

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390497

研究課題名 (和文) 自己由来細胞の機能制御による顎骨再生医療の開発

研究課題名 (英文) Development of alveolar bone regenerative medicine using regulated autologous cells

研究代表者

西村 正宏 (NISHIMURA MASAHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00294570

研究成果の概要 (和文)：

自己由来の間葉系幹細胞 (MSC) を用いて顎堤を低侵襲に増生させるための基礎研究を行った。まず顎骨から骨髓穿刺によって骨分化能の高い細胞を採取する方法を確立した。ついで移植細胞の分化能評価に応用できる MSC のマーカーを同定した。MSC と組み合わせる骨補填材としては β -リン酸三カルシウムがハイドロキシアパタイトよりも適している事など骨再生医療の展開に向けた MSC の基盤データを得た。

研究成果の概要 (英文)：

We have studied basic area how to augment alveolar ridge by minimum intervention using autologous alveolar bone derived mesenchymal stem cells (MSC). We successfully collected MSC from alveolar bone and expanded them *in vitro*. We have found MSC specific gene and osteogenesis marker. We have found that β -tricalcium phosphates as the suitable scaffold combined with MSC for bone augmentation. Taken together, we have found several basic findings for future bone tissue engineering medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科補綴学一般

キーワード：再生医療、骨再生、幹細胞、間葉系幹細胞、歯槽骨再生

1. 研究開始当初の背景

骨再生のために自己由来細胞として利用できる細胞には組織幹細胞あるいは、未分化状

態に遺伝子改変した iPS 細胞があるが、後者は癌遺伝子を導入している事で自己細胞とは呼べず、移植した際には腫瘍形成の確率が

高かった。そこで、研究開始当初は早期に骨を増生するために、例えば腸骨骨髓由来細胞をPRPと混合して吸収した顎堤に移植することで顎堤を増生させる研究が動物で行われて、ヒトでの臨床研究も開始されていた。しかし細胞を使った再生医療が普及しにくい原因として臨床において大きく以下の2点があった。

(1) 腸骨骨髓由来細胞の採取が歯科領域では困難である。

(2) 採取した間葉系幹細胞の機能を制御することが困難である。

2. 研究の目的

(1) 腸骨骨髓由来細胞の採取が歯科領域では困難であることから、顎骨から骨分化可能細胞を分離する方法を確立すること。

(2) 採取した間葉系幹細胞(MSC)の機能を制御するために、まず間葉系幹細胞の表現形そのものを解析することから、MSCの移植方法まで以下の点を解明することを目的とした。

①MSC 特異的遺伝子の解明

②MSCの骨分化関連転写因子の解明

③MSCの骨分化促進法の解明

④MSCと移植した際に骨分化を最も促進する骨補填材の解析

⑤MSC/骨補填材の確実な移植方法の開発

⑥歯肉からの骨分化可能細胞の分取

3. 研究の方法

(1) 顎骨から骨分化可能細胞を分離する方法の確立

当初は効率よく確実に骨髓液を吸引することすらできなかったため、(株)ジーシーと共同で顎骨骨髓穿刺専用のデバイスを開発した(図1)。この穿刺針を用いてイヌの顎骨を局所麻酔後、骨膜に至る切開を加え、ドリルで皮質骨を穿通後、骨髓液をコンスタントに吸引可能になった(図2)。そして吸引直後に添加する抗凝固剤、播種時の添加因子(アスコルビン酸や血小板由来因子)、播種時の有核細胞の密度、採取から培養皿へ播種するまでの時間、播種時の血清の種類とその濃度、酸素分圧等の違いによる接着細胞数の違いについて検討した。



図1 開発した顎骨骨髓用の穿刺針



図2 穿刺針でのイヌ顎骨からの穿刺過程

(2) MSCの機能制御

①MSCの機能制御特異的遺伝子の解明

未分化状態のMSC、軟骨、脂肪、骨に分化させたMSC、皮膚線維芽細胞、滑膜線維芽細胞からRNAを採取してマイクロアレイ解析を行い、未分化状態のMSCに特異的に発現する遺伝子を特定した。さらに特定した遺伝子がコードするタンパク質の抗体による、骨髓全体の免疫染色を行い、MSCの生体内における局在位置を検討した。

②MSCの骨分化に関連する転写因子の解明

未分化状態のヒトMSC、24時間骨分化後のMSC、28日間それぞれ骨、軟骨、脂肪分化後のMSC、および線維芽細胞からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイにて遺伝子発現解析を行った。選定した遺伝子のsmall interference RNA(siRNA)導入実験により各遺伝子がMSCの骨分化に与える影響を検討した。さらに24時間骨分化後のMSCに加えて、24時間脂肪、軟骨分化誘導したMSCからのRNAも採取してマイクロアレイの検討に加え、これらに対するsiRNAを製作して、抑制実験を行った。

③MSCの骨分化促進法の解明

これまでに*in vivo*及び*in vitro*でMSCの骨分化を促進する因子としてBMP-2、TGF- β 、PDGF、IGF-Iなどのサイトカインや、PGEやスタチンといった化合物が研究されているが再生医療において、これらの因子の安全性、有効性、コストが理想的であるとはいえないため、安価で安全な植物由来の骨分化促進因子として植物レクチンを検討し、その骨分化機構の解明を試みた。

④MSCと共に移植した際に最も骨形成を促進する骨補填材の解析

MSCにとって骨を最も形成しやすい骨補填材の諸性質については明らかになっていないため、 β -リン酸三カルシウム(β -TCP)とハイドロキシアパタイト(HAP)のMSCの骨分化と骨形成に与える影響を*in vitro*と*in vivo*の両面から比較した。*In vitro*の検討では、ラット大腿骨より通法によりMSCを分離し、プラスチック培養皿上に未分化状態で培養を継続した。 β -TCPはOSferion®(0.5~1.5mm径顆粒、オリンパステルモバイオマテリアル)、HAPはAPACERAM®(0.3~0.6mm径顆粒、PENTAX)を一定量培養したMSC上に添加した。経時的にMSCのRNAを回収し、骨基質の遺伝子発現を

RT-PCR法にて比較した。In vivo での検討では、ビーグル犬顎骨由来のMSCをβ-TCPとHAPの両者と良く混和して同じ犬の顎骨上へ移植し、2ヶ月後に移植部を取り出し、脱灰後、組織標本を作製して骨形成の状態を観察した。

⑤MSC/骨補填材の確実な移植方法の開発
イヌ上顎に作製した無歯顎堤に対して、自己顎骨から採取・培養した間質細胞を自己血漿から製作した自己フィブリンと混和するか、カプセルに封入して実際に骨増生を行い、さらにはヒト用のインプラントも埋入して、オッセオインテグレーションの獲得状況を確認した。

⑥歯肉からの骨分化可能細胞の分取
ヒトの歯肉から採取した細胞に対して様々な表面抗体を結合させ、これに磁気感受性ビーズを結合させ、磁気による細胞セレクションを行い、分離した細胞についてそれぞれ骨分化能を検討した。

4. 研究成果

(1) 顎骨から骨分化可能細胞を分離する方法の確立

採取した顎骨骨髓液中の有核細胞数/赤血球比(NC/RBC比)は約0.15%で、同じイヌの末梢血が0.12%であり、腸骨骨髓液は2.3%であることと比較すると、末梢血に近く、決してNC/RBC比は高くなかった。また吸引する量が多いと若干NC/RBC比が下がる傾向があったが、有意ではなかった。またイヌの年齢(2歳~12歳)の間で比較しても、高齢化によってNC/RBC比は変化しなかった。本研究では顎骨骨髓液の液性成分(例えば脂肪の割合)は測定していないので、骨髓液中に存在する有核細胞数自体の割合や、有核細胞数の中での幹細胞の割合は不明であるが、実際に高齢化したイヌからも骨分化可能な接着細胞が獲得できたことから、顎骨骨髓液は骨再生医療のための有用なソースであることは確認された。培養方法のクリティカルパラメーターを検討したところ、以下の結果を得た。

①採取から4時間~24時間後に播種するよりも直後に播種することが接着細胞数を増加させた。

②培地に添加する血清の種類ではウシ胎仔血清のほうが自己血清よりも接着細胞数が多く、その濃度も10%のほうが20%よりも接着細胞数が多かった。

③抗凝固剤としてのヘパリンナトリウムは通常で使用する濃度範囲(200U/ml)で最も接着細胞数が多く、ヘパリンナトリウムの濃度が低いと接着細胞数は減少した。

④2%の低酸素状態は大気圧に比較して接着細胞数を低下させた。

⑤アスコルビン酸やPDGFの添加は接着細胞数を増加させた。

⑥有核細胞の播種密度は $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ で最も接着細胞数が多くなった(図3)。

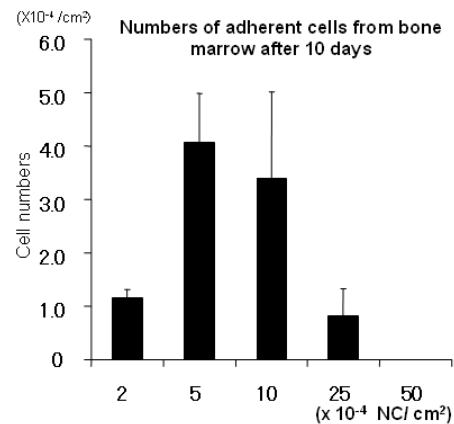


図3 初代播種密度の違いによるイヌ顎骨骨髓由来接着細胞数

(2) 間葉系幹細胞の機能制御

①MSC 特異的遺伝子の解明

ETV1、ETV5、FOXP1、GATA6、HMGA2、SIM2、SOX11がMSCの自己増殖能に関与しており、FOXP1、SOX11、ETV1、SIM2、PRDM16が骨分化、脂肪分化能の維持に関与していることが判明した。さらにGATA6、TRPC4、FLG、TGM2等の抗体を用いた長管骨の免疫染色から、MSC様の細胞は骨内膜近傍と骨髓内部に存在することが判明した(Genes Cells、14、407-424、2009)。

②MSCの骨分化関連転写因子の解明

まず骨、軟骨、脂肪分化状態で特異的に発現が高い遺伝子を特定し、次いで骨特異的遺伝子中で骨分化24時間後に発現が2倍以上に上昇した転写因子の中から2遺伝子を選択した(LBH、ZFHX4)。また全ての遺伝子の中から骨分化24時間後に発現が2倍以上に上昇した転写因子から7遺伝子を選択した(LASS5、DLXIN-1、GILZ、ELL2、ATF7IP、FOXO3A、MAML2)。siRNAによる抑制実験からは、LBH、DLXIN-1、GILZ、ELL2、ATF7IP、MAML2、RUNX2 siRNAはMSCのアリザリンレッド染色性と細胞層中のカルシウム含有量を低下させたが、LASS5 siRNAはこれらを増加させた。また検討した全ての遺伝子のsiRNAはalkaline phosphatase(ALP)活性およびALPの遺伝子発現を抑制した。すなわち本実験で同定された転写因子はMSCの骨分化の早期に発現し、骨分化に関与することが示唆された。

軟骨、脂肪に24時間分化誘導したRNAを条件に加えたマイクロアレイ実験ではBARD1、RAD51、TCEB2、ZHX3、ZBTB7A、KLF5、KLF6、PRRX2、SSBP3の9つの転写調節因子が骨分化特異的に上昇することが判明し、BARD1、RAD51、TCEB2、PRRX2、ZHX3、KLF5、RUNX2に対するsiRNAはMSCのALP活性あるいはALP mRNAレベルを抑制し、アリザリンレッド染色性と細胞層中のカルシウム含有量を低下さ

せたが、SSBP3 に対する siRNA はこれらを増加させた。一方、ZBTB7A と KLF6 に対する siRNA は ALP 活性および ALP mRNA レベルを増加させたが石灰化には影響しなかった。すなわち本実験で同定された転写調節因子は MSC の骨分化の初期に発現して、その後の骨分化に促進的あるいは抑制的に作用することが明らかとなった (論文投稿中)。

③MSC の骨分化促進法の解明

植物レクチンの中で Concanavalin A (ConA) と Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) に MSC の骨分化促進能力があることが分かった。そこで、ヒト MSC の培養系に ConA、PHA-E を添加し、アリザリンレッド染色およびカルシウム定量により骨分化の程度を bone morphogenic protein 2(BMP-2) 添加時と比較検討した。その結果 ConA、PHA-E は BMP-2 と同等に骨分化を促進した。また BMP-2 と同時に添加することにより相加的に骨分化を促進した。次に ConA 添加による骨分化関連遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR により解析した。その結果 ConA は BMP-2 と同等に runt-related transcription factor-2(RUNX2)、osteocalcin(OC) 遺伝子の発現を亢進した。BMP-2 は BMP-2、6 の遺伝子発現を亢進したが、ConA は BMP-2、4 の遺伝子発現を亢進した。そこで ELISA 法を用いて細胞上清中の BMP-2、4 タンパク量を定量した。その結果 ConA は細胞上清中の BMP-2 のタンパク量を増加させた (BMP-4 は検出されず)。しかしその量は最大で 40pg/ml であり、それ自身で骨分化を促進するには低濃度であった (Int J Art Org, 31:708-715, 2008)。次に ConA 添加による遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイ (54675 個のプローブセット (47,000 遺伝子)) を用いて解析した。その結果 ConA はさまざまな遺伝子カテゴリーの中から、細胞間シグナル伝達に關与する遺伝子の発現を最も多く変化させた。これらの結果から ConA、PHA-E は *in vitro* で BMP-2 と同等に MSC の骨分化を促進するが、ConA の骨分化促進効果メカニズムは BMP-2 とは異なることが示唆された (特許第 4388483 号)。

④MSC と移植した際に骨分化を最も促進する骨補填材の解析

In vitro の実験結果から、 β -TCP を添加した MSC は HAP 添加群や非添加群に比べて 3、6 日後にオステオカルシンとオステオポンチンの高い発現を認めた。従って β -TCP は HAP と比較して MSC の骨分化を促進する可能性が示された。*In vivo* の実験結果から、イヌの顎骨上にランダムに移植された 2 種類の Scaffold の周囲に形成された新生骨量を組織レベルで比較すると、 β -TCP 周囲には HAP 周囲に比較して、多くの新生骨が形成されている部分が随所に認められ、*in vivo* でも β -TCP は HAP に比較して MSC による骨形成を

促進する可能性が示された (図 4)。

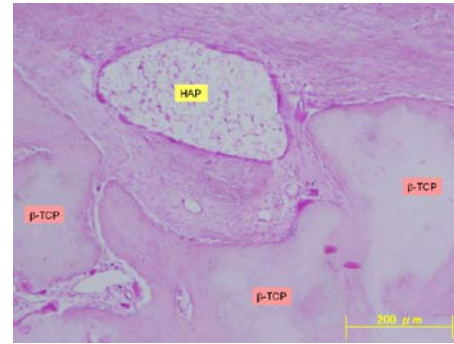


図 4 β -TCP と HAP 周囲の骨形成性の違い

⑤MSC/骨補填材の確実な移植方法の開発
移植体を専用カプセルに充填して移植する方法は、移植時の顆粒の飛散がなく、操作性が極めて良好であった (図 5)。MSC+顆粒側では広範囲での骨増生が認められたのに対して、MSC を含まない側ではごく一層の骨増生が認められるのみであった。増生した骨に埋入したインプラントは確実にオッセオインテグレーションを獲得していた (図 6)。



図 5 カプセルに封入して実際に無歯顎堤に移植する MSC/担体複合体

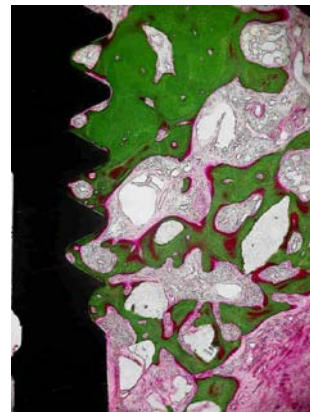


図 6 左のインプラント体 (黒) に結合する再生した新生骨 (緑)

(Interface Oral Health Science 2009, 2010, p119-122)

⑥歯肉からの骨分化可能細胞の分取
様々な表面抗原の中から、抗 CD166 に磁気ビーズを標識した歯肉由来細胞が ALP 活性も高

くなり、その後のアリザリンレッド染色性も高くなったことから、歯肉をソースとした骨分化能を持つ細胞の分離法として有用であることが判明した。
(特願 2009-115378)

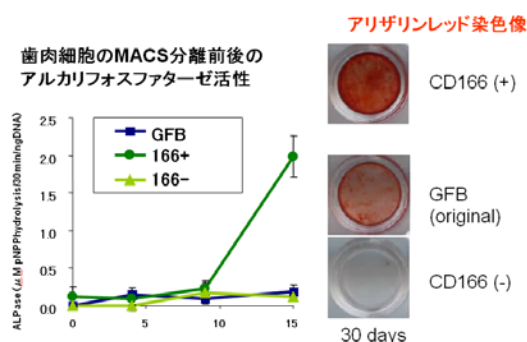


図7 抗CD166で分離した歯肉細胞の経時的なALP活性とその後のアリザリンレッド染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Kubo H, Shimizu M, Taya Y, Kawamoto T, Michida M, Kaneko E, Igarashi A, Nishimura M, Segoshi K, Shimazu Y, Tsuji K, Aoba T, Kato Y: Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry: *Genes Cells*, 14, 407-424, 2009.
- ② Sekiya K, Nishimura M, Suehiro F, Nishimura H, Hamada T, Kato Y: Enhancement of osteogenesis by concanavalin A in human bone marrow mesenchymal stem cell cultures, *Int J Art Org*, 31:708-715, 2008.

〔学会発表〕(計11件)

- ① 西村正宏:顎骨骨髓由来間葉系幹細胞採取法のクリティカルパラメータ、第9回日本再生医療学会、2010.3.19、広島。
- ② 西村正宏:骨増生に向けた顎骨骨髓由来間質細胞の確実な培養法の開発、H22年度日本口腔インプラント学会九州支部学術大会、2010.2.28、福岡。
- ③ Nishimura M: Alveolar ridge augmentation using expanded alveolar bone marrow derived stromal cells: 2nd International Workshop on BioDental Education & Research Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences 2010、2010.2.12、Hiroshima.
- ④ 西村正宏:間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすリン酸カルシウム系Scaffoldの影響、H21年度日本補綴歯科学会九州支部学術大会、2009.10.11、福岡。

- ⑤ Nishimura M: Interface, implant, regenerated bone and recipient alveolar bone: The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science、2009、2009.1.16、Sendai.
- ⑥ Nishimura M: Alveolar ridge augmentation using alveolar bone mesenchymal stem cells, Academy of Prosthetic and Regenerative Sciences、2008.11.28、Nagoya.

〔図書〕(計1件)

- ① Nishimura M, Sakai Y, Suehiro F, Tsuboi M, Kamada K, Hori T, Sakai M, Takeda M, Tsuji K, Hamada T, Springer, Interface, implant, regenerated bone and recipient alveolar bone, in *Interface Oral Health Science 2009、2010*、435page (p119-122).

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:誘導性間葉系幹細胞およびその作製方法

発明者:加藤 幸夫、河本 健、西村 正宏、辻 紘一郎

権利者:国立大学法人広島大学、株式会社ツーセル

種類:特許権

番号:特願2009-115378

出願年月日:2009年5月12日

国内外の別:国内

○取得状況(計1件)

名称:間葉系幹細胞の骨化及び/又は軟骨化促進剤と骨化及び/又は軟骨化促進方法

発明者:加藤幸夫、西村正宏、西村春樹、辻 紘一郎、関谷健祐

権利者:(株)ツーセル、加藤幸夫

種類:特許権

番号:特許第4388483号

取得年月日:2009年10月9日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dh.nagasaki-u.ac.jp/pros2/Nishimura%20Top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西村 正宏 (NISHIMURA MASAHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号:00294570

(2)研究分担者

加藤 幸夫 (KATO YUKIO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10112062

貞森 紳丞 (SADAMORI SHINSUKE)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40187167

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

坂井 裕大 (SAKAI YUUHIRO)

株式会社ジーシー・研究員

末廣 史雄 (SUEHIRO FUMIO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

坪井 将洋 (TSUBOI MASAHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

鎌田 浩一 (KAMADA KOHICHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生