

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21066

研究課題名（和文）軟骨誘導を施した間葉系幹細胞集塊を利用した新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel periodontal tissue regeneration therapy using mesenchymal stem cell clumps generated with chondro-inductive medium

研究代表者

堀越 励（Horikoshi, Susumu）

広島大学・病院（歯）・助教

研究者番号：90911587

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、歯周病によって失われた骨を再生させるための新しい治療法の開発を最終目標としており、細胞と細胞自身が産生したコラーゲン等によって構成された細胞集塊C-MSCsを骨欠損部へ移植することで骨再生効果を得られると期待した。実際に、軟骨誘導を施したC-MSCsを重篤な骨欠損モデルに移植することで、移植した細胞自身の骨化と、周囲の細胞の活性化によって十分な骨再生能を持つことが明らかになった。また本研究では、生体組織接着剤を使用することで、立体的な骨欠損形態にもC-MSCs移植が可能となる移植法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、軟骨誘導を施した間葉系幹細胞が軟骨内骨化を介して大規模骨欠損の再生に有効であることが明らかとなった。軟骨細胞は低栄養・低酸素環境下でも細胞活性を持つという特徴を持つため、現在の治療では再生困難な血管栄養の乏しいと考えられる重篤な骨欠損においても再生効果を期待できる。またこの成果は、本来目標としている歯周組織の再生だけでなく、医科領域で見られる外傷や炎症による骨欠損に対しても有効な再生治療法の開発の一助になると考える。

さらに、本研究で用いた細胞移植法には異種動物由来成分が含まれないため、臨床応用する上でリスクの少ない治療法を提供できるといえる。

研究成果の概要（英文）：The ultimate goal of this study is to develop a new treatment to regenerate bone lost due to periodontal disease. To achieve this goal, we devised clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complexes(C-MSCs) and conducted transplantation experiments.

The results showed that transplantation of chondro-inductive C-MSCs into a severe bone defect model had sufficient bone regenerative potential via ossification of the donor cells and activation of the surrounding host cells. In this research, we also established a grafting method that allows C-MSCs grafting to three-dimensional bone defect by using a biological tissue adhesive.

研究分野：歯周組織再生

キーワード：間葉系幹細胞 軟骨細胞 軟骨内骨化 骨再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、歯肉への歯周病原細菌の感染と宿主の免疫応答の結果生じる、骨破壊性の炎症性疾患である。歯周炎の進行によって喪失した骨は、一部の限定された症例を除いて現在の歯科医療では再生困難である。そのため、大規模な歯槽骨欠損にも適応可能な新規再生療法の開発が必要であると考えた。

本研究の代表者が所属する研究室では、間葉系幹細胞と細胞自身が産生した細胞外基質によって構成された細胞集塊 C-MSCs を考案し、細胞治療の開発を行ってきた。そして、骨分化誘導を施した C-MSCs が骨再生に有効であることを報告した(文献1参照)。しかしながら、骨誘導 C-MSCs は大規模な骨欠損の再生には十分な再生能を発揮しなかった。

その後、軟骨誘導を施した C-MSCs も骨再生効果を示すことを明らかにし(文献2参照、当時未発表)、また軟骨細胞が持つ性質から軟骨誘導 C-MSCs が重篤な骨欠損にも再生能を持つことが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、軟骨誘導を施した C-MSCs が大規模な骨欠損に対しても十分な骨再生効果を持つことを示し、また様々な骨欠損形態における安定した移植法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)軟骨誘導を施した C-MSCs の作製

ヒト由来 MSCs を 1.0×10^5 cells/well で低接着性の 48-well プレートに播種し、Xeno-free の軟骨誘導培地で 10 日間浮遊培養することで軟骨誘導 C-MSCs を作製した。比較対象として Xeno-free の増殖培地で培養した C-MSCs を作製した。また、C-MSCs 内の細胞が適切に軟骨分化していることを確かめるために、組織学的解析および軟骨分化マーカーを使用した real-time PCR を行った。

(2)骨欠損モデルへの移植実験

大規模骨欠損モデルとして、3-4 週齢の SCID マウスの頭蓋冠に正中頭蓋縫合を避けるように直径 4mm の骨欠損を作製し、移植実験を行った。骨欠損部に 6 粒の C-MSCs を移植し、生体組織接着剤を用いて固定した。また、移植の 4 週および 8 週後に組織を回収して解析を行った。

(3)移植後の解析

回収した組織を micro CT で撮影し、移植後の石灰化および骨再生の程度を評価した。またその後脱灰し、HE 染色・Safranin O 染色・ヒト Vimentin の蛍光免疫染色にて組織学的解析を行った。

(4)立体的な骨欠損モデルへの移植実験

ヌードラットの下顎骨に様々な形態の骨欠損モデルを作製し、SCID マウスで用いた移植方法が立体的な骨欠損形態にも適応可能であるか検討した。

4. 研究成果

(1) 大規模骨欠損に対する軟骨誘導 C-MSCs の再生効果

移植 4 週目の観察において軟骨誘導 C-MSCs では骨欠損部に硬組織形成が認められ、また組織学的解析によって移植した C-MSCs 内部への石灰化物の沈着が観察された(図.B)。この結果は、小規模欠損への移植実験と類似した所見(文献2)であり、大規模骨欠損においても移植した軟骨誘導 C-MSCs の内部で軟骨内骨化が生じることで骨再生が誘導されていることが示唆された。

一方移植 8 週後では、C-MSCs 内部での石灰化が促進するとともに、周囲骨からの旺盛な骨添加が観察された(図.C)。周囲骨からの骨再生が、分化誘導を施していない C-MSCs 移植では確認

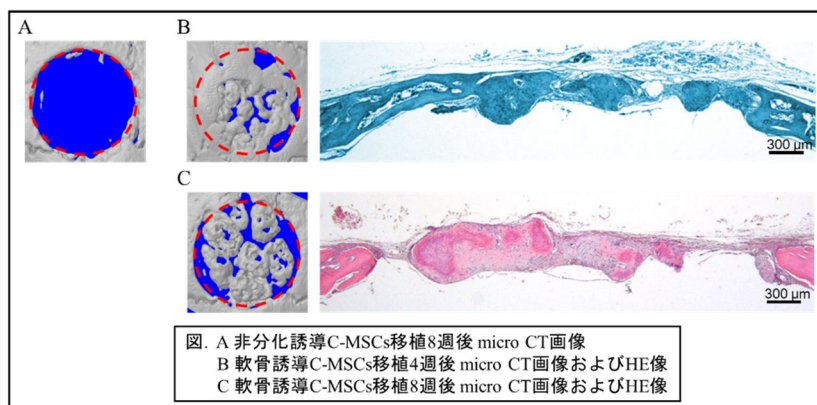


図. A 非分化誘導C-MSCs移植8週後 micro CT画像
B 軟骨誘導C-MSCs移植4週後 micro CT画像およびHE像
C 軟骨誘導C-MSCs移植8週後 micro CT画像およびHE像

されなかったことから、移植した軟骨誘導 C-MSCs が自身の骨化だけでなく宿主の細胞を活性化する働きも持つ可能性が示された。骨分化誘導 C-MSCs がパラクライン因子によって骨再生を誘導しているという報告(文献 1)があることから、軟骨誘導 C-MSCs も何らかの因子を放出することで周囲からの骨添加を誘導したと考えられる。

以上の結果より**軟骨誘導 C-MSCs は、移植後初期では自身の軟骨内骨化によって、また移植後後期では周囲骨の再生促進によって、大規模骨欠損を再生する能力を十分に発揮できる**ことが明らかとなった。

(2)立体的な骨欠損モデルへの C-MSCs 移植

本研究では、フィブリノゲンとトロンピンを混合することで接着性を示すフィブリン糊を使用して移植後の C-MSCs を固定を試みた。その結果、ラットを用いた移植実験によって、生体組織接着材を使用することで C-MSCs を立体的な骨欠損部にも移植可能であることが示された。しかし、本実験では歯周炎で見られる水平性骨欠損のような平坦な骨形態への移植が考慮されていないため、今後も移植法の検討が必要である。

また本研究では、Xeno-free 培地とヒト由来 MSCs のみによって細胞塊を作製しているため、C-MSCs を用いた移植法には異種動物由来成分混入のリスクがないといえる。そのため、本研究で使用した細胞移植法は将来の臨床応用にも適応可能であると期待できる。

以上が本研究の成果である。本研究の成果は、現在の歯科医療では再生困難な重篤な骨欠損部にも適応可能な新規歯周組織再生療法の開発の一助になると期待できる。また、歯科領域のみならず、医科領域においても外傷や炎症性疾患によって骨再生が困難となる症例が多く存在しているため、医科分野の再生療法の発展にもつながると考える。

また本研究では様々な細胞株を用いて軟骨誘導 C-MSCs の骨再生能を検討しており、細胞株によって軟骨分化の程度および骨再生効果に明らかな差が認められた。加えて、細胞株によって骨再生に適切な培養日数にも差異があることも明らかとなった。そのため、今後は臨床応用を考慮して、高い精度で再生効果を得るために移植前の細胞選別法を検討および確立する必要があると考える。

さらに、本研究では骨組織の再生のみを観察しており、歯周組織に対する再生効果の検討が不十分である。そのため、今後はビーグル犬の歯槽骨欠損モデルを用いた移植実験を行い、重篤な歯周組織欠損に対する軟骨誘導 C-MSCs の再生効果を検討し、また再生機序も明らかにする予定である。

引用文献

1. Motoike S, Kajiya M, Komatsu N, **Horikoshi S**, Ogawa T, Sone H, Matsuda S, Ouhara K, Iwata T, Mizuno N, Fujita T, Ikeya M, Kurihara H. Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Conditions Facilitate Bone Regeneration via Direct and Indirect Osteogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 15;20(16):3970.
2. **Horikoshi S**, Kajiya M, Motoike S, Yoshino M, Morimoto S, Yoshii H, Ogawa T, Sone H, Iwata T, Ouhara K, Matsuda S, Mizuno N, Kurihara H. Clumps of Mesenchymal Stem Cells/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Chondro-Inductive Medium Induce Bone Regeneration via Endochondral Ossification. *Biomedicines*. 2021 Oct 7;9(10):1408.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Horikoshi Susumu, Kajiya Mikihiro, Motoike Souta, Yoshino Mai, Morimoto Shin, Yoshii Hiroki, Ogawa Tomoya, Sone Hisakatsu, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Mizuno Noriyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 9
2. 論文標題 Clumps of Mesenchymal Stem Cells/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Chondro-Inductive Medium Induce Bone Regeneration via Endochondral Ossification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1408 ~ 1408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9101408	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 Sone Hisakatsu, Kajiya Mikihiro, Takeda Katsuhiko, Sasaki Shinya, Horikoshi Susumu, Motoike Souta, Morimoto Shin, Yoshii Hiroki, Yoshino Mai, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Mizuno Noriyoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complexes directly reconstruct the functional periodontal tissue in a rat periodontal defect model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 945 ~ 955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.3343	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 Ogawa Tomoya, Kajiya Mikihiro, Horikoshi Susumu, Yoshii Hiroki, Yoshino Mai, Motoike Souta, Morimoto Shin, Sone Hisakatsu, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Mizuno Noriyoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Xenotransplantation of cryopreserved human clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complexes pretreated with IFN- induces rat calvarial bone regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 117 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.04.003	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川智也、加治屋幹人、堀越励、曾根久勝、吉井寛毅、森本慎、吉野舞、佐々木慎也、松田真司、岩田倫幸、應原一久、水野智仁
2. 発表標題 INF- 前処理された間葉系幹細胞集塊Clumps of MSCs/ECM complexesは凍結保存後も免疫制御能・骨再生能を維持する
3. 学会等名 第60回広島県歯科医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曾根久勝、加治屋幹人、佐々木慎也、堀越励、小川智也、吉井寛毅、森本慎、吉野舞、松田真司、岩田倫幸、應原一久、水野智仁
2. 発表標題 間葉系幹細胞集塊Clumps of MSCs/ECM complexesによる歯周組織再生のメカニズム解析
3. 学会等名 第60回広島県歯科医学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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