

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10212

研究課題名(和文)顎骨骨髓間質細胞を用いた顎骨再生医療のための骨形成能診断法の開発

研究課題名(英文) Development of bone formation diagnostic method for jawbone regenerative medicine using maxillary/mandibular bone marrow stromal cells

研究代表者

末廣 史雄(SUEHIRO, FUMIO)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：40524781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では顎骨骨髓間質細胞の骨形成能を診断するマーカーの探索を行った。その過程で、顎骨骨髓間質細胞では、in vitroでの骨分化能を評価するアルカリフォスファターゼ活性定量やアリザリンレッド染色の結果がin vivo骨形成能と必ずしも一致しないことが明らかになった。さらに、培養上清中に分泌されるタンパク質CHI3L1はin vivo骨形成能が高いMBMSCでは分泌量が少なく、in vivo骨形成能が低いMBMSCでは分泌量が多いことが明らかとなった。この結果からCHI3L1は顎骨骨髓間質細胞のin vivo骨形成のネガティブマーカーとして利用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療に関する研究は数多く行われており、近年飛躍的な発展を遂げている。2014年に施行された再生医療に関連する法案のもと、再生医療等製品の承認も進んでいるが、いまだ骨再生を目的とした製品は承認されていない。我々の研究目的は顎骨骨髓間質細胞の骨形成能診断法を開発するだが、本研究の過程で得られる多くの知見は低侵襲で効果的な顎骨再生医療の普及に大きく貢献できると考えられる。さらには、本研究を進展させることで医科領域の骨関連病変や外傷の治療法開発への波及効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for a marker for diagnosing the bone formation ability of maxillary/mandibular bone marrow stromal cells (MBMSC). In the process, we found that the results of alkaline phosphatase (ALP) activity quantification and alizarin red staining which evaluate bone differentiation ability in vitro, do not always match the in vivo bone formation ability in the MBMSC. Furthermore, we found that the protein Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1) secreted in the culture supernatant is secreted in small amount in MBMSCs with high in vivo bone formation ability and high amount in MBMSCs with low in vivo bone formation ability. This result suggests that CHI3L1 can be used as an in vivo bone formation negative marker for MBMSCs.

研究分野：補綴・理工系歯学

キーワード：骨髓間質細胞 顎骨骨髓 骨再生 CHI3L1

1. 研究開始当初の背景

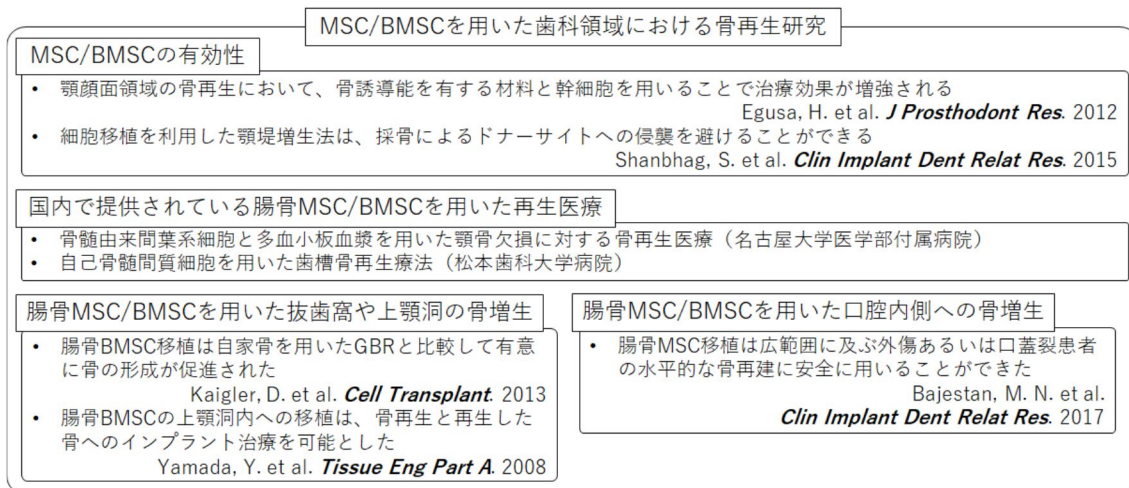
歯科臨床において、高度に吸収した顎堤にインプラントを埋入せざるをえないケースは多い。近年はショートインプラントの発売や、様々な骨補填材や遮断膜等の材料が開発されており、インプラント埋入ができないというケースは減っているが、下顎管や上顎洞底との距離が近く埋入が困難なケースや、埋入はできても歯冠が非常に長くなるケースがある。また広範囲にわたる骨造成にはやはり自家骨移植が必要であり、採取量に制限がある、知覚麻痺などの後遺症の可能性がある等の欠点があるため、患者に敬遠されがちである。これらの高度に吸収した顎堤を、低侵襲で垂直的・水平的に口腔内側に再生できれば、より予知性の高い補綴治療を行うことが可能になると考えられる。

間葉系幹細胞(**Mesenchymal Stem Cells: MSC**) / 骨髄由来間質細胞(**Bone Marrow Stromal Cells: BMSC**)を用いた歯科領域における骨再生医療の有効性についての報告は数多くあり、国内でも「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に基づいた顎骨再生医療の提供が始まっている。申請者らは顎骨骨髄由来間質細胞(**Maxillary/Mandibular bone marrow stromal cell: MBMSC**)が骨再生の有効な細胞ソースとなり得ることを世界で最初に報告して以来(**Matsubara, T. et al. J Bone Miner Res. 2005**)顎骨骨髄に着目しているが、顎骨骨髄は腸骨骨髄と比較して採取可能な量が少なく、セルソーターによる細胞の分取は不可能である。そのため、**MBMSC**を用いた顎骨再生医療を実現するためには、骨形成能をもつ細胞を確実に判別する新規骨形成能診断法の開発が必要となる。

2. 研究の目的

MSC / BMSCを用いた骨再生研究は数多く報告され、歯科においても既に臨床応用が始まっており、その効果は大きな期待を集めている。近年では歯科領域から採取可能な幹細胞についての報告もあり、顎骨骨髄由来間質細胞 **MBMSC** は顎骨再生の有用な細胞ソースの一つである。しかし、**MBMSC** はヘテロな細胞集団であるため、その性質には個体差があり、**MBMSC**を用いた顎骨再生医療を成立させるためには、骨形成能を持つ細胞を確実に診断する必要がある。そこで本研究では、**MBMSC** の骨形成能マーカーを見出すことで新規骨形成能診断法を開発し、確実な顎骨再生医療に繋げることを目的とする。

以下の「**MSC/BMSC**を用いた歯科領域における骨再生研究」の表に示すように、**MBMSC**を用いた口腔内側への垂直的な骨造成の報告は未だ無い。申請者らは骨形成能を持つ **MBMSC** の性質を明らかにし、移植細胞の骨形成能診断法を開発することで世界初の **MBMSC**を用いた顎骨再生医療の成立を目指す。



いずれも腸骨MSC/BMSCを用いた報告であり
MBMSCを用いた口腔内側への垂直的な骨増生の報告は未だ無い

3. 研究の方法

(1) MBMSC の採取・培養および MBMSC の *in vitro* における骨分化能、*in vivo* における骨形成能の評価

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、顎骨骨髓は腸骨骨髓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髓液を、申請者が既に開発したバイオプシーニードル（一般医療機器：09B2X00010G00056）



を用いて極めて低侵襲に行った（図1）（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）。採取した骨髓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・培養した。

採取した MBMSC は *in vitro* で細胞増殖能、細胞表面抗原解析、ALP 活性定量やアリザリンレッド染色による骨分化能の確認を行った。*In vivo* では MBMSC と骨補填

図 1

材を組み合わせた移植体を作製し、免疫抑制マウスの頭頂部および背部皮下に移植した。異種移植であるため、移植した細胞の確認はヒト特異的 vimentin を用いて行った。移植 8 週後に移植部位を含む組織を回収し、HE 染色および免疫染色で移植細胞株の骨形成能を評価した。

(2) 高骨形成細胞マーカーの選定

前項で示した *in vitro* と *in vivo* の結果から、骨形成能の高い細胞と低い細胞に分けて培養上清中に分泌されるタンパク質を、マーカー候補として以下の実験に用いた。市販されている抗体アレイを用いて MBMSC が分泌するサイトカインを網羅的に解析した。ELISA 法を用いて抗体アレイの結果から選定されたタンパク質の定量を行い、高骨形成細胞のマーカーとなりうる物質を選定した。

(3) 高骨形成細胞マーカーの細胞機能への影響の検討

選定した物質の *in vitro* における作用を明らかにするため、選定物質を培地に添加して細胞増殖能や遊走能、骨分化能等への影響の検討を行った。

4. 研究成果

(1) MBMSC の *in vitro* 骨分化能と *in vivo* 骨形成能

患者から採取した 7 株の MBMSC を用いて *in vitro* 骨分化能（アリザリンレッド染色）と *in vivo* 骨形成能（骨形成面積）を評価した（図 2）。

MBMSC 1, 2, 6 は *in vitro* での骨分化能は高いが *in vivo* での骨形成能が低く、一方で MBMSC 5, 7 は *in vitro* での骨分化能は低いが *in vivo* での骨形成能が高かった。つまり、MBMSC において *in vitro* と *in vivo* の結果が必ずしも一致しないことが示された。

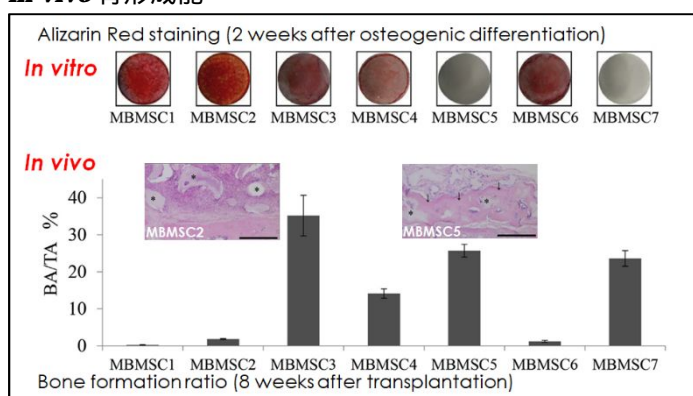


図 2

この結果から、従来は骨分化の指標とされていた ALP 活性定量や細胞層中のカルシウムの染色が *in vivo* 骨形成能の指標とはならない可能性が示唆された。

(2) 抗体アレイを用いた候補タンパク質の網羅的解析

(1)の結果から MBMSC の *in vivo* 骨形成能判定マーカーが必要であることが示された。培養上清中に分泌されるタンパク質がマーカーとして利用できると仮説を立て、市販されている抗体アレイ（Human Angiogenesis Array Kit、Human Chemokine Array Kit、Human XL Cytokine Array Kit：R&D systems）を用いて網羅的解析を行った（図 3）。抗体アレイの結果 CHI3L1、GRO、MCP-1、MCP-3、IL-8 の 5 個のタンパク質では、骨形成能が高い MBMSC において培養上清中への分泌量が少なく、逆に骨形成能の低い MBMSC において培養上清中への分泌量が多い傾向が示された。

当初の目的としては骨形成能が高い MBMSC において分泌量が多く、骨形成能が低い MBMSC において分泌量の少ないタンパク質が選定されることを期待していたが、本研究

の範囲ではそのようなタンパク質は選定されなかった。

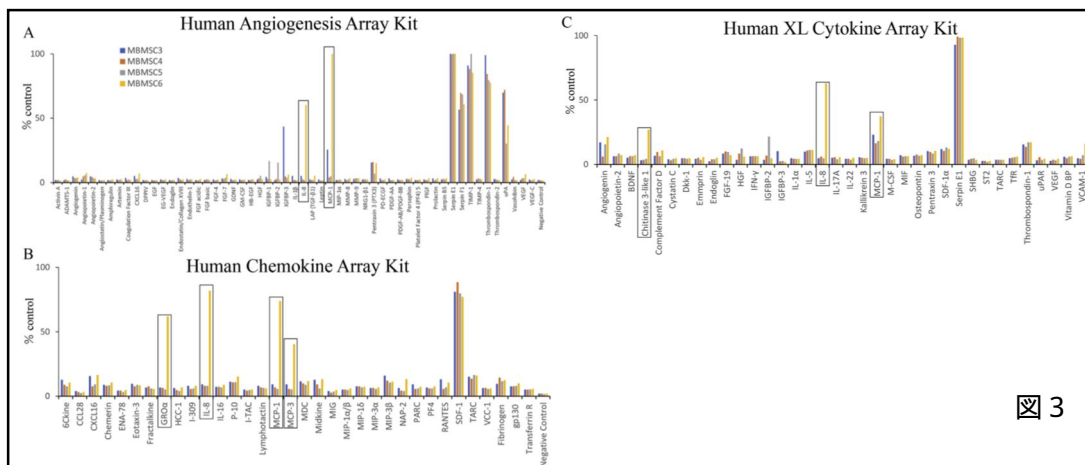


図 3

(3) 選定したタンパク質の定量

選定した 5 種類のタンパク質について **ELISA** 法を用いて定量を行った (図 4)。その結果、**CHI3L1 (Chitinase-3-like protein 1)** のみが抗体アレイの結果と類似した結果を示した。一方で **GRO**、**MCP-1**、**MCP-3**、**IL-8** においては抗体アレイの結果とは一致しない結果を示した。

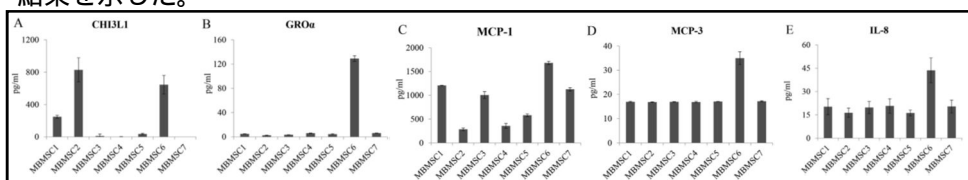


図 4

(4) **CHI3L1** の MBMSC への影響

CHI3L1 の MBMSC への影響を検討するために、MBMSC の培地に各種濃度の **CHI3L1** を添加し、細胞増殖および骨分化能試験を行った (図 5)。

CHI3L1 は培地に添加しても細胞増殖能、ALP 活性定量、アリザリンレッド染色に影響を及ぼさなかった。つまり **CHI3L1** は MBMSC に直接的に作用していないことが示された。

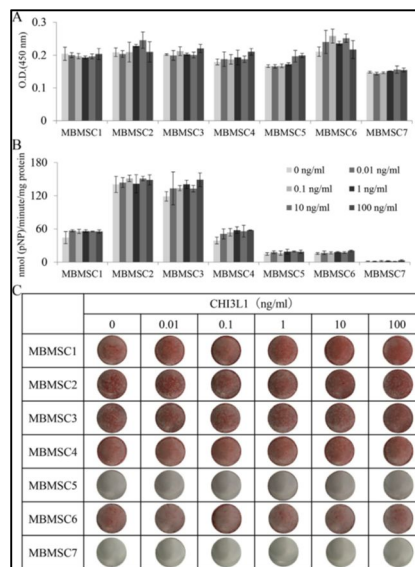


図 5

(5) **CHI3L1** の血管内皮細胞、線維芽細胞への影響

(4)の結果から、MBMSC は **CHI3L1** を分泌することで周囲の血管内皮細胞や線維芽細胞に影響を及ぼして骨形成を阻害しているのではないかと仮説を立てた。血管内皮細胞および線維芽細胞の培地に **CHI3L1** を添加し、各細胞への影響を検討した (図 6)。その結果、**CHI3L1** は血管内皮細胞の遊走能を促進し、線維芽細胞の増殖能と遊走能を促進した。

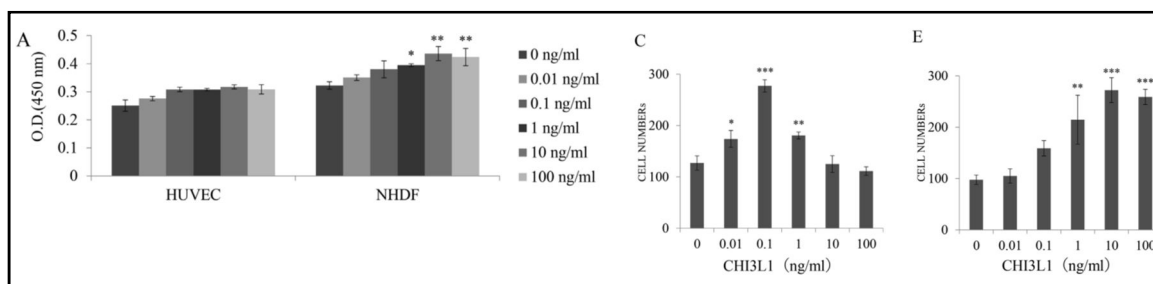


図 6

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komabashiri Naohiro, Suehiro Fumio, Ishii Masakazu, Nishimura Masahiro	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 SUEHIRO Fumio, KOMABASHIRI Naohiro, MASUZAKI Tomohiro, ISHII Masakazu, YANAGISAWA Takahiro, NISHIMURA Masahiro	4. 巻 41
2. 論文標題 Efficacy of bone grafting materials in preserving the alveolar ridge in a canine model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 302 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2021-173	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 3) 駒走尚大, 益崎与泰, 田中謙光, 末廣史雄, 迫田賢二, 嶺崎良人, 石畑 清秀, 西村正宏	4. 巻 1
2. 論文標題 鹿児島大学病院口腔インプラント専門外来におけるインプラント治療の臨床的検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 南九州歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-6
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 YAMADA Mao, TAKASE Kazuma, SUEHIRO Fumio, NISHIMURA Masahiro, MURATA Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Effects of denture adhesives and mouth moisturizers to human oral fibroblast and human keratinocyte cells using direct and indirect cell culture systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 571 ~ 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2017-332	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2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 駒走 尚大, 末廣 史雄, 益崎 与泰, 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 日本口腔インプラント学会 50 回記念学術大会
4. 発表年 2020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 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 Masuzaki T, Shimizu T, Komabashiri N, Suehiro F, Kawamoto S, Nishimura M
2. 発表標題 The sodium glucose transporter 2 inhibitor effects bone formation around implants in diabetes rats
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 末廣 史雄
2. 発表標題 顎骨増生治療に向けた移植体の骨増生能担保の取り組み
3. 学会等名 令和3年度日本補綴歯科学会九州支部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田 春香, 末廣 史雄, 駒走 尚大, 西村 正宏
2. 発表標題 顎骨と腸骨由来間葉系幹細胞の分化能の比較
3. 学会等名 令和3年度日本補綴歯科学会九州支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 菜緒, 末廣 史雄, 駒走 尚大, 西村 正宏
2. 発表標題 顎骨間葉系幹細胞における骨分化能とエネルギー代謝との関連
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021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 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 日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021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	西村 正宏 (Nishimura Masahiro) (00294570)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	
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)	

	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
研究協力者	駒走 尚大 (Komabashiri Naohiro)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (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
---------	---------