

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19133

研究課題名（和文）間葉系幹細胞を用いた薬剤関連顎骨壊死の新規治療および予防法の開発

研究課題名（英文）Therapeutic interactions between mesenchymal stem cells for healing and preventing medication-related osteonecrosis of the jaw.

研究代表者

鬼村 由梨（松浦）（Yuri, Matsuura）

九州大学・歯学研究院・特別研究員

研究者番号：80778837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）は優れた増殖能、分化能、細胞制御能を有しており、組織、臓器における再生治療や様々な疾患に対する細胞治療のデバイスとして大きな可能性を有している。薬剤関連顎骨壊死（medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ）モデルを用いた過去の実験では、MSCの経静脈投与により抜歯後の治癒不全や多臓器に認める炎症の改善が報告されている。本研究では、上記のようにMSCが病態を改善させる治療メカニズムについてMRONJ様モデルを用いて解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）は優れた増殖能、分化能、細胞制御能を有しており、組織、臓器における再生治療や様々な疾患に対する細胞治療のデバイスとして大きな可能性を有している。本解析を通して、MRONJに対するMSCの治療効果はMSCを採取された個体の全身状態に影響を受けること、さらにMSC同士の直接的な相互作用が影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells (MSCs) have been isolated from a variety of tissues including bone marrow, adipose, and mucosa. MSCs have the capacities for self-renewal and differentiation. Some reports have been published on systemic administration of MSCs leading to functional improvements by engraftment and differentiation, thus providing a new strategy to regenerate damaged tissues. Recently, it has become clear that MSCs possess immunomodulatory properties and can treat diseases. However, it is difficult to demonstrate extensive engraftment of cells and there are no convincing clinical results. Here, we investigated the effect of aspirin for MSC treatment by using medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ)-like mice model. These data suggest that donor MSCs recognize the state of host MSCs, and the aspirin treatment may contribute to the therapeutic effects of MSCs.

研究分野：インプラント・義歯補綴学分野

キーワード：間葉系幹細胞 薬剤関連顎骨壊死 ミトコンドリア 細胞治療

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は組織再生を目指し急速に研究が進められている。近年では様々な疾患(Yamaza 2010; Atsuta 2013)の治療などにも応用され、薬物治療のような副作用のない治療法として注目されている。しかし我々の一連の幹細胞研究では、治療結果にかなりのバラツキが出ることに気付いた。それどころか現在の治療法では、一部の症例で効果が無いどころか症状を悪化させることがある。これは採取される個体の状態(疾患の有無、年齢など)に影響を受けていると考えられるが、そのメカニズムの詳細は分かっていない。つまり研究課題の問いとして「誰から採取した間葉系幹細胞に対しても同等の能力を確保し、治療の予知性を持たせるにはどうすればよいか?」となる。こういった幹細胞治療の不安定さに着目し、改善しようとする事自体が幹細胞研究の最前線でこそ生まれた発想であり、今まで誰も試みておらず、興味深い結果を得られると確信している。次のポイントとしてアスピリンの投与にある。アスピリンは一般的に抗炎症薬として知られているが、低容量の服用で心疾患の予防効果や骨粗鬆症治療薬としての働きも報告されている(Carbone 2003)。一方で MSC に対する骨形成能(Liu 2012)、免疫調整能(Yamaza 2008)、抗癌作用(Atsuta 2013)を高めることも知られている。このことから生体内にあって、「異常化」した MSC ではなく「正常」な MSC に作用していると予想し、本研究では幹細胞にアスピリンを作用させ活性化することで幹細胞の正常性を際立たせることを目的に使用している。もちろん結果として「異常化」幹細胞を「正常化」へと効率良くシフトさせたいが、「異常化」幹細胞も同時に強化される可能性も否定できない。培養時の微小環境(ニッチ)を工夫するなどのクリアすべき問題はありそうだが、大変に独創的であり、結果によっては大変に有意義な結果が得られるものと期待する。

## 2. 研究の目的

幹細胞を活性化することで、「治療効果のバラツキを最小限に留め(大小の差はあるものの)確実な結果を得る」「治療のため投与する細胞数を最小限に留め患者の侵襲を抑える」ための研究である。本研究における第一のポイントは、有病者では異常な MSC が存在することを前提としていること。そのため「異常化」および「正常化」幹細胞の定義付け;「異常化」幹細胞として歯周病患者、「正常化」幹細胞として歯周治療終了患者を選択しその歯肉から採取する。→幹細胞を宿主の微小環境によって大きく影響を受けるため、歯周病の有無で局所から採取した幹細胞に違いが生じるはずである。

## 3. 研究の方法

本研究は、幹細胞治療で見られる効果のバラツキ(治療効果の大小だけでなく病状の悪化も含む)を投与する幹細胞に対するアスピリンによる前処理で最小限に留めることを目的とし実施した。

①「異常化/正常化」幹細胞の選択採取、②アスピリン投与による細胞レベルの効果、③病態モデルラットに対する全身投与治療効果の評価、加えて④投与細胞数をコントロールし効果の違い、⑤結果として生じる肺組織への副作用などを比較した。これによりアスピリン処理された

幹細胞の有効性を評価した。

#### 4. 研究成果

「異常化」した間葉系幹細胞の存在を確認

・ヒト口腔粘膜由来の間葉系幹細胞の採取

1. 歯周外科時に歯周病罹患患者（「異常化」幹細胞が存在）から、またはインプラント治療時に歯周病治癒患者（「正常化」幹細胞が存在）からヒト口腔粘膜上皮を採取
2. 「異常化」幹細胞の存在を間葉系幹細胞（以下MSC）により証明するため、通例通り培養環境条件をコントロールすることでのみで幹細胞を培養

・「異常化」または「正常化」幹細胞の証明

MSCの「異常化」を証明するため3つのStemnessを評価した。

）分化能（脂肪、骨、血管内皮分化能）

）マーカー（CD44,90,105陽性/CD11b,45陰性細胞）

）自己複製能（CFU assay）

→ 上記条件から採取したMSCに対し上記評価

→ Stemnessの低下で「異常化」を示唆

異常化MSCにより治療効果が低下することを確認

・異常化MSCを炎症モデルマウスに全身的投与し効果を評価

炎症モデルラットの作製

→ Dexamethasone炎症モデル

（5週齢B6マウスにDexamethasoneを腹腔内投与（2回/週 3週間））

\*抜歯窩治癒不全(約70%)(Miura 2010)

アスピリン処理された「異常性」のMSCが十分な治療効果を有する

：モデルラットを用いた in vivo 実験

○幹細胞に対するアスピリン処理効果

・幹細胞の採取

歯周外科時に歯周病罹患患者（「異常化」幹細胞が存在）

インプラント治療時に歯周病治癒患者（「正常化」幹細胞が存在）

→ ヒト口腔粘膜上皮から間葉系幹細胞を選択的に採取

→ 幹細胞培養液中に2Mアスピリン(Sigma)を1day投与

(Domhan 2004; Shi 2008を参考に濃度決定)

・アスピリン効果の評価方法

培養実験：MSC分化能の比較

動物実験：炎症モデルの治癒能力比較

時期：MSC投与後3週間（抜歯4週後）

・抜歯窩周囲上皮の活性（免疫染色：Laminin-332）

・免疫活性（FACs、Western Blot） → 炎症状態減少を確認

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------