

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689078

研究課題名(和文)濃縮骨髄幹細胞のキャラクタライズと骨粗鬆症治療への応用可能性検討

研究課題名(英文)Administration of purified mesenchymal stem cells is a promising new approach for treating osteoporosis

研究代表者

縣 秀樹 (AGATA, Hideki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：20581177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、濃縮骨髄幹細胞を用いた骨密度・骨質改善法の開発を目指して、間葉系幹細胞(MSC)の濃縮法の開発と骨粗鬆症モデルマウスへの細胞投与を行った。その結果、Sca-1陽性MSCは、通常培養のMSCと比較して、高い骨芽細胞分化能と破骨細胞形成抑制能を有しており、この細胞群を濃縮して投与することで、効果的に骨密度・骨質の改善が得られることが示唆された。さらに、尾静脈に投与した群と骨髄内に投与した群の骨密度・骨量の改善効果に有意な差は認めなかったが、骨髄内投与の方が塞栓の危険性が低く、安全性が高い投与方法であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the safety and efficacy of intra-bone marrow administration of pure MSCs for the treatment of ovariectomy (OVX)-induced osteoporosis compared with intravenous administration. Relatively pure MSCs possessing greater potential for cell proliferation, osteogenic differentiation, and inhibition of osteoclastogenesis were obtained by magnetic activated cell sorting with the anti-Sca-1 antibody. Sca-1-sorted MSCs were administered to ovariectomized mice. As for the efficacy, intravenous administration improved bone mineral density (BMD) by increasing bone mineral content without affecting bone thickness, whereas intra-bone marrow administration improved BMD by increasing both bone mineral content and bone thickness. These results indicate that intra-bone marrow administration of MSCs is more effective approach for treating osteoporosis.

研究分野：口腔外科学、再生医学

キーワード：骨粗鬆症 細胞治療 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症患者では骨強度の低下が大きな問題となるが、骨強度は「骨密度」と「骨質」によって決まる。現在、骨粗鬆症の治療には様々な薬剤が用いられているが、これらは「骨密度」の改善には効果があるが「骨質」の改善には有効でないため、骨粗鬆症に起因する骨折の予防効果は十分でない。申請者らは、骨髄間質細胞 (BMSC) の骨形成能に注目し、BMSC を用いた骨密度・骨質改善法の開発に取り込んでおり、現在までに局所での安全性と有効性を一部確認している。本研究は、この基盤技術に濃縮幹細胞を応用することで、全身の骨密度・骨質改善法の確立を目指すものである。

骨粗鬆症罹患患者数は現時点においても推定 1000 万人以上と考えられ、今後到来する高齢化社会においてはさらに患者数が増加するものと考えられる。骨粗鬆症の本質は骨強度の低下であり、それ自体直接死につながる疾患でないが、重度の骨粗鬆症では体の重み加わるだけでも骨折の原因になるため、日常生活に支障をきたす疾患である。特に、大腿骨や椎体を骨折した場合には、疼痛に加え、歩行障害や神経の圧迫障害が生じるために、そのまま寝たきり状態になることも多く、骨粗鬆症患者数の増加は大きな社会問題となっている。

骨強度は「骨密度」と「骨質」により決まるため、骨粗鬆症に起因する骨折を予防するには、「骨密度」と「骨質」の両方を改善する必要があるが、現在広く行われている薬剤による治療では「骨質」の改善は困難とされている。一方、BMSC による骨粗鬆症治療は、「骨密度」と「骨質」の両方を改善する効果があることから次世代の治療法として注目を集めているが、現在の標準的な培養法では治療効果の高い BMSC を十分数確保することは困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では、下記の 3 点を明らかにすることを目的に実験を行った。

BMSC の幹細胞分画濃縮法を最適化し、濃縮幹細胞の効率的選択培養法を確立する。

骨髄由来濃縮幹細胞の特性を明らかにする。

骨粗鬆症モデル動物を用いて、骨髄由来濃縮幹細胞投与後の骨密度・骨質改善効果を評価する。

## 3. 研究の方法

本研究では、マウス BMSC から幹細胞分画を選択的に濃縮し、得られた細胞の特性 (特異

的マーカーの発現解析や細胞増殖、骨分化能) を明らかにした上で、骨粗鬆症モデルマウスに移植し、骨密度および骨質の改善効果を評価した。さらに、濃縮幹細胞投与の安全性を確立するために、投与方法の検討も行った。

## 4. 研究成果

骨髄由来濃縮幹細胞の抽出；

骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の細胞表面抗原は CD11b<sup>-</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、Sca-1<sup>+</sup>であることが知られている。そこで、皮質骨の酵素処理で単離・培養したマウス MSC のこれらのマーカー発現を調べたところ、Sca-1 陽性細胞は全て CD11b<sup>-</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>であることが明らかになった。すなわち、Sca-1 陽性の細胞=MSC であることが明らかになったため、Anti-Sca-1 抗体を用いて磁気細胞分離装置 (MACS) を用いて濃縮を行った。その結果、全てが Sca-1 陽性の濃縮 MSC が得られた。

Sca-1 陽性 MSC の骨分化能の評価；

Sca-1 陽性 MSC の骨芽細胞への分化能を検討するために、骨芽細胞分化誘導培地で 1 週間分化誘導後、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。その結果、Sca-1 陽性 MSC は、通常培養の MSC (Control MSC) の約 2.9 倍の活性値を示した。

骨粗鬆症治療への応用の可能性の検討；

Sca-1 陽性 MSC の骨粗鬆症治療への応用について、その可能性を評価するために、まず骨粗鬆症モデルマウスの作出を行った。

6 週齢の雌マウスを全身麻酔下で卵巣摘出 (OVX) または sham-ope 後 3 か月間飼育し、大腿骨の骨量、骨密度を測定した。その結果、OVX マウスでは骨量、骨密度が有意に低下していることが明らかになった。そのため、この OVX マウスを動物モデルとして実験に使用することにした。

Sca-1 陽性 MSC を OVX マウスに腹腔内投与、尾静脈投与、または骨髄内投与を行ったところ、腹腔内投与群では骨量、骨密度に変化は認められなかった。しかしながら、尾静脈投与群と骨髄内投与群では骨量、骨密度の改善が認められた。尾静脈投与群と骨髄内投与群の骨量、骨密度改善効果に有意な差は認めなかったが、骨髄内投与の方が塞栓の危険性が低い、安全性の高い投与方法であることが示唆された。

次に、Sca-1 陽性 MSC の投与による骨密度、骨質改善のメカニズムについて検討を行った。まず Sca-1 陽性 MSC の破骨細胞形成抑制能を明らかにするため、破骨前駆細胞を Sca-1 陽性 MSC または Control MSC との共培養下で分化誘導を行った。その結果、Sca-1 陽性 MSC は、Control MSC の 3 倍の破骨細胞形成

抑制能を発揮することが明らかになった。さらに、その抑制メカニズムを明らかにするために、上記共培養で回収した培養上清中に含まれる OPG、M-CSF、RANKL の濃度を ELISA にて測定した。その結果、Sca-1 陽性 MSC は破骨細胞抑制因子である OPG を顕著に放出するが、破骨細胞誘導因子である M-CSF、RANKL は殆ど放出しないことが明らかになった。

以上の実験結果から、Sca-1 陽性 MSC は、通常培養の MSC と比較して、高い骨芽細胞分化能と破骨細胞形成抑制能を有するため、この細胞を投与することで、効果的に骨密度・骨質の改善が得られることが示唆された。

#### 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7件)

1. Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Characterization of time-course morphological features for efficient prediction of osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng.* 111(7):1430-1439, 2014. 査読有
  2. Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, Imai K. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Tissue Eng Part B.* 20(3):229-232. 2014. 査読有
  3. Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 8(2):e55082, 2013. 査読有
  4. Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H. Characteristic differences among osteogenic cell population of rat bone marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed or Ficoll-treated marrow. *Cytotherapy.* 14(7):791-801, 2012. 査読有
5. Inoue M, Ebisawa K, Itaya T, Sugito T, Yamawaki-Ogata A, Sumita Y, Wadagaki R, Narita Y, Agata H, Kagami H, Ueda M. Effect of GDF-5 and BMP-2 on the expression of tendon/ligamentogenesis-related markers in human PDL-derived cells. *Oral Dis.* 18(2):206-212, 2012. 査読有
  6. 懸秀樹、各務秀明、朝比奈泉、高岡恵、堀祐輔. 自家骨移植に代わり得る新しい歯槽骨再生治療法「TE-BONE」. *デンタルダイヤモンド* 37:84-89, 2012. 査読無
  7. 朝比奈泉、懸秀樹、住田吉慶、各務秀明. 新時代の歯槽骨再生治療:TE-BONEの現在. *ザ・クインテッセンス*. 31:0828-0835, 2012. 査読無
- [学会発表](計3件)
1. 中谷佑哉, 懸秀樹, 住田吉慶, 古賀喬充, 朝比奈泉: フリードライ保存した多血小板血漿(PRP)の有用性の検討. 第4回 DDS 再生医療研究会, 日本歯科大学生命歯学部 100周年記念館(東京), 2014年12月6日.
  2. 中谷佑哉, 懸秀樹, 住田吉慶, 南里篤太郎, 河井洋祐, 古賀喬充, 江頭寿洋, 朝比奈泉: Platelet Rich Plasma(PRP)の効果的保存法の検討. 第13回日本再生医療学会総会, 国立京都国際会館(京都), 2014年3月4日~6日.
  3. 各務秀明, 懸秀樹, 住田吉慶, 朝比奈泉: 歯槽骨・唾液腺の再生研究と今後の展開. 第12回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜(神奈川), 2013年3月21日~23日.
- [図書](計0件)
- [産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

縣 秀樹 (AGATA, Hideki)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
客員研究員  
研究者番号：20581177

##### (2) 研究分担者

なし ( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし ( )  
研究者番号：