

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862067

研究課題名(和文) 骨再生治療を目指したヒト歯槽骨由来骨芽細胞の機能解析

研究課題名(英文) Isolation and characterization of the human alveolar bones osteoblast for bone regeneration therapy

研究代表者

相野 誠 (Makoto, Aino)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：20572811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では未分化骨芽細胞の特性を有するHAOBの培養方法の確立に成功した。このHAOBは未分化骨芽細胞に富んだ細胞集団であり、高い骨芽細胞分化能力を有していた。そしてNEBLはハオBを骨形成能力を有するHAOBを判別するマーカーとなる可能性が示された。今後、HAOBの骨再生能力に関するさらなる検証が必要ではあるが、生体内分化誘導の結果から、HAOBは適切なスキャホールドを用いることにより、歯周疾患をはじめとする骨再生医療の新しい細胞製剤として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Establishment of human osteoblast cultures that retain bone forming capacity is one of the prerequisites for successful bone regeneration therapy. Because osteoblasts harvested from adults exhibit limited growth, the use of immature osteoblasts that can expand ex vivo should greatly facilitate bone regeneration therapy. In this study, we developed immature human osteoblasts isolated from aged alveolar bone (HAOBs). HAOBs obtained after the collagenase digestion of alveolar bones from elderly donors. Then, we assessed osteogenic ability of HAOB transplantation into immunodeficient mice. And, we performed global gene expression analysis to identify functional marker for HAOB. HAOBs, which can differentiate into osteoblasts and have a robust bone-forming ability, were successfully extracted from aged donors. We found that the HAOBs exhibited a higher osteogenic ability compared with those of human mesenchymal stem cells and highly expressed NEBULETTE (NEBL) with osteogenic abilities.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：歯槽骨 再生

1. 研究開始当初の背景

歯周病は国民の多くが罹患する疾患であり、重症化した場合は多量の骨欠損を伴い、歯を喪失する。このような重症化した症例に見られる多量の骨欠損においてヒトの骨の再生量には限界がある。そこで機能的に有効な骨の再生療法が必要とされる。そこで申請者は骨再生療法のためのセルソースとして歯槽骨の骨芽細胞に着目した。

2. 研究の目的

現在臨床では限られた症例にのみ歯周病で破壊された組織の再生が行われている。多量の破壊された組織の再生には適切な細胞、足場材料が必要とされる。その中で細胞に着目した場合、多分化能を有する幹細胞が利用されることが多いが歯周組織への分化の完全な制御は難しい。そこで申請者は安定した細胞を供給のため、分化が決定した未熟な骨芽細胞を用いる事を考えた。すでに申請者は増殖能力のある未熟な骨芽細胞を成人から分離培養することには成功したが、細胞を用いて、より確実な骨組織再生治療を目指すためには得られた細胞のクオリティーを評価する必要がある。そこでこの細胞の詳しい機能解析を行うため本研究の研究計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) 歯槽骨からの HAOB の分離培養

愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科受診患者の中でインフォームドコンセントを行い、実験の趣旨を理解し同意の得られた 50 才以上の年齢のから細胞を採取することを検討する。患者より歯槽骨の採取を行った。サンプルは歯槽骨整形などの歯周外科小手術時や抜歯の際にでる微少な廃棄予定の骨片から回収する。歯槽骨骨片からコラゲナーゼによる連続消化により分離培養を行った。

(2) HAOB の生体外増幅能力の解析

長期培養を行った場合染色体に異常を来す可能性があり、長期培養が可能なサンプルについては染色体を G-band 法や SKY 法を用いて解析した。

(3) HAOB の in vitro における石灰化能力の解析

増幅した HAOB を石灰化誘導培地用いて培養し、アルカリフォスファターゼ活性の解析により骨芽細胞分化能力の解析を行い、アリザリンレッド染色を行うことにより石灰化能力の解析を行った。骨マーカー遺伝子の発現量を解析し骨芽細胞への分化能力を遺伝子学的に詳細に解析した。

4. HAOB の in vivo における骨形成能力の解析。

SCID マウスやヌードマウスといった免疫応答のない動物に移植実験を行。移植片を組織学的に解析し、骨形成能力を解析する。解析には骨基質タンパクの免疫染色を行う免疫組織学的解析と、ヘマトキシリン・エオジン染色による組織形態学的な解析を行い、ヒト細胞が骨組織を形成したかを解析する。生体

内の骨形成能力については確認できていないため、良好な結果が得られない場合、分化誘導を十分に行ってから移植することも考慮している。

5. HAOB のマーカーの探索

細胞製剤として HAOB を品質管理を行うため、脱分化し石灰化能力を喪失した HAOB と喪失していない HAOB の遺伝子を網羅的に解析し、マーカー分子を探索した。

4. 研究成果

1. HAOB の増殖能力と安全性

中高年齢層から骨再生能力を有する細胞製剤を開発するため、研究代表者は未分化骨芽細胞に着目し、比較的容易に入手できる歯槽骨を用いて、中高年齢層の骨組織から未分化骨芽細胞を分離培養する技術開発を行った。コラゲナーゼ消化酵素にて 50 歳代以上から採取した歯槽骨を分解し、遊離してきた細胞をヒト専用培地で培養することで、ヒト未分化骨芽細胞(HAOBs)の採取に成功した(図 1)。

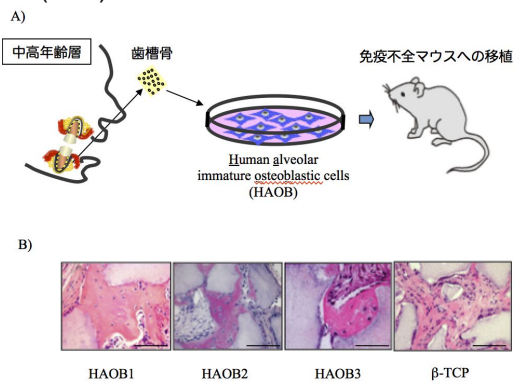


図 1

興味深い事に 50 歳代以上の歯槽骨より採取した HAOB の増殖速度は、20 歳代から採取した細胞と同程度であり、また免疫不全マウスへ移植すると骨細胞を伴う骨組織を形成することから、骨再生能力を有している事が確認された(図 2)。さらに継代数を重ねた HAOB においても染色体に異常は示さず、安全に増幅されていることが判明した。

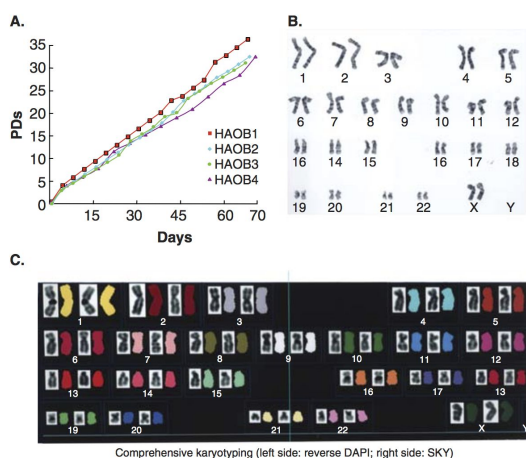


図 2

2. HAOBの骨形成能力

HAOBs が未分化骨芽細胞の特性を有しているかを調べるため、骨形成を誘導する bone morphogenetic protein-2(BMP-2)に対する反応を解析すると、石灰化結節形成能力および骨形成の指標となるランクス 2(RUNX2)、オステリックス(OSTR1X)、オステオカルシン(OCN)、骨シアロタンパク質(BSP)を産生することが確認されました。また HAOB は MSCs とは異なり幹細胞の性質は示さず、より高い骨形成能を示すことが判明した。(図 3)これらの知見から、HAOBs は未分化骨芽細胞の性質を持ち、骨再生治療のための新規の細胞源として利用可能であることが示された。(図 3)

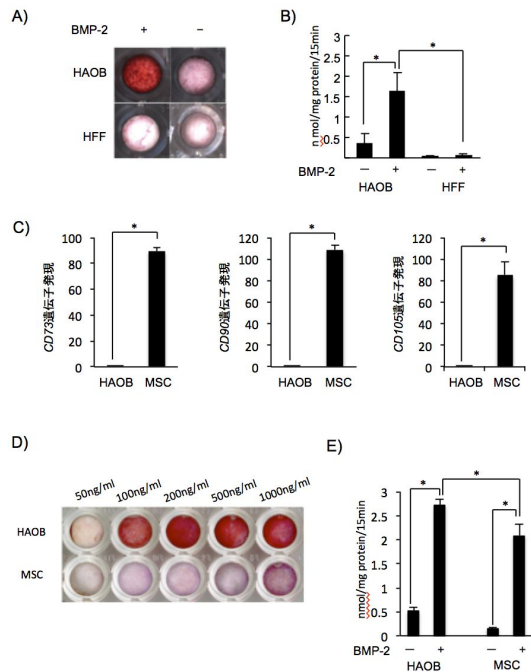
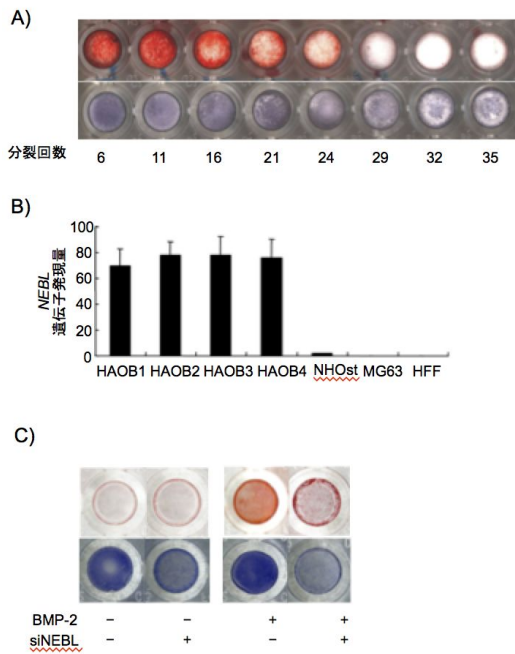


図 3

3. ヒト未分化骨芽細胞製剤と安全性の確立

HAOB を臨床応用するには安全性と信頼性の高い細胞増殖法の確立が必要になります。代表者はこの目的のために、HAOBs の骨形成能を判別、すなわち品質管理に利用可能なマーカー分子を同定することにした。HAOB の骨形成能と細胞分裂回数に着目し解析したところ、分裂回数の増加に伴い骨形成能力の低下が観察された(図 4)。この原因を調べたところ、HAOB 内で Nebulin(NEBL)遺伝子の発現量低下が関わる事を見出した。NEBL は細胞骨格であるアクチンの機能を調節するタンパクで、ある事が報告されている。NEBL の遺伝子発現レベルで HAOB の骨形成能力を判定する事ができ、これまで RUNX2, OSTR1X, OCN, BSP で判定する事の出来なかった増殖期における骨形成能力の判定に有効であることが判明した。また NEBL 発現は HAOBs と比較して石灰化能力の低い正常ヒト骨芽細胞(NHOst)、ヒト骨肉腫細胞(MG63)およびヒト包皮線維芽細胞(HFFs)では殆ど検出されないことも判明した(図 4)。HAOB 内で NEBL の遺伝子発現を siRNA を用い

て抑制すると、アルカリホスファターゼ(ALPase)活性、石灰化結節形成(図 4)、骨マーカー遺伝子群発現を顕著に抑制することから、NEBL は HAOBs における骨形成を判定する信頼性の高い品質管理のマーカーとなり



得ることが判明した。

図 4

以上より HAOB は骨再生医療のためのセルソースとなりうり、HAOB を用いた細胞移植治療の技術開発は、近い将来大規模な骨欠損を持つ歯周病を治療するための新たな再生医療技術として発展する事が期待できる。

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 4 件)

1. Iwamura Y, Hayashi J, Sato T, Sato S, Murakami T, Fujimura T, Sasaki Y, Okada K, Takahashi E, Kikuchi T, Aino M, Noguchi T, Shimazaki Y, Mitani A, Fukuda M. Assessment of oral malodor and tonsillar microbiota after gargling with benzethonium chloride: a pilot randomized clinical study. J Oral Sci, in press, 2015.
2. Mitani A, Takasu H, Horibe T, Furuta H, Nagasaka T, Aino M, Fukuda M, Fujimura T, Mogi M, Noguchi T. Five-year clinical results for treatment of intrabony defects with EMD, guided tissue regeneration and open-flap debridement: a case series. J Periodontal Res, 50(1):123-130,

2015

3. Fujimura T, Mitani A, Fukuda M, Mogi M, Osawa K, Takahashi S, Aino M, Iwamura Y, Miyajima S, Yamamoto H, Noguchi T. Irradiation with a low-level diode laser induces the developmental endothelial locus-1 gene and reduces pro-inflammatory cytokines in epithelial cells. Lasers Med Sci. 2014 May;29(3):987-94.
4. Aino M, Nishida E, Fujieda Y, Orimoto A, Mitani A, Noguchi T, Makino H, Murakami S, Umezawa A, Yoneda T, Saito M. Isolation and characterization of the human immature osteoblast culture system from the alveolar bones of aged donors for bone regeneration therapy. Expert Opin Biol Ther. 14: 1731-1744

〔学会発表〕(計 8件)

1. 菊池毅, 岡部猪一郎, 相野誠, 神谷洋介, 藤村岳樹, 後藤久嗣, 岡田康佑, 黒須康成, 茂木眞希雄, 三谷章雄: 破骨細胞原性に対する IL-15 と RANKL の相乗効果について. 第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (東京), 2015.11.13.
2. 岩村侑樹, 林潤一郎, 佐藤孝至, 村上多恵子, 菊池毅, 藤村岳樹, 高橋枝里, 佐々木康行, 佐藤聡太, 岡田康佑, 相野誠, 野口俊英, 嶋崎義浩, 三谷章雄, 福田光男: 口蓋扁桃細菌叢と口臭との関連-含嗽剤を用いた介入研究-. 第 58 回秋季日本歯周病学会 (浜松), 2015.9.13.
3. 岡部猪一郎, 菊池毅, 武田紘明, 佐々響子, 後藤久嗣, 相野誠, 茂木眞希雄, 三谷章雄: 破骨細胞原性に対する IL-15 と RANKL の相乗効果について. 第 58 回秋季日本歯周病学会 (浜松), 2015.9.13.
4. 岡部猪一郎, 菊池毅, 茂木眞希雄, 相野誠, 三谷章雄: 破骨細胞原性に対する IL-15 と RANKL の相乗効果について. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 (東京), 2015.7.24.
5. 相野誠, 西田英作, 真岡淳之, 青木恒宏, 伊藤正満, 村瀬尚子, 野口俊英, 齋藤正寛, 三谷章雄, ヒト顎骨由来未分化骨芽細胞の骨原性マーカーの探索. 第 9 回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会 (名古屋), 2014.11.23
6. 西田英作, 相野誠, 岩村侑樹, 佐々木康行, 林潤一郎, 三谷章雄: SAA は血

管内皮細胞における接着分子の発現を上昇させる. 第 143 回秋季日本歯科保存学会 (東京), 2015.11.13.

7. 齋藤正寛, 相野誠, 三谷章雄 平成 26 年度春季大会 (大津) 2014.6.19 ヒト歯槽骨由来未分化骨芽細胞の骨原性維持に関わるマーカーの探索
8. M. AINO, A. MITANI, T. NOGUCHI, S. FUKUMOTO, and M. SAITO: Establishment of a system middle-aged human immature osteoblast culture 2014 the International Association for Dental Research (IADR) (cape town), 2014.1.13

〔図書〕(計 3件)

1. 相野誠 他 臨床編 第 5 章. 歯周病の検査と診断. 歯科衛生士講座 歯周病学 第 3 版, (永末書店, 京都) 2016, 82-101.
2. 相野誠 他 未分化骨芽細胞を用いた新規骨再生医療技術の開発: 別冊クインテッセンス口腔外科ハンドマニュアル' 15 (クインテッセンス出版株式会社 東京), 第 1 版 2015,
3. 相野誠 他 161-165 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ, 31-32, 101-102 第 1 版, (医歯薬出版, 東京) 2014

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織
(1) 研究代表者
相野誠 (Makoto Aino)
愛知学院大学歯学部 助教
研究者番号: 20572811