菌性ペプチド LL-37 によるリンパ管新生促進効果について、リンパ管内皮細胞に対する増殖、遊走、管腔形成に与える影響を評価した。また、植物由来活性物質 (ブラックジンジャーエキス) による骨分化促進作用について評価をおこなった。

4. 研究成果

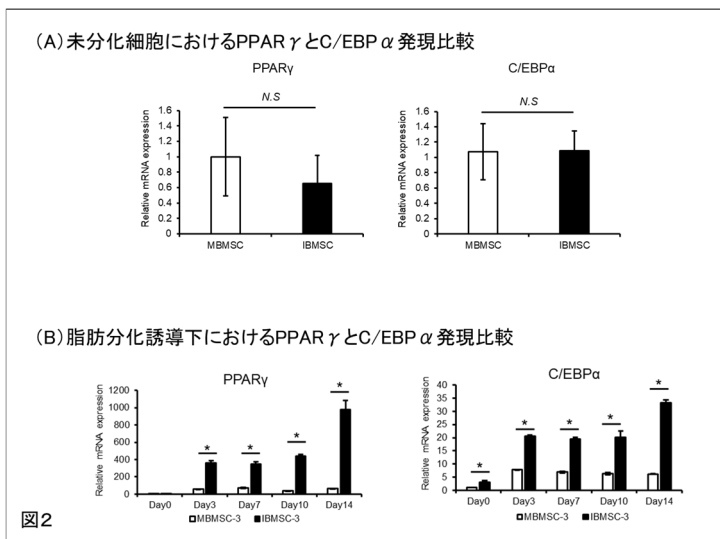
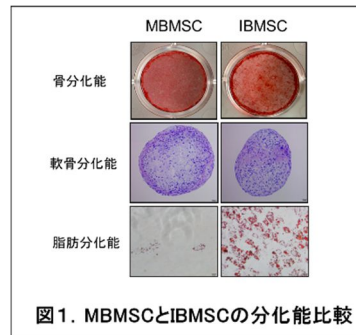
(1) MBMSC と IBMSC の特性解析

本研究で用いた MBMSC と IBMSC において特性解析をおこなった。各細胞間における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、フローサイトメ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、その他の細胞表面抗原においては、MBMSC と IBMSC 間で有意な差は認められなかった。

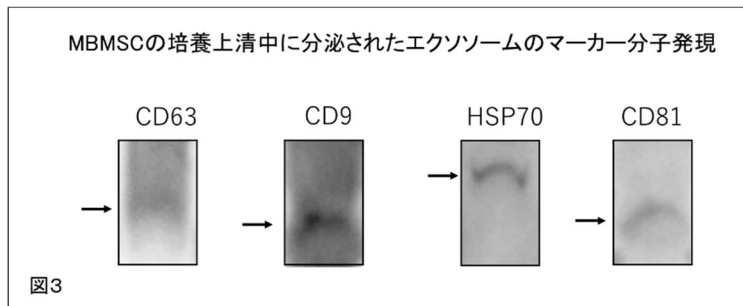
次に、MBMSC と IBMSC の骨・軟骨・脂肪分化能の比較をおこなった。骨・軟骨分化能は同等であったが、MBMSC の脂肪分化能は 5 株すべての細胞において著しく低いことが明らかとなった (図 1)。MBMSC において脂肪分化が抑制されるメカニズムの解明のため、多能性幹細胞マーカー (Oct-4, SOX2, Nanog) 遺伝子発現を比較した。また、顎骨は神経堤由来組織であるため、神経堤細胞マーカー (SOX10, p75NTR, FOXD3) 遺伝子発現比較をおこなった。今回評価をおこなった多能性幹細胞マーカー、および神経堤細胞由来マーカー遺伝子発現は、細胞株間における差は認められたが、MBMSC と IBMSC 間において有意な差は認められなかった。

MBMSC において脂肪分化能が低下している分子メカニズムの解明のために、脂肪分化に重要な働きをする転写因子である PPAR γ , C/EBP α , 遺伝子発現比較をおこなった。未分化状態では、MBMSC と IBMSC において有意な発現の差は認められないが、脂肪分化誘下においては、MBMSC は IBMSC に比べ有意に発現の低下が認められた (図 2)。さらに、MBMSC はグルコーストランスポーターである GLUT4 の発現が低く、細胞内へのグルコースの取り込みも抑制されていることが明らかとなった。以上の結果から、MBMSC は他の組織由来 MSC とは異なる特性を有しており、脂肪になりにくいことから、骨の再生に用いるセルソースとしては適していることが判明した。



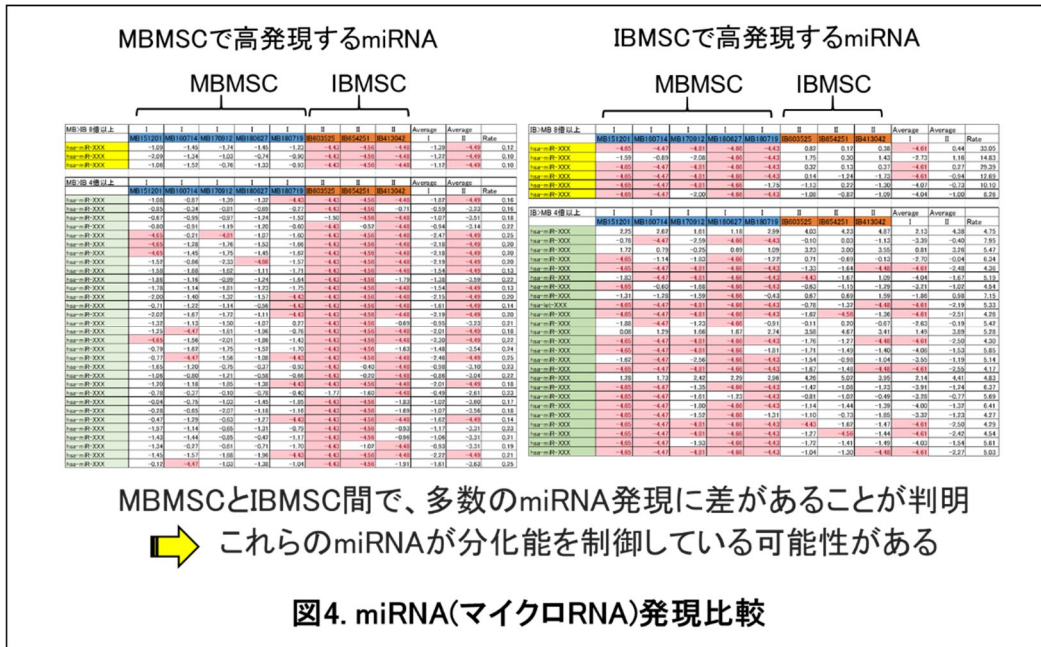
(2) MBMSC に発現する分子を用いたセルフリー骨増生法の可能性探索

エクソソームにはタンパク質や miRNA、mRNA などの分子が含まれ、由来する細胞と類似の機能が備わり、細胞間相互作用に重要な働きをする。そこで、MBMSC から分泌されるエクソソームを分離して、エクソソーム移植による骨増生治療の可能性について探索した。MBMSC からのエクソソームの採取は、フォスファチジルセリン (PS) アフィニティー法、ポリマー沈殿法、カラム精製法を用いておこなった。MBMSC の培養上清を準備し、上記 3 種類の方法によって、エクソソームの精製をおこなったところ、フォスファチジルセリン (PS) アフィニティー法、カラム精製法ではエクソソームの採取はできなかった。ポリマー沈殿法で精製したエクソソームにおいて、エクソソームマーカータンパク発現評価をおこなったところ、CD9、CD63、CD81、HSP70 の発現が確認された (図 3)。以上の結果から、ポリマー沈殿法を用いることによって、MBMSC からエクソソームを採取することが可能となった。一方で、MBMSC から精製されるエクソソームが非常に少量であり、骨増生治療に用いるために必要な量のエクソソームを準備するためには、大量の MBMSC の培養上清が必要となる。MBMSC を大量に増殖させるためには、継代培養を複数回行う必要が生じるが、継代数が異なる細胞間で分泌されるエクソソームが同質のものか、現時点では不明であるため、今後解析する必要がある。



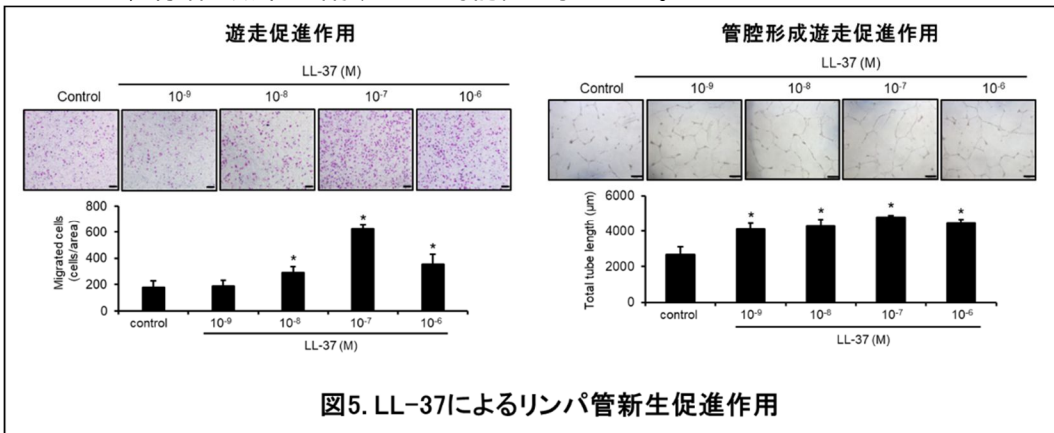
近年、幹細胞の分化制御に重要な役割を果たしていると報告されている因子として、マイクロ RNA (miRNA) が注目されている。我々は 5 株の MBMSC と 3 株の IBMSC を用いて、細胞内に発現する miRNA について網羅的に解析をおこなった。MBMSC と IBMSC において多数の miRNA 発現に差があることが判明した (図 4)。また、MBMSC の骨分化能の異なる細胞間で miRNA 発現比較をおこな

ったところ、骨分化能が高い細胞群において4倍以上高発現するmiRNAが36個、骨分化能が低い細胞群において4倍以上高発現するmiRNAが34個あることが判明した。現在、これらのmiRNAが制御する遺伝子を解析中であり、骨形成に關与する可能性のあるmiRNAについては、今後生体内へ移植をおこない骨形成促進作用について評価をおこなう予定である。



(3) 組織再生促進を目的とした抗菌性ペプチド、および植物由来活性成分の新規作用の探索

骨組織再生の促進において、再生部位に脈管系(血管およびリンパ管)の誘導が重要であることが報告されている。本研究では、抗菌性ペプチドであるLL-37の新規機能の探索のために、リンパ管新生促進作用について評価をおこなった。LL-37の作用により、リンパ管内皮細胞は増殖促進傾向を示すことが明らかとなった。また、LL-37はリンパ管内皮細胞の遊走および、管腔形成を促進することが明らかとなった(図5)。この結果から、LL-37はリンパ管新生促進効果を示すことが初めて見出された。この結果は、MBMSC移植による骨増生時に、MSCとLL-37を併用することにより、骨増生効果が増強される可能性が示された。



MBMSCの骨分化能は個体間でバラつきが大きい。骨分化能の低いMBMSCに対しては、その骨分化能を向上させることによって、移植による骨増生効果を高めることができる可能性がある。そこで、骨分化能を向上させる新規物質の探索をおこなうことを目的とし、植物由来活性成分であるブラックジンジャーエキスによるMSCの骨分化へ与える影響について評価した。骨分化誘導培地中に、1, 2.5, 5, 10 μ Mのブラックジンジャーエキスの添加によってMSCの骨分化が促進することが見出された。本研究により、骨分化能が低いMSCに対して、細胞移植前にブラックジンジャーエキスで処理することによって骨分化能を回復させる可能性があり、骨増生治療において有用な働きをする可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komabashiri N, Suehiro F, Ishii M, Nishimura M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Efficacy of chitinase-3-like protein 1 as an in vivo bone formation-predictable marker of maxillary/mandibular bone marrow stromal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 38-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.03.004	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 Yanagisawa T, Ishii M, Takahashi M, Fujishima K, Nishimura M.	4. 巻 47
2. 論文標題 Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 Promotes Lymphangiogenesis in Lymphatic Endothelial Cells through the ERK and Akt Signaling Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 6841-6854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-020-05741-8.	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, 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 2019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 Shimizu Y, Polavarapu R, Eskla KL, Pantner Y, Nicholson CK, Ishii M, Brunnhoezl D, Mauria R, Husain A, Naqvi N, Murohara T, Calvert JW.	4. 巻 7
2. 論文標題 Impact of Lymphangiogenesis on Cardiac Remodeling After Ischemia and Reperfusion Injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e009565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.118.009565.	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0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 嵩大, 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 柳澤 嵩大, 石井 正和, 西村 正宏
2. 発表標題 抗菌性ペプチドLL37のリンパ管新生促進効果の検討
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 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 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による骨髄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 駒走尚大、末廣史雄、石井正和、柳澤嵩大、西村正宏
2. 発表標題 顎骨骨髄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 花本史菜、新穂大介、中原達雄、石井正和、西村正宏
2. 発表標題 ホウレンソウ由来糖脂質によるeNOSおよびNF- κ Bシグナルを介した血管炎症反応の抑制
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 リンパ管内皮細胞遊走促進剤	発明者 石井正和、西村正宏、田川 岳、桑原浩誠、柚木 彩	権利者 国立大学法人 鹿児島大学、丸善製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-096208	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 骨形成促進剤および骨形成促進用経口組成物	発明者 石井正和、西村正宏、田川 岳、桑原浩誠	権利者 国立大学法人 鹿児島大学、丸善製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-123939	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂肪細胞分化抑制剤、脂肪細胞分化抑制用経口組成物、脂肪滴肥大抑制剤および脂肪滴肥大抑制用経口組成物	発明者 石井正和、西村正宏、田川 岳、桑原浩誠	権利者 国立大学法人 鹿児島大学、丸善製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-151661	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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 Masahiro) (00294570)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (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
---------	---------