

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463007

研究課題名(和文)顎骨骨髓由来間質細胞を用いた歯槽骨再生のための骨分化能診断法の開発

研究課題名(英文) Development of the diagnostic method using maxilla/mandibular bone marrow stromal cells for alveolar ridge augmentation

研究代表者

末廣 史雄 (SUEHIRO, FUMIO)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：40524781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以前の研究とは異なる条件で、新たに9転写因子を骨髓由来間葉系幹細胞(MSC)/間質細胞(BMSC)の高骨分化マーカーの候補として選定した。これらの遺伝子に対するSmall interfering RNAをMSCに導入し、各転写因子の発現抑制が細胞に与える影響を検討した。実験の結果から、MSCの骨分化に促進的に採用している転写因子とMSCの骨分化に抑制的に作用している転写因子が存在することが確認できた。また、今回選定した転写因子には生体内での骨形成に作用するとの報告が既にあるものも多数含まれており、選定した転写因子が骨分化マーカーと成り得る信頼性も高いことが推察される。

研究成果の概要(英文)：On a different condition in the previous study, we selected new nine transcription factors as a candidate of the osteogenic marker of the maxilla/mandibular bone marrow stromal cell (BMSCs). Knockdown of some transcription factors by the small interfering RNAs (siRNAs) resulted in promotion of osteogenesis, and other knockdown resulted in suppression of osteogenesis. Several transcription factors selected in this study have been already reported concerning with in vivo osteogenesis. Thus, these transcription factors which we selected might be reliable prognostic marker for osteogenic potential of BMSCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯槽骨再生 顎骨骨髓由来間質細胞 転写因子

1. 研究開始当初の背景

近年、骨補填材を含めた顎骨再生のための新規材料の開発や新たな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、自家骨採取は採取時の負担が大きい、採取量に制限がある、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患者に敬遠されがちであり、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。

そのような状況の中で、比較的low侵襲で採取可能である間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) 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、MSC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 MSC が効果的であると予想される。

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、low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、MSC 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、MSC の分化能は個人差が大きく、MSC 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、MSC 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。

我々はこれまでの研究からヒト腸骨骨髄由来 MSC の骨分化初期に特異的に発現が亢進する転写因子 ZHX3 (Zinc finger and homeoboxes 3) を見出したが、この遺伝子はヒト顎骨骨髄由来 MSC 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。

本研究では MSC の骨分化に特異的に関連する転写因子を新たに選定し、骨分化マーカーとして利用することで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) 未分化状態の MSC、骨分化誘導培地にて 24 時間培養後の MSC、骨・軟骨・脂肪、各分化誘導培地にて 28 日間培養後の MSC、

対照群としての線維芽細胞より回収したトータル RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行う。

(2) DNA マイクロアレイの結果に以下の条件を適用し、MSC の骨分化時に特異的に発現する転写因子の探索を行う。

未分化状態の MSC、線維芽細胞、28 日間軟骨・脂肪分化誘導後の MSC と比較して、28 日間骨分化誘導後でのみ発現が 2 倍以上亢進した遺伝子を骨分化特異的遺伝子とする

と同様の条件で軟骨分化特異的遺伝子、脂肪分化特異的遺伝子を選定する

骨分化特異的遺伝子の中で、骨分化誘導 24 時間後で未分化状態の MSC と比較して発現が 2 倍以上亢進した転写因子

骨分化誘導 24 時間後で未分化状態 MSC と比較して発現が 2 倍以上亢進し、軟骨および脂肪分化特異的遺伝子に含まれない転写因子の中で、骨分化誘導 24 時間後の発現亢進の程度が大きい順に 7 遺伝子

(3) 選定した転写因子に対する Small Interfering RNA (siRNA) をリポフェクション法を用いて間葉系幹細胞に導入し、各遺伝子の発現抑制が細胞に与える影響を以下の項目に関して検討する。

リアルタイム PCR を用いた siRNA の効果判定 (ターゲット遺伝子のノックダウン効率の検討)

DNA 定量を用いた細胞数のカウント (細胞増殖への影響)

ALP 酵素活性の定量 (ALP 活性定量)

視覚的な石灰化度の確認 (アリザリンレッド染色)

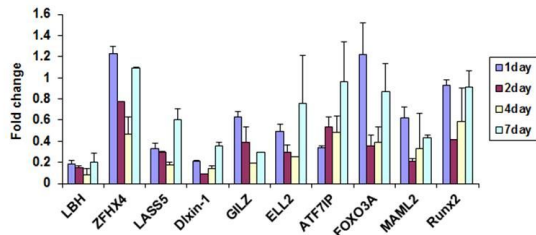
細胞層中のカルシウム量の定量 (カルシウム定量)

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイの結果に研究の方法 (2) で示した条件を適用した結果、hypothetical protein DKFZp566J091 (LBH)、zinc finger homeodomain 4 (ZFHX4)、LAG1 longevity assurance homolog 5 (LASS5)、melanoma antigen family D (DLXIN-1)、Glucocorticoid-induced leucine Zipper (GILZ)、elongation factor RNA polymerase (ELL2)、activating transcription factor 7 interacting protein (ATF7IP)、forkhead boxO3A (FOXO3A)、mastermind-like 2 (MAML2)、以上の合計 9 個の転写因子を選定した。

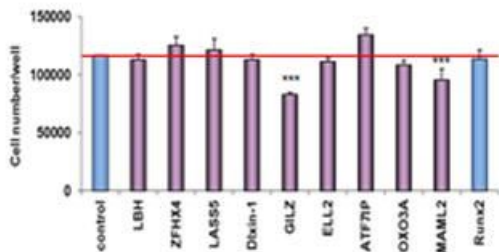
(2) (1)で選定した9個の転写因子に、MSCの骨分化に重要な働きをするとの報告があるRUNX2を加えた、合計10個の転写因子に対するsiRNAを用いて研究の方法(3)の検討を行った。

各転写因子に対して2-3種類のsiRNAを複製してリアルタイム RT-PCRを用いて抑制効率を検討した。最も抑制効率の高いsiRNAを以下の実験に用いた。



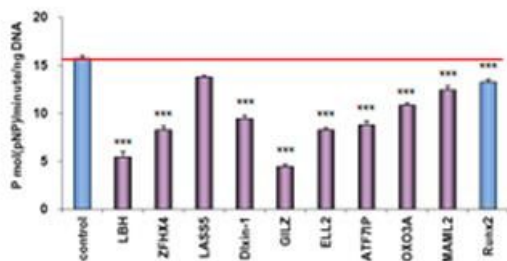
各転写因子に対するsiRNAが細胞増殖に及ぼす影響を検討した。Negative controlと比較して細胞増殖能が抑えられている実験群があるが、細胞増殖がみられない実験群はなかった。本研究で選定した転写因子は細胞の増殖、および生存に必須ではないことが示された。

Cell proliferation



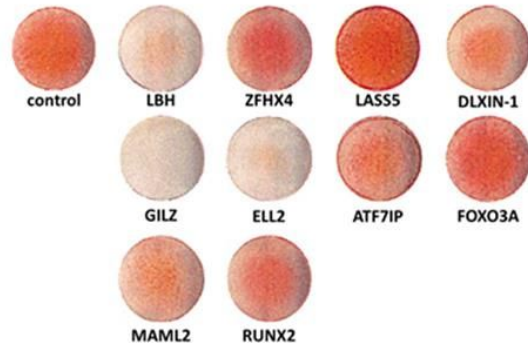
ALP 酵素活性の変化を比較検討した。コントロールと比較してLBH、ZFX4、DLXIN-5、GILZ、ELL2、ATF7IP、FOXO3A、MAML2、RUNX2に対するsiRNAはALP酵素活性を抑制し、LASS5に対するsiRNAはALP酵素活性に影響を及ぼさなかった。

ALP activity



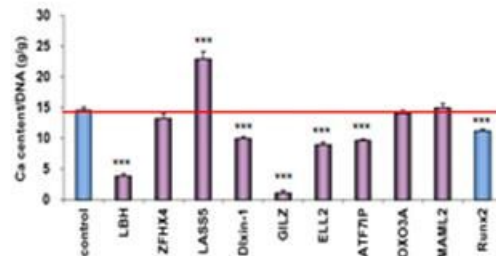
細胞層中のカルシウム沈着をアリザリンレッド染色した。コントロールと比較してLBH、DLXIN-5、GILZ、ELL2、ATF7IP、MAML2、RUNX2に対するsiRNAは染色性が低下し、LASS5に対するsiRNAは染色性が増加した。ZFX4とFOXO3Aに対するsiRNAはコントロールとの差がみられなかった。

Alizarin-red staining



細胞層中のカルシウム沈着量をカルシウム定量法で比較検討した。コントロールと比較してLBH、DLXIN-5、GILZ、ELL2、ATF7IP、RUNX2に対するsiRNAは細胞層中のカルシウム量を減少させ、LASS5に対するsiRNAは細胞層中のカルシウム量を増加させた。ZFX4、FOXO3A、MAML2に対するsiRNAはコントロールとの差がみられなかった。

Calcium content



研究成果(2)の から までの結果をまとめた表を以下に示す。青枠で囲まれたsiRNAによって間葉系幹細胞の石灰化が阻害された、つまり生理的には石灰化に促進的に作用していると考えられる転写因子と、赤枠で囲まれたsiRNAによって間葉系幹細胞の石灰化が促進された、つまり生理的には石灰化に抑制的に作用していると考えられる転写因子に分類可能であった。

Gene	The effect of siRNA			
	Cell proliferation	ALP activity	Calcium content	Alizarin-red staining
LBH	→	↘	↘	↘
ZFH4	→	↘	→	→
DLXIN-1	→	↘	↘	↘
GILZ	↘	↘	↘	↘
ELL2	→	↘	↘	↘
ATF7IP	→	↘	↘	↘
FOXO3A	→	↘	→	→
MAML2	↘	↘	→	↘
LASS5	→	→	↗	↗
RUNX2	→	↘	↘	↘

LBH は胎生期の血管新生と軟骨性骨化を制御する(Conen K., et al. *Dev Biol*, 2009)。GILZ は in vitro では MSC の脂肪分化を抑制し、骨分化を促進する。また in vivo では骨量を増加させる(Pan G., et al. *J Biol Chem*, 2014)。Resveratrol は SIRT1/FOXO3A 複合体を介して RUNX2 promotor を活性化し MSC の骨分化を促進する(Tseng P. C., et al. *J Bone Miner Res*, 2011)。
上記の報告が既にあり、今回選定した転写因子が骨分化マーカーと成り得る信頼性も高いことが推察される。

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) Ishii M, Nakahara T, Ikeuchi S, Nishimura M. -Amyrin induces angiogenesis in vascular endothelial cells through the Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. (査読有), 467, 676-82, 2015.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.085
- (2) Kaku M, Akiba Y, Akiyama K, Akita D, Nishimura M. Cell-based Bone Regeneration for Alveolar Ridge Augmentation --Cell Source, Endogenous Cell Recruitment and Immunomodulatory Function--. *Journal of Prosthodontic Research* (査読有), 59(2), 96-112, 2015.
DOI: 10.1016/j.jprior.2015.02.001

[学会発表](計19件)

- (1) 末廣史雄, 坂井裕大, 藤島 慶, 益崎与泰, 西村正宏. 低侵襲・効率的な顎骨増生を目的とした顎骨骨髄由来間葉系幹細胞培養法の開発. 第33回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会, 2016.1.31.佐賀市文化会館(佐賀県・佐賀市).
- (2) 末廣史雄, 坂井裕大, 下田平直大, 橋

口千琴, 西村正宏. 高膨潤性高分子を用いた超低侵襲な骨膜挙上材の開発. 第45回日本口腔インプラント学会学術大会, 2015.9.23.ホテルグランヴィア岡山 他(岡山県・岡山市).

- (3) 末廣史雄. 骨髄由来幹細胞を用いた顎骨再生医療. 第124回日本補綴歯科学会, 2015.5.30.大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市).
- (4) 末廣史雄, 坂井裕大, 下田平直大, 藤島 慶, 西村正宏. 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨増生メカニズムの解析. 第32回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会, 2015.1.31.長崎ブリックホール(長崎県・長崎市).
- (5) Suehiro F., Sakai Y., Ishii M., Nishimura M. Novel culture method of alveolar bone marrow stromal cells for alveolar ridge augmentation. The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 2014.7.4-5. Sapporo Education and Culture Hall (Sapporo・JAPAN).
- (6) 末廣史雄, 西村正宏, 坂井裕大, 朝比奈泉, 村田比呂司. 顎骨骨髄由来間質細胞を用いた自己細胞移植による顎骨再生医療の開発. 第43回日本口腔インプラント学会学術大会, 2013.9.13-15.福岡国際会議場(福岡県・福岡市).
- (7) 末廣史雄, 西村正宏, 高瀬一馬, 浪越建男, 村田比呂司. 顎骨骨髄由来間質細胞を用いた歯槽骨再生医療のための低血清培養法. 第122回日本補綴歯科学会学術大会, 2013.5.18-19.福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

[図書](計1件)

- (1) 西村正宏. 歯科臨床のための顎骨の再生・増生の科学 インプラント治療成功のベシック. 医学情報社 2015.12.1, 全87ページ.

[その他]

ホームページ:

<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/prostho2/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

末廣 史雄(SUEHIRO FUMIO)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 40524781

(2)研究分担者

西村 正宏(NISHIMURA MASAHIRO)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号: 00294570