

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月19日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792237

研究課題名（和文）遺伝子解析による間葉系幹細胞の骨分化能評価法の開発

研究課題名（英文）Development of the evaluation method of mesenchymal stem cell's osteogenic differentiation potential by gene analysis

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ヒト顎骨骨髓由来間葉系幹細胞は骨分化能および脂肪分化能を示す一方で、軟骨分化能をほとんど示さなかった。以前の研究においてヒト腸骨骨髓由来間葉系幹細胞において骨分化マーカーとなる可能性が示された ZHX3 は、ヒト顎骨骨髓由来間葉系幹細胞においては骨分化初期の発現レベルに変動が見られなかった。またヒト顎骨骨髓由来間葉系幹細胞の *in vivo* における異所性の骨形成能は、*in vitro* とは逆の結果を示した。本研究から *in vivo* と *in vitro* における骨分化能の結果は、必ずしも一致するとは限らない可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Human alveolar bone marrow derived stem cells had osteogenic and adipogenic differentiation potency, while did not almost have chondrogenic differentiation potency. In the previous study, we reported that ZHX3 might be used for prognostic marker for osteogenic potential of human iliac bone marrow derived stem cells; however, in this study, we noted that the levels of ZHX3 mRNA expression did not change at the initial stage of Human alveolar bone marrow derived stem cells osteogenic differentiation. The *in vivo* heterotopic bone formation model showed the result that was reverse to *in vitro*. The *in vivo* Human alveolar bone marrow derived stem cells bone formation potency may not necessarily accord with *in vitro* osteogenic differentiation potency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：間葉系幹細胞、転写因子、再生医療、顎骨骨髓由来細胞、歯槽骨増生

## 1. 研究開始当初の背景

近年、インプラント体の改良や骨補填材を含めた歯槽骨再生のための新規材料の開発、およびそれに伴う骨再生手法の開発によって、歯科領域における骨再生医療は目覚ましい発展を遂げているが、それでもなお骨再生に用いられる最も予知性の高い移植材は自家骨であるとされている。

しかし、自家骨は採取時の負担の大きさや採取量に制限があり、知覚麻痺などの後遺症の

可能性がある等の欠点があるため、より低侵襲で広範囲の骨欠損に対応できる新たな治療法が開発が望まれている。

現在の日本では他人からの他家移植は受け入れられにくく、免疫反応や感染等の危険性が少ない自己細胞のニーズが高い。そのような状況の中で、比較的侵襲で採取可能である間葉系幹細胞を用いた骨再生治療が歯科領域において臨床応用され始めており、その効果は大きな期待を集めている。また、間葉

系幹細胞は様々な組織から分離可能であるが、由来によってその分化の程度は異なるとされている。そのため、神経堤由来である歯槽骨を再生するためには、発生を同じくする顎骨骨髄由来間葉系幹細胞が効果的であると予想される。

ES 細胞や iPS 細胞を用いた骨再生医療においても最終的には骨原生細胞の骨化メカニズムを明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

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補綴主導で歯槽骨を増生することが理想である。

近年、低侵襲で広範囲の骨欠損に対応できる再生医療の研究が進んでおり、間葉系幹細胞を移植して組織再生を図る研究が数多く報告されている。しかし、間葉系幹細胞の分化能は個人差が大きく、間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の失敗の原因の1つに、細胞株によっては骨分化能を有さない、あるいは骨分化能が低いことが挙げられる。各細胞株の骨分化能を判断するためには幾つかの方法があるが、いずれも最終的な判断を下すために長期間の培養が必要である。そこで、間葉系幹細胞の骨分化初期に特異的に発現が亢進する転写因子を骨分化マーカーとして使用すれば、骨分化能判定のための期間を短縮することが期待される。

また、これまでに骨分化の正の制御因子として RUNX2 やその下流に存在する Osterix といった遺伝子が報告されているが (Nishio Y, Gene 372, 62-70, 2006.)、これらは骨分化だけでなく軟骨分化や脂肪分化においても発現が亢進する遺伝子であり、骨分化特異的に発現が亢進する遺伝子に関する報告は未だなされておらず、その生理的な機能も明らかにされていない。

本研究では、間葉系幹細胞の骨分化に特異的に関連する転写因子をマーカーとして用いた骨分化能評価法を開発し、骨原生細胞を用いた確実な歯槽骨再生医療の開発、および骨分化特異的に発現が亢進する遺伝子の生理的な機能を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト顎骨骨髄由来間葉系幹細胞においても、以前の研究 (末廣史雄: 若手研究 (B) H21~22 年度) と同様の結果が得られるかを検討するために、同細胞の骨分化能、脂肪分化能、軟骨分化能の検討を行った。

顎骨からの細胞採取は「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」(倫理委員会承認番号 0738 号) に則り、専用に

開発した穿刺針 (特願 2007-199178) を用いて極めて低侵襲に行った。

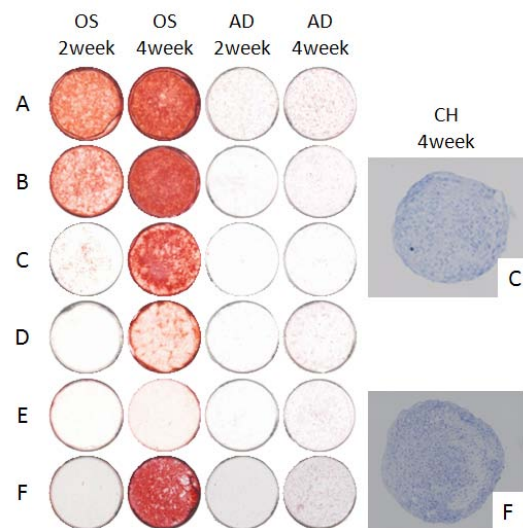
(2) ヒト顎骨骨髄由来間葉系幹細胞を骨分化誘導させ、分化誘導開始後短時間の RNA を回収し、以前の研究 (末廣史雄: 若手研究 (B) H21~22 年度) により選定した転写因子 ZHX3 の遺伝子発現レベルの経時的変化を、リアルタイム RT-PCR 法にて検討した。

(3) *in vitro* で高骨分化能あるいは低骨分化能を有する細胞株において、選定した骨分化マーカーの未分化状態での発現量の比較検討を行った。

(4) *in vitro* で高骨分化能あるいは低骨分化能を有する細胞株を用いて、細胞と担体を混和した移植体を SCID マウスの背部皮下に移植した。移植 11 週後に移植体を回収、HE 染色したサンプルの組織像を観察し、異所性の骨形成能を検討した。

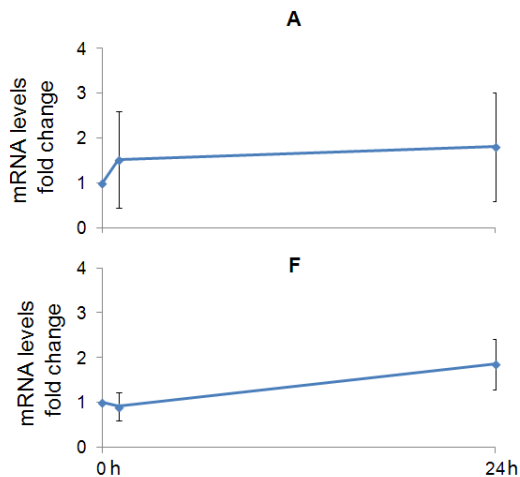
## 4. 研究成果

(1) 採取したヒト顎骨骨髄由来間葉系幹細胞の骨・脂肪・軟骨分化誘導の結果を示す。程度の違いはあるが、ほぼ全ての細胞が骨分化能および脂肪分化能を示した。軟骨分化に関しては一例を示しているが、ヒト顎骨骨髄由来間葉系幹細胞は軟骨分化能を示さなかった。

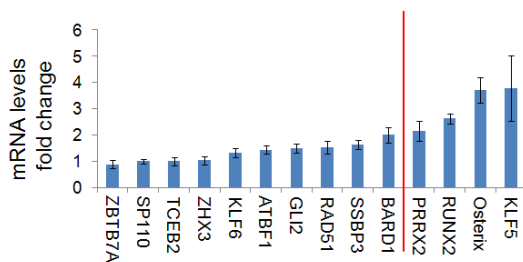


(2) *in vitro* において高骨分化能を持つ細胞 A と低骨分化能を示す細胞 E を使用した。以前の研究により腸骨骨髄由来間葉系幹細胞の骨分化マーカーとして選定した ZHX3 の、骨分化初期の遺伝子発現レベルをリアルタイム RT-PCR を用いて検討した。骨分化誘導 1 時間後および 24 時間後の遺伝子発現レベルを検討したが、ヒト顎骨骨髄由来間葉系幹細胞

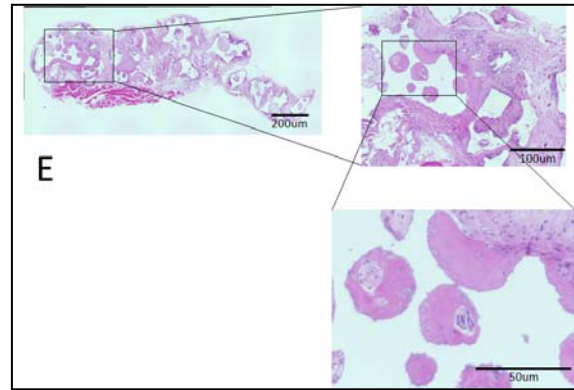
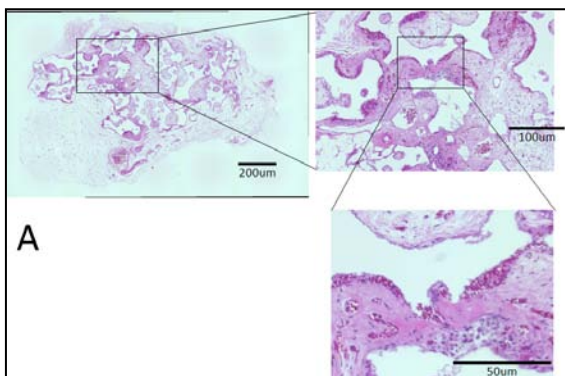
胞において、ZHX3 の発現レベルは未分化状態と比較して 2 倍以上の変化は見られなかった。



(3) 本実験においても細胞 A と細胞 E を使用した。未分化状態での、選定した転写因子および骨分化関連転写因子である RUNX2 と Osterix の発現レベルをリアルタイム RT-PCR を用いて検討した。細胞 E に対する細胞 A の遺伝子発現レベルを示す(細胞 A/細胞 E)。選定転写因子の中で PRRX2、KLF5 は未分化状態で高骨分化細胞の方が発現レベルが高い事が明らかとなった。



(4) 本実験においても細胞 A と細胞 F を使用した。本実験の結果は *in vitro* と異なり、細胞 F が高い骨形成能を示し、細胞 A はほとんど異所性の骨形成能を示さなかった。



## 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 2 件)

- (1) Nishimura M, Takase K, Suehiro F, Murata H. Candidates cell sources to regenerate alveolar bone from oral tissue. International Journal of Dentistry(査読有), 2012, 2012, 857192. DOI: 10.1155/2012/857192
- (2) Makihiro 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. The Journal of Materials Science: Materials in Medicine(査読有), 22, 2011, 2765-2772. DOI:10.1007/s10856-011-4440-2

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 末廣史雄. 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. 21-23. 横浜.
- (2) 末廣史雄. 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. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012. 11. 26-27. 仙台.
- (3) 末廣史雄. 顎骨骨髓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中国四国・九州支部合同学術大会, 2012. 9. 1-2. 広島.

- (4) 末廣史雄. 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. 12-14. 横浜.
- (5) 末廣史雄. 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. 21-22. 東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし