

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390367

研究課題名（和文）顎骨由来幹細胞を用いた歯槽骨再生医療の展開

研究課題名（英文）Alveolar bone engineering using alveolar bone marrow derived mesenchymal stem 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）：

新たな侵襲を加えることなく採取された 30 名の患者自己の顎骨骨髓由来の間質細胞を詳細に分析したところ、年齢に関わらず、歯槽骨再生医療に必要な細胞数が確保できた。低血清培地は 10% 血清培地よりも細胞増殖能も骨分化能も高かった。低血清培地で培養した顎骨由来の間葉系幹細胞はマウス背部でも骨形成を示した。一方、シャーレ内では高い骨分化能を示す細胞は必ずしも生体内で高い骨形成能を示さないことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We successfully acquired sufficient numbers of stromal cells from 30 patients' alveolar bone marrow aspirates. We could get enough number of cells for alveolar bone engineering from elderly patients. Low level serum contained medium has higher potential of cell growth and differentiation compared with well-known 10% serum contained medium. Transplantation of alveolar bone marrow stromal cells into mouse showed heterotopic ossification. The cells which have high osteogenic activity *in vitro* did not show high bone formation *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	1,9110,000

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

バイオテクノロジー戦略大綱(H14.12.6 内閣総理大臣決定)に基づき政府は平成 15 年から「再生医療の実現化プロジェクト」を立ち上げたが、研究開始当初においても再生医療が実現しているとはいえない状況であった。高齢者の増加、歯周病の蔓延により歯の喪失後に高度に歯槽骨（顎堤）が吸収することは、

その後の補綴修復治療に大きな妨げとなっている。具体的にはインプラントの埋入も困難となり、義歯も不安定になり、審美的にも根本的な満足は得られない。補綴主導で歯槽骨再生医療を実現することは 21 世紀の健康日本を実現するために必須の課題である。なぜならば、最も歯槽骨不足による補綴治療の困難さに悩み、骨増生の

ニーズを感じているのは補綴治療を担当する歯科医師であり、人生の最後まで良く噛んでおいしい食事を摂取する事は人類のQOL維持のための最低限の条件の一つであるからである。

我々はこれまでの中型動物実験を通して歯槽骨増生の成功を左右する最も重要な要素が「細胞の性能」ではないかと予想していた。そして NEDO のシーズ育成調査結果から顎骨からの幹細胞採取が可能になることが、今後の歯科における歯槽骨再生医療の市場拡大に繋がることを確認した。また発生学的には歯槽骨は神経堤由来であり、中胚葉由来の長管骨骨髄とは発生学的にも異なるため、顎顔面領域の骨を再生するためには神経堤由来の顎骨骨髄由来の体性幹細胞を用いる事が歯槽骨再生の早さ、質、そして予後において最もリーズナブルであろうと考えた。研究期間中に山中教授が iPS 細胞でノーベル賞を受賞して国民の再生医療への期待は一気に高まってきていた。しかし iPS 細胞の作製のみで再生医療は実現するものではない。基礎研究と臨床を繋ぐトランスレーショナルリサーチが充実してこそ基礎研究が国民の健康に役立つのである。そして歯槽骨を再生させるためには iPS を使う必然性はなく、体性幹細胞と骨補填材の複合体で十分骨は再生するはずなのだが、研究開始当初には、骨補填材単独の移植や体性幹細胞を使った歯槽骨の再生メカニズムは解明されてはいない状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究の将来目標は著しく骨吸収した歯槽骨を安全・確実に再生するための歯槽骨再生医療を確立することである。様々な理由で歯を喪失した患者の顎堤は著しく吸収していることが多く、予知性の高い補綴治療を行うためには補綴主導で骨を補綴(補填)することが理想である。しかし骨を増生する為に未だ侵襲の大きい自家骨移植がゴールドスタンダードとされている。再生医療を実現するためには基礎から臨床そしてその臨床評価までの全ての段階をコーディネートする事が必要で、そのためには歯槽骨の再生メカニズムを解明して、一つ一つエビデンスを積み上げていく事が必要である。本研究では顎骨骨髄間質細胞を用いた確実な骨再生に必要で未だ解決していない①初代培養法の条件設定、②細胞の表現形と分化能の関連③移植細胞数と骨形成量の関連、④低血清での培養法確立、⑤移植細胞の表現形とその細胞移植後の骨形成との関連について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 初代培養法の条件設定

ヒト顎骨骨髄液を患者(30名, 22歳から78

歳)の同意を得た上でインプラント手術のファーストドリリング時に溢出する骨髄液として採取した(ヒト口腔組織由来骨原性幹細胞の分離, 同定と骨組織再生(長崎大学倫理委員会承認番号: 0738号))。採取した骨髄液はプラスチック培養皿上に  $5 \times 10^4$  WBC/cm<sup>2</sup> で播種し、接着して増殖した細胞を顎骨骨髄由来間質細胞として培養した。その後、累積細胞増殖曲線を用いた細胞増殖能の検討と *in vitro* での石灰化能の検討を行った。またインプラント埋入計画のために撮影されているCTデータを参考に採取部位の骨髄のおおよそのCT値を測定し、採取骨髄の質との関連性を検討した(図1)。



図1 骨髄採取部位のCT値測定例

### (2) 細胞の表現形と分化能の関連検討

(1)で培養された顎骨骨髄由来間質細胞の細胞膜表面抗原をフローサイトメトリーで分析し、その後の *in vitro* での骨分化能との関連性を検討した。

### (3) 移植細胞数と骨形成量の関連

骨分化能をもつ顎骨骨髄由来間質細胞を、炭酸アパタイトと複合させ、SCIDマウス背部皮下への移植実験を行い、*in vivo* での骨形成能の検討を行った(長崎大学動物実験計画承認番号: 1007080866)。移植に用いなかった細胞/炭酸アパタイト複合体の一部をエチジウムブロマイド/アクリリンオレンジによる2重染色を行い、細胞の生存状態を観察した。炭酸アパタイトは(株)ジーシーの試作品で、粒径0.5~1.0mmのもの40mgを一か所に移植した。移植6週後に組織片を回収し、固定、脱灰後、連続切片を作成し、HE染色を行った。

### (4) 低血清での培養法確立

通常骨再生医療では400ml程度の採血によって患者血清を得て、細胞培養を行っているが、患者負担が大きく、血清成分の違いによる培養成績の不安定性も懸念される。そこで予備実験として、完全ケミカルディファイン培地であるSTK培地(DSファーマ社製)を用いて、(1)と同様に4名の患者から採取された顎骨骨髄間質細胞の培養を試みた。しかし完全無血清培地では1名からのみしか接着細胞が得られなかったため、本実験では1%血

清を添加し、低血清培養を試みた。コントロールとして同じ骨髄液を通常の10%血清含有培地でも培養した。8名の患者からの顎骨髄間質細胞の低血清培養を試み、得られた細胞の増殖能と細胞表面抗原発現、石灰化能と、(2)と同じく SCID マウス皮下での骨形成試験を行った。

(5) 移植細胞の表現形とその細胞移植後の骨形成との関連について  
顎骨骨髄間質細胞はその患者ごとに *in vitro* での骨分化能が異なるが、*in vitro* での骨分化能が *in vivo* での骨形成能と相関があるのかを検討するため、*in vitro* での骨分化能が高い細胞株と *in vitro* での骨分化能が低い細胞株を SCID マウス背部に移植し、移植8週あるいは11週後に移植部位を採取し、固定、脱灰後、連続切片を作成し、HE染色にて組織学的評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 初代培養法の条件設定

30名の患者から顎骨骨髄液を500 $\mu$ 1程度で採取したが、そのうち22名からは細胞増殖を得た。細胞が増殖しなかった8名分のうち、4名分は明らかな培養操作の失敗(細菌のコンタミネーション、培養皿の取違い、不適切な培地交換、骨髄液量が少なすぎた例)であったが、残りの4名分は必要量の骨髄液が採取され、明らかな培養誤操作が無いにも関わらず、間質細胞のコロニーが得られなかった。全ての骨髄液は有核細胞数にして5 x 10<sup>4</sup> WBC/cm<sup>2</sup>で培養皿に播種したが、全く同じ培養操作でもその後の増殖曲線は個人によって大きく異なった。また同じ骨髄液を小分けして培養すると、出現したコロニーによってもその後の細胞増殖率は異なり、*in vitro* での骨分化能も異なっていた。また採取部位のCT値と培養の結果には特に関連は認められなかった。また採取患者の年齢(22~78歳)と得られる細胞数にも関連は認められなかった。したがって、少なくとも2か所の顎堤から500 $\mu$ 1程度の顎骨骨髄液を5 x 10<sup>4</sup> WBC/cm<sup>2</sup>で培養皿に播種して、適切に培養すれば、高齢者からでもほぼ確実に移植に必要な数の間質細胞を得られることが示された。

##### (2) 細胞の表現形と分化能の関連

顎骨骨髄から採取して培養された間質細胞の表現形を確認するため、フローサイトメリーにて間葉系幹細胞の陽性、陰性マーカーの発現状態を検査した。その結果 *in vitro* で高骨分化を示す細胞と低骨分化を示す細胞の表面抗原に差は検出されなかった(図2&3)。したがって①今回採取された顎骨骨髄間質細胞は分化の程度の差はあるが、いずれも間葉系幹細胞である②しかし、今回検討し

た表面抗原だけでは、採取された細胞の骨分化能の高さを予測することは困難であることが示された。

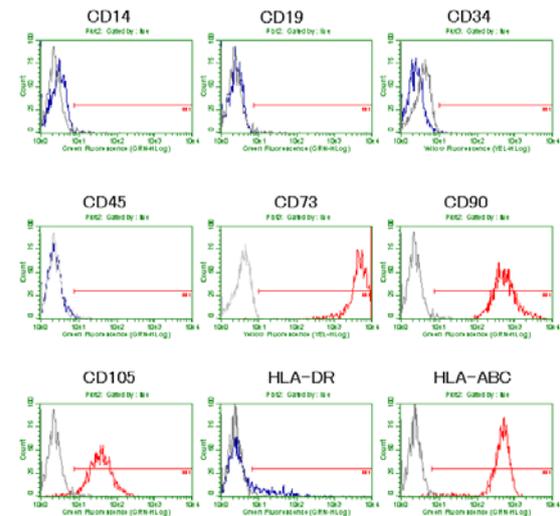
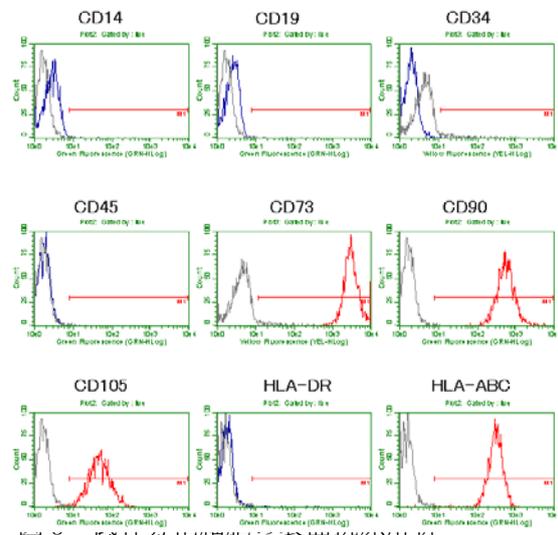


図2 高骨分化細胞の表面抗原解析



##### (3) 移植細胞数と骨形成量の関連

まず、多孔質炭酸アパタイト上での細胞の生死状態を観察すると、接着6時間後ではエチジウムブロマイドに赤く染まった死細胞が所々に観察された(図3)。アパタイトのみ、あるいは顎骨由来間質細胞を50万細胞、100万細胞、200万細胞複合させた移植体をSCID背部に移植したところ、移植細胞の数に比例して *in vivo* での骨形成量は多かった(図4)。

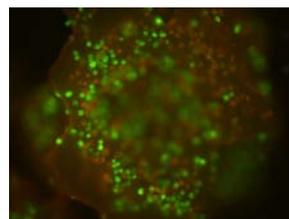


図3 緑が生細胞/赤が死細胞を示す (bar=1mm)

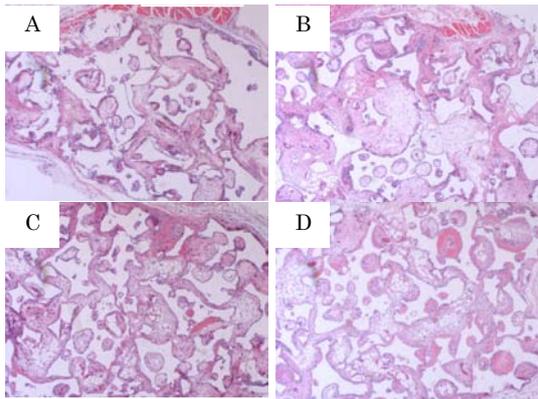
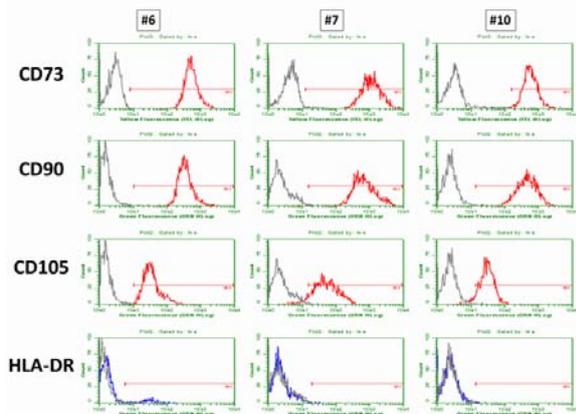


図4 A:無細胞、B:50万細胞、C:100万細胞、D:200万細胞での骨形成状態

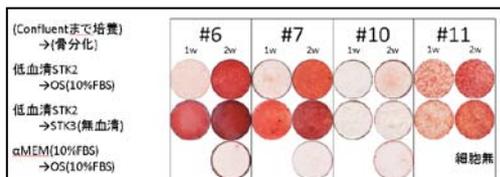
#### (4) 低血清での培養法確立

8名の患者からの初代顎骨髄間質細胞を低血清で培養し、5名分から細胞コロニーを得たが、細胞増殖は4名分からのみ認められた。その4名からの顎骨骨髄間質細胞は従来の10%血清培地での培養法と比較して増殖能が高く、最終的にも10倍から100倍の細胞数を得た。また低血清培養した細胞は、間葉系幹細胞の陽性抗原を発現し、陰性抗原は発現していなかったことから、低血清培養でも細胞のフェノタイプは大きく変わらないことが示唆された(図5)。



#### 図5 低血清培養での表面抗原解析

また *in vitro* では初代から低血清培養で、その後に無血清の骨分化培地で培養する方法が最も早く石灰化を示すことが示された(図6)。



#### 図6 *in vitro* での骨分化能の評価

また低血清培養した細胞を未分化のまま多孔質炭酸アパタイトに複合させて、SCIDマウスの背部に移植すると、骨形成が認められた

ことから、低血清培養は従来の血清培養と同等の骨形成能を顎骨骨髄間質細胞に与えることが示唆された(図7)。

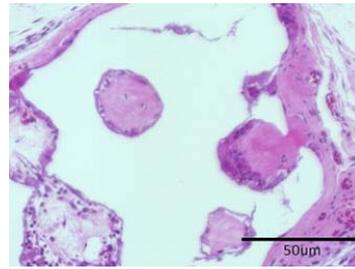


図7 低血清培養した顎骨由来間質細胞をSCID背部へ移植した後、11週後に回収して組織切片作成後のH&E染色像

#### (5) 移植細胞の表現形とその細胞移植後の骨形成との関連

(4)で示された *in vitro* で高い骨分化能を示す細胞と、低い骨分化能を示す細胞を未分化のまま多孔質炭酸アパタイトに複合させて、SCIDマウスの背部に移植して、生体内での骨形成能を検討すると、驚くべきことに *in vitro* では高い骨分化能を示す細胞を移植した部位(図8)よりも *in vitro* で低い骨分化能を示す細胞を移植した部位(図9)の方が生体内で多く骨を形成していた。これは培養の段階で高い骨分化能をもつ細胞は必ずしも生体内で高い骨形成能を持つとは限らず、より低い分化状態か、あるいは例えば血管誘導能を持つことが生体内での骨形成には有利に働くことを示唆している。*In vitro* での骨分化能の検討は生体内での骨形成能の直接的評価とはなり得ないことが示されたことから、幹細胞を用いる骨再生医療を実施する際には生体内での骨形成能を予測できる新たなマーカーの検索が必要であることが示された。

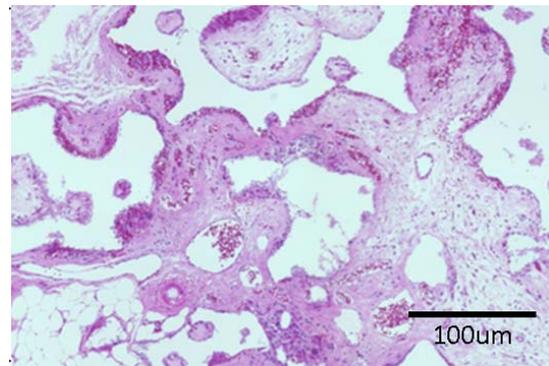


図8 *in vitro* では骨分化能の高い細胞を移植した部位

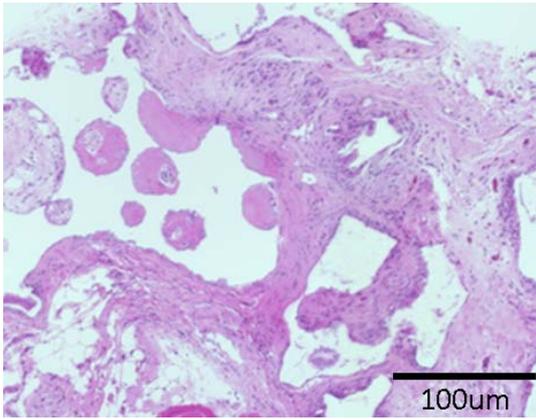


図9 *in vitro*では骨分化能の低い細胞を移植した部位

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

- ① Suehiro F, Nishimura M, Kawamoto T, Kanawa M, Yoshizawa Y, Murata H, Kato Y: Impact of Zinc Fingers and Homeoboxes 3 (ZHX3) on the Regulation of Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation, *Stem Cells Develop*, 20(9), 1539-1547, 2011. doi: 10.1089/scd.2010.0279
- ② Makihira S, Nikawa H, Shuto T, Nishimura M, Mine Y, Tsuji K, Okamoto K, Sakai Y, Sakai M, Imari N, Iwata S, Takeda M, Suehiro F: Evaluation of trabecular bone formation in a canine model surrounding a dental implant fixture immobilized with an antimicrobial peptide derived from histatin. *J Mater Sci Mater Med*, 22(12), 2765-2772, 2011. doi: 10.1007/s10856-011-4440-2
- ③ Nishimura M, Takase K, Suehiro F, Murata H: Candidates cell sources to regenerate alveolar bone from oral tissue, *Int J Dent*, 2012, Article ID 857192: 1-5, 2012. doi:10.1155/2012/857192
- ④ Shigeishi H, Takechi M, Nishimura M, Takamoto M, Minami M, Ohta K, Kamata N: Clinical evaluation of novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) in a maxillary sinus floor augmentation procedure. *Dent Mater J*, 31 (1), 54-60, 2012. doi:10.4012/dmj.2011-089
- ⑤ Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K: Stem Cells in Dentistry - Part I: Stem Cell Sources, *J Prosth Res*,

56, 151-165, 2012. doi:

10.1016/j.jpor.2012.06.001.

⑥ Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K: Stem Cells in Dentistry - Part II: Clinical Applications, *J Prosth Res*, 56, 229-248, 2012. doi:

10.1016/j.jpor.2012.10.001.

〔学会発表〕(計14件)

- ① 宇田航希, 西村正宏, 黒木唯文, 末廣史雄, 村田比呂司: 骨髄間質細胞の無血清前培養は石灰化を促進する, 第40回日本口腔インプラント学会 2010.9.18(札幌)
- ② 末廣史雄, 西村正宏, 黒木唯文, 宇田航希, 村田比呂司: 間葉系幹細胞における骨分化特異的転写因子の解析, 第40回日本口腔インプラント学会 2010.9.18(札幌)
- ③ 宇田航希, 西村正宏, 末廣史雄, 吉澤 祐, 黒木唯文, 山口義和, 浪越建男, 村田比呂司: 骨髄間質細胞の骨分化に与える血清の不安定性, 平成22年度日本補綴学会九州支部学術大会 2010.11.27(熊本)
- ④ 吉澤 祐, 西村正宏, 末廣史雄, 宇田航希, 黒木唯文, 村田比呂司: リン酸カルシウム系骨補填材の種類は間葉系幹細胞の骨再生能に影響する, 第32回日本バイオマテリアル学会 2010.11.29(広島)
- ⑤ 吉澤 祐, 西村正宏, 末廣史雄, 黒木唯文, 浪越建男, 村田比呂司: 各種骨補填材の *in vitro*での骨髄間質細胞の骨分化に与える影響の検討, 第120回日本補綴歯科学会 2011.5.21(広島)
- ⑥ 吉澤 祐, 末廣史雄, 西村正宏, 朝比奈泉, 村田比呂司: ヒト顎骨骨髄間質細胞の表現形の検討, 第41回日本口腔インプラント学会学術大会 2011.9.17(名古屋)
- ⑦ 吉澤 祐, 西村正宏, 末廣史雄, 黒木唯文, 浪越建男, 村田比呂司: ヒト顎骨骨髄由来間質細胞の表現形の多様性, 平成23年度日本補綴歯科学会九州支部学術大会 2011.11.5(長崎)
- ⑧ 末廣史雄, 西村正宏, 吉澤 祐, 高瀬一馬, 村田比呂司: 骨再生治療における顎骨骨髄由来間質細胞の有用性, 口腔先端応用医科学研究会第4回学術会議 2012.1.21(東京)
- ⑨ 末廣史雄, 西村正宏, 上田忠佳, 坂井裕大, 村田比呂司: 新規顎骨再生医療実現のための無血清培地を用いた顎骨骨髄由来間質細胞培養, 第11回日本再生医療学会 2012.6.12(横浜)
- ⑩ 西村正宏, 末廣史雄, 朝比奈泉, 坂井裕大, 村田比呂司: 顎骨骨髄由来間葉系幹細胞の分離と解析, 第11回日本再生医療学会 2012.6.12(横浜)
- ⑪ 末廣史雄, 西村正宏, 中村康司, 村田比呂司: 顎骨骨髄由来間葉系幹細胞の多様性と再生医療への応用の可能性, 平成24年度日

本補綴歯科学会四国・中国・九州支部合同学術大会 2012.9.2 (広島)

⑫西村正宏, 坂井裕大, 末廣史雄, 黒木唯文, 高瀬一馬, 朝比奈 泉, 村田比呂司: 顎骨骨髓由来間質細胞を用いた骨再生医療の開発, 第22回日本歯科医学会総会 2012.11.10(大阪)

⑬末廣史雄, 西村正宏, 上田忠佳, 坂井裕大, 村田比呂司: 顎骨再生医療のための無血清培地を用いた顎骨骨髓由来間葉系幹細胞培養の検討, 第34回日本バイオマテリアル学会 2012.11.26(仙台)

⑭末廣史雄, 西村正宏, 上田忠佳, 坂井裕大, 朝比奈 泉, 村田比呂司: 低血清培養による顎骨骨髓由来間質細胞を用いた新規顎骨再生医療の開発, 第12回日本再生医療学会 2013.3.22(横浜)

[図書] (計1件)

①加藤幸夫, 邵 金昌, 長谷川森一, 西村正宏, 桂 由紀, 中村憲正, 辻紘一郎. 幹細胞医療の実用化技術と産業展望、江上美芽, 水谷 学監修. 幹細胞用無血清培地の開発. シーエムシー出版, 2013; pp. 50-60.

[その他]

ホームページ等

[http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Prostho2/Nishimura\\_study.html](http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Prostho2/Nishimura_study.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

小守 壽文 (KOMORI TOSHIFUMI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 00252677

朝比奈 泉 (ASAHINA IZUMI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 30221039

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

長井 一浩 (NAGAI KAZUHIRO)

長崎大学・病院・講師

研究者番号: 30304942

村田 比呂司 (MURATA HIROSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 40229993

### (3) 連携研究者

住田 吉慶 (SUMITA YOSHINORI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 50456654

末廣 史雄 (SUEHIRO FUMIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 40524781