

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03843

研究課題名(和文)インプラント治療とMesenchymal stem cell aging

研究課題名(英文)Dental implant treatment and mesenchymal stem cell aging

研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA, Yasunori)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：50304697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はインプラント周囲骨形成における加齢・疾患MSCや骨動態について検討することを目的とした。まず顎骨壊死ラットを作製、MSCを健全動物と比較したところ、一部のタンパク質や遺伝子発現が後者において劣り、後者で低下していた一部のタンパク質の発現が、健全マウスMSCと共培養することによって回復する傾向が見られた。また、顎骨壊死モデル脛骨に埋入したインプラントの周囲骨では骨壊死が発症しなかったため、口腔環境が骨壊死発症に影響を与えていることが示唆された。

次に骨コラーゲンの架橋構造の相違を検討したところ、顎骨壊死発症マウスから得られたタイプIコラーゲン線維は劣化している傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画では、「加齢関連口腔領域疾患には間葉系細胞(MSC)の老化(stem cell aging: SCA)が影響している」、「SCAを制御することが加齢関連口腔領域疾患の制御につながる」という仮説を検証することを目的として企画した。研究の結果、MSCの疾患による劣化、健全MSCによる劣化MSCの健全化が再確認された。また、顎骨壊死(MRONJ)は脛骨では発症しなかったことから、MRONJ発症における口腔環境の重要性が示唆された。さらに、MRONJはコラーゲンの架橋構造を変化させることが示唆され、MRONJの治療戦略に貢献しうるデータが提供できた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate aging and disease MSCs and bone dynamics in peri-implant bone formation. First, rats with osteonecrosis of the jaw were generated, and MSCs were compared with healthy MSCs. Some protein and gene expression was inferior in the latter, and the expression of some proteins that were decreased in the latter tended to be restored by co-culturing with healthy mouse MSCs. In addition, osteonecrosis did not develop in the surrounding bone of implants placed in a tibia model of osteonecrosis of the jaw, suggesting that the oral environment affects the development of osteonecrosis.

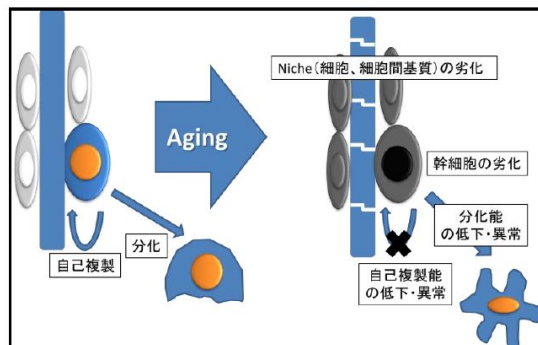
Next, we examined differences in the cross-linking structure of bone collagen, and found that type I collagen fibers from mice with osteonecrosis of the jaw tended to be degraded.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 Stem cell aging 歯科インプラント

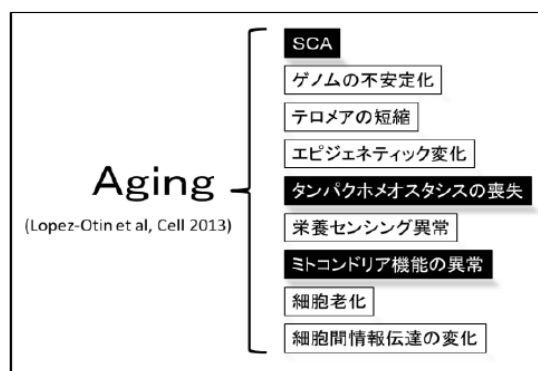
### 1. 研究開始当初の背景

口腔領域を構成する細胞を含むすべての体細胞の寿命は短く、幹細胞をもとに常に新しい分化細胞が供給され、組織・臓器の機能が維持されている。しかし一方で、幹細胞は不死の細胞ではないため、幹細胞群の加齢変化は臓器・組織の維持に著しい問題を引き起こすことは想像に難くない。このような幹細胞の加齢変化を stem cell aging (SCA) という。SCA の概念の中核はもちろん幹細胞の加齢変化であるが、この概念は支持細胞や細胞の足場からなる niche の加齢変化をも含む。つまり、【幹細胞とその周囲の細胞や細胞外基質全体の加齢変化が臓器・組織の機能低下や疾患の発症を来す】という考え方である。



**SCA の概念**  
加齢変化により幹細胞の自己複製能、分化能の低下や異常、niche を構成する細胞や細胞間基質の劣化や機能低下が起こる。

Lopez-Otin らは、Aging はテロメア短縮や SCA 等を含む 9 つの要素を原因として起こるとしているが、その一つにミトコンドリアの機能異常を挙げている。これまでに我々は、MRONJ モデル動物において未分化間葉細胞 (MSC) のミトコンドリアを健全 MSC のものと交換することによって MSC の機能を回復可能であることを述べた (Matsuura et al. Stem Cell Res Ther, 2016)。つまり、SCA の病態の中にもミトコンドリア機能不全が含まれている可能性がある。



また、これまでの研究から、骨組織を構成するコラーゲン線維の架橋構造の変化が指摘されており、これは Aging の 9 つの要素のうち、「タンパクホメオスタシスの喪失」に相当する。さらにコラーゲンの架橋の変化は、SCA の概念のうち niche の加齢変化でもある。このような現象は当然口腔領域でも発生している。

このような現象は当然口腔領域でも発生している。

### 2. 研究の目的

上述のように、口腔領域で一般的に見られる疾患の多くは、SCA の概念と関連すると考えられる。歯周病でさえ、若年者はまれで青年～中年以降に発症することが一般的であることから SCA の概念に当てはまる可能性がある。SCA の概念から口腔領域疾患を俯瞰することは新しい発想であり、学術的独自性や創造性は高いと思われる。また、本研究によって得られる結果は、口腔領域をはじめとする種々の疾患の新たな治療法を提案できる可能性がある。

本研究では、「研究課題の核心をなす学術的「問い」」として、「加齢関連口腔領域疾患には SCA が影響しているのではないかと？ SCA を制御することが加齢関連口腔領域疾患の制御につながるのではないかと？」という仮説を検証することを目的とした。補綴領域は高齢者を対象とすることも多く、加齢制御は補綴治療のアウトカムに大きく影響するばかりでなく、医学全体に普遍的なテーマといえる。特にこれまで当研究グループで十分な実績を有し、実験がモデル化、規格化しやすいインプラントに着目し、インプラント治療と SCA の概念について特に加齢・疾患 MSC や周囲環境 (niche) としての骨について検討することとした。その結果を通して顎顔面領域疾患における SCA の関連の理解につなげることを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 健全 MSC と病態 MSC の比較

病態として、MRONJ モデルラットを作成した。モデルはこれまでに我々のグループが報告した方法を用いた (Matsuura et al. Stem Cell Res Ther, 2016; Sanda et al., J Periodontol 2022)。対照群 (健全動物) および MRONJ モデルそれぞれから MSC を採取・培養した。MSC の採取・培養方法はこれまでに報告した方法を用いた (Matsuura et al. Stem Cell Res Ther, 2016; Kondo et al., PLoS One, 2014)。培地より通常通りタンパク質を抽出し、ELISA 法を用いて各種タンパク質の分泌量を比較した。

(2) 健全・病態 MSC 共培養による病態 MSC の改善および遺伝子発現の変化の検討

健全・病態 (MRONJ) マウスから採取した MSC を 35 mm ディッシュに播種し、共培養を行った。培養後、病態 MSC の改善傾向を確認した。

(3) 各種病態マウスのコラーゲン架橋構造の相違の検討

健全・病態 (MRONJ) マウスから血液を採取し、コラーゲン架橋の老化の指標となるペントシジンを定量した。

(4) 各種病態マウスに埋入したチタン周囲の骨動態の検討

過去に報告した方法 (Ayukawa et al., J Biomed Mater Res, 1998) により、健全あるいは MRONJ モデルラット脛骨近心端から 1.5 mm 遠心にチタンインプラントを埋入した。埋入後 28 日の時点でインプラントを含む骨試料を採取し、非脱灰研磨標本を作製してインプラント周囲骨密度および骨 - インプラント接触率を計算した。

4. 研究成果

(1) 健全 MSC と病態 MSC の比較

これまで報告したように MRONJ を発症した動物モデルの作成ができた。

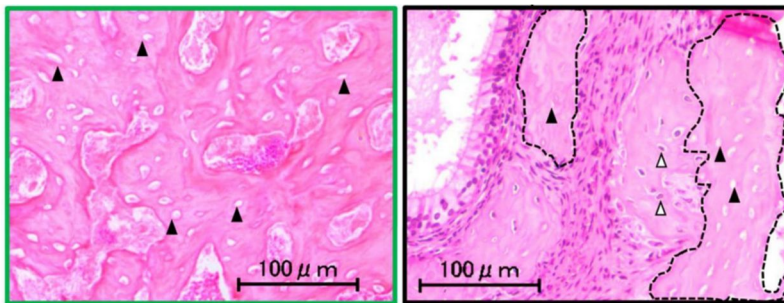
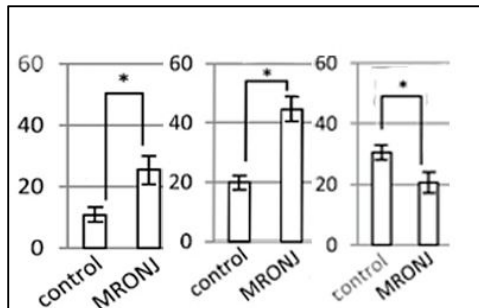


図 MRONJ モデルでは、黒矢印で示す空の骨小腔に特徴付けられる壊死骨が抜歯窩に観察される。

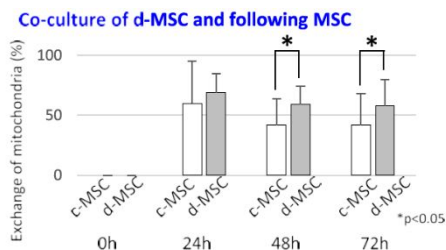
MSC を採集し、健全、MRONJ それぞれのタンパク発現を比較した。



左から IL-2、IL-6、IL-13 の健全群と MRONJ 群の発現量の比較 (単位 pg/mL)。Proinflammatory cytokine である IL-2、IL-6 の発現量は増加し、Antiinflammatory cytokine である IL-13 の発現量は低下した。

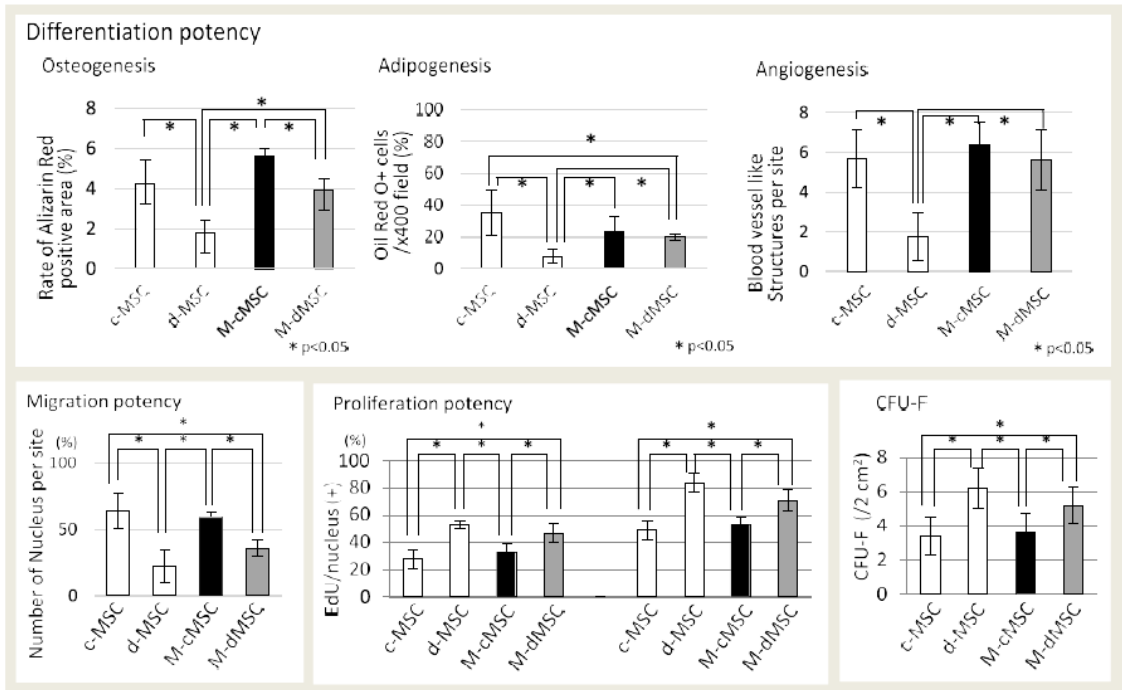
(2) 健全・病態 MSC 共培養による病態 MSC の改善および遺伝子発現の変化の検討

共培養によってミトコンドリアの交換が見られた。



健全 (c-) MSC と MRONJ (d-) MSC の共培養によってミトコンドリアの交換が経時的に増加した。

また、共培養によって病態 MSC の各種の改善が観察された。



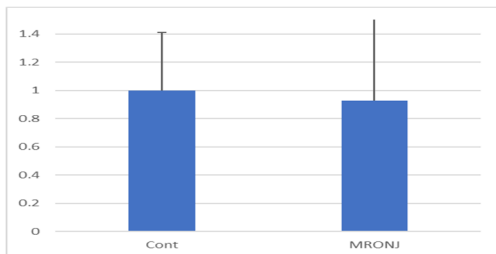
上列左から骨芽細胞分化、脂肪細胞分化、血管新生

下列左から移動能、増殖能、コロニー形成能

疾患(d-)MSC では骨芽細胞分化、脂肪細胞分化、血管新生、移動能が低下しているが、健全 MSC と共培養することによって改善している(黒コラム)。増殖能、コロニー形成能は疾患 MSC の方が健全 MSC より高いが、健全 MSC との共培養によって健全 MSC と同程度に低下している。

### (3) 各種病態マウスのコラーゲン架橋構造の相違の検討

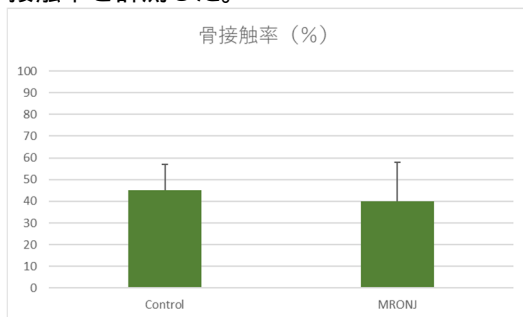
健全および MRONJ モデル血液からペントシジン値を計測した。



健全(左) MRONJ(右) マウス血液のペントシジン値には有意差が見られなかった。

### (4) 各種病態マウスに埋入したチタン周囲の骨動態の検討

健全および MRONJ モデルラット脛骨にチタンインプラントを埋入し、4 週後の骨 - インプラント接触率を計測した。



健全(左) MRONJ(右) ラットに埋入されたチタンインプラントの骨接触率には有意差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	熱田 生  (ATSUTA Ikiru)  (30423487)	九州大学・歯学研究院・准教授   (17102)	
研究分担者	古谷野 潔  (KOYANO Kiyoshi)  (50195872)	九州大学・歯学研究院・特別教員   (17102)	

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