

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17060

研究課題名（和文）生体外で軟骨内骨化を誘導した間葉系幹細胞集塊を用い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 induced endochondral ossification ex vivo.

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） 3,500,000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比較的短期間で再生可能な新規再生治療法の開発を目的としており、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を用いて研究を行った。

軟骨誘導C-MSCsが骨再生に効果的であることは既に明らかにされており、本研究では再生期間の短期化を期待して、軟骨誘導に加えて骨分化誘導を施したC-MSCsを骨欠損モデルへ移植した。その結果、軟骨誘導培地および骨誘導培地で培養したC-MSCsが自身の骨形成によってより短期間で高い骨再生効果を示すことが明らかとなった。また、移植体由来の骨と周囲の骨が骨細胞ネットワークを形成することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、軟骨誘導培地と骨分化誘導培地を用いて作製した間葉系幹細胞集塊(C-MSCs)が軟骨誘導C-MSCsと比較してより短期間で骨再生効果を示すことが明らかとなった。本研究で用いたC-MSCs移植は、既存の治療法では再生困難な骨欠損の再生が期待できる上、骨再生期間の短縮によって、治癒期間の感染リスクの低減およびコスト削減にも貢献できると考える。またこの成果は、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期待できる。

さらに、本研究の細胞移植法では異種動物由来成分を使用しないため、臨床応用にも有利であると考えられる。

研究成果の概要（英文）： The purpose of this study is to develop a new method that can regenerate bone lost due to periodontal disease in a relatively short period of time. To achieve this goal, we use the clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complexes(C-MSCs) and conducted transplantation experiments.

It has already been shown that chondro-inductive C-MSCs are effective in bone regeneration. On the other hand, in this study, C-MSCs with chondrocyte induction followed by bone differentiation induction are transplanted into a bone defect model with the expectation of shortening the regeneration period. The results showed that C-MSCs cultured in two different medium showed higher bone regeneration effect in a shorter period of time through their own bone formation. The study also revealed that the bone derived from the graft and the surrounding bone form an osteocyte network.

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既存の歯科医療でも再生可能であるが、その適応症例は限定されており、特に重篤な骨欠損の再生は困難である。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、実際に軟骨誘導を施した C-MSCs が大規模骨欠損の再生に効果的であることを報告した(文献1参照)。

しかしながら、軟骨誘導 C-MSCs 移植による骨再生には治療期間が長く必要である欠点が見られた。そのため、骨再生効果を持ち、かつ治療期間がより短い治療法の開発が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、軟骨誘導培地と骨分化誘導培地を併用することによって作製した C-MSCs が、高い骨再生能を持ち、また軟骨誘導 C-MSCs より短期間で再生効果を示すことを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 軟骨誘導培地と骨分化誘導培地を用いた C-MSCs の作製

ヒト由来 MSCs を 1.0×10^5 cells/well で 48-well プレートに播種し、増殖培地で 4 日間培養することで細胞シートを作製した。その後、細胞シートを well の底から剥離し、低接着性のプレートに移動させ、軟骨誘導培地で 10 日間および骨分化誘導培地で 7 日間浮遊培養することで骨殻様構造を持つ C-MSCs を作製した。比較対象として軟骨誘導培地で 17 日間培養した C-MSCs を使用した。また、培地は全て xeno-free のものを使用した。

(2) 移植前の C-MSCs の解析

(1)で得られた 2 種類の C-MSCs を Safranin O 染色および Alizarin 染色によって観察した。また、COL1 および COL2 で蛍光免疫染色、軟骨分化マーカーと軟骨内骨化マーカーについて real-time PCR することで移植前の C-MSCs を解析した。

(3) 骨欠損モデルへの移植実験

8 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 2.3mm の骨欠損を作製し、移植実験を行った。骨欠損部に 1 粒の C-MSCs を移植し、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。

(4) 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・Trap 染色・ヒト Vimentin の蛍光免疫染色にて組織学的解析を行った。さらに、骨細胞の細胞ネットワークを観察するために、ヒト Vimentin と phalloidin にて 2 重染色を行って観察した。

4. 研究成果

(1) 作製した C-MSCs の解析

軟骨誘導培地のみで作製した C-MSCs および 2 種の培地で作製した C-MSCs は、ともに Safranin O に染色される軟骨基質の産生が観察された。一方で 2 種の誘導を施した C-MSCs では、Alizarin 染色によって細胞塊の外縁に軟骨内骨化における骨殻様の構造が形成されていることが確認された(図 1.A)。

また蛍光免疫染色によって、軟骨誘導 C-MSCs では COL2 が、軟骨誘導・骨誘導 C-MSCs では COL1 が多く産生されていることが明らかとなった。さらに real-time PCR において、軟骨誘導 C-MSCs では COL2 や COL10 といった軟骨内骨化の前期～中期にみられる遺伝子の発現が有意に上昇しており、2 種培養 C-MSCs では RUNX2・COL1・VEGF のような軟骨内骨化の後期に発現する遺伝子の発現増加が観察された(図 1.B)。

これらの結果から、2 種の培地を併用することによって、移植前の C-MSCs 内で軟骨内骨化が誘導されたことが示唆された。

(2) 骨欠損に対する C-MSCs の再生効果

移植 4 週目に micro CT 解析を行ったところ、軟骨誘導 C-MSCs と 2 種誘導 C-MSCs とともに移植した C-MSCs 由来と思われる石灰化物が形成されており、CT 定量でも石灰化に差異を認めなかった。一方移植 8 週目では、軟骨誘導 C-MSCs と比較して 2 種誘導 C-MSCs において顕著に

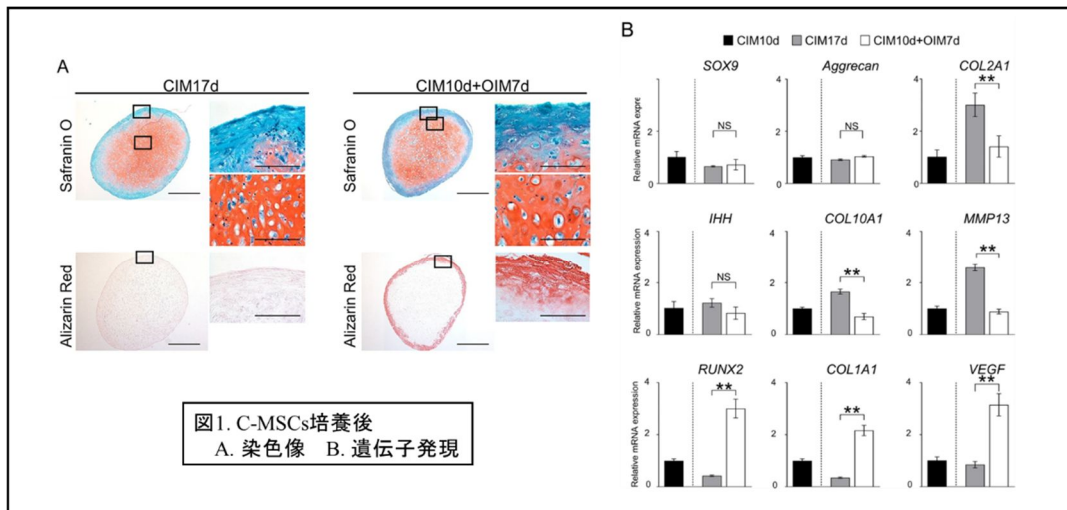


図1. C-MSCs培養後
A. 染色像 B. 遺伝子発現

骨再生を認め(図 2.A)、CT 定量でも矛盾しない結果が確認された。

また移植 8 週目の組織学的解析にて、軟骨誘導 C-MSCs 移植では C-MSCs 内部に Safranin O に染色される軟骨基質が残存していることが観察された。一方で 2 種誘導 C-MSCs 移植では C-MSCs 内部の軟骨基質はほぼ消失しており、また骨髓腔様の構造が形成されていることが明らかとなった(図 2.B)。

これらの結果から、軟骨誘導 C-MSCs は過剰に軟骨分化されているため軟骨基質の吸収が遅延し、結果として骨再生が長期化したと考えられる。一方軟骨誘導培地および骨分化誘導培地を併用した C-MSCs では、移植前に軟骨内骨化が誘導されることで、移植した C-MSCs の骨化が促進され、その結果短期間で高い骨再生効果を持つことが示唆された。

さらに、ヒト Vimentin と phalloidin の 2 重染色の結果から、2 種誘導 C-MSCs 移植において移植したヒト由来の骨細胞と周囲のマウス由来の骨細胞が細胞ネットワークを形成していることが観察された(図 2.C)。この結果から、2 種誘導 C-MSCs の骨再生効果は移植した細胞自身の骨化によって得られ、また再生骨が周囲骨と細胞レベルで結合していることが明らかとなった。

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利用できる硬組織再生療法の発展にもつながると考える。

また本研究では再生期間の短縮に成功したため、本研究の成果は再生期間中の感染リスクの低減やコストの削減にも貢献できると考える。

将来臨床応用を想定する上で、細胞株ごとに差異がある骨再生能の評価法の開発等まだ改善すべき点はあるが、本研究の成果は今後の治療法開発の一歩であると期待する。

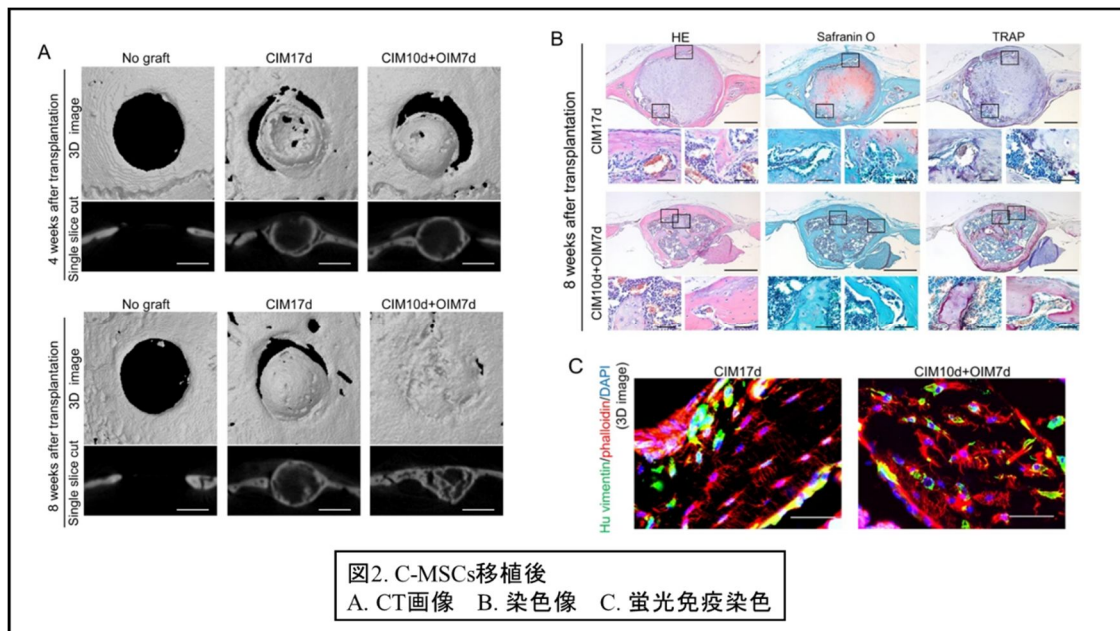


図2. C-MSCs移植後
A. CT画像 B. 染色像 C. 蛍光免疫染色

引用文献

1. 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2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

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 -

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 -

〔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
---------	---------