

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293414

研究課題名(和文) 脈管再生能を主体とする顎堤増生治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel orofacial bone regenerative method depending on the angiogenesis and lymphangiogenesis.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルギン酸ナトリウムを用いた新規の細胞/骨補填材複合体の作成法の開発によって、従来法に比べ、より均一で操作性の高い複合体の作成することに成功した。この方法により作成した複合体をマウス頭頂部へ移植することにより、移植部位に骨の新生が認められ、移植体内部には血管のみならず、リンパ管も誘導されることが確認された。さらに、リンパ管新生因子(VEGF-C)はMSCの骨分化を促進し、MSCの遊走を促進する効果を有することを見出した。本研究により、骨形成過程においてリンパ管新生が重要な役割を担うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we succeeded in development of a novel method to construct cell/scaffold complex using the sodium alginate. The uniformity and operativity of the cell/scaffold complex was apparently improved by using this novel method. Next, we constructed the mesenchymal stem cells (MSCs)/scaffold complex using sodium alginate, and then transplanted them on the mice calvariae. At 4 weeks after surgery, newly formed bone was confirmed in the grafts. Furthermore, neovessel and neolymphvessel formation was induced in the grafts area. VEGF-C is known to stimulate lymphangiogenesis, so, we next investigated whether VEGF-C modulates osteogenic differentiation of MSCs. Treatment with VEGF-C significantly induced the osteogenic differentiation of MSCs. In addition, we also revealed that treatment with VEGF-C significantly enhanced MSCs migration. These results indicate that not only angiogenesis but lymphangiogenesis may play an important role in bone formation process.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

顎堤が高度に委縮した患者に対し効果的な補綴治療を行うためには、骨が不足した部位に骨を増生させる必要がある。現在の一般的な骨造成法は自家骨移植による骨造成であるが、採取できる骨量にも限りがある点や、採骨部に知覚麻痺が残る合併症等の問題点も多く、新規の骨増生治療法の開発が望まれている。

近年、自家骨移植に代わる新しい骨増生法として幹細胞を用いた再生医療の研究が始まっている。我々は骨髄中に存在し骨、軟骨、脂肪などに分化する骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells :MSCs) に着目し、MSC をセルソースとした顎骨再生医療研究に取り組んできた。これまで再生医療に用いられる MSC は主に腸骨骨髄由来 MSC や脂肪組織由来 MSC が用いられていたが、我々は顎骨骨髄中に存在する MSC は腸骨骨髄由来 MSC と同等かそれ以上の骨分化能を有することを見出し、顎骨 MSC が顎骨増生を図るための有望なセルソースであることを明らかにしてきた。一方で、顎骨 MSC を骨補填材と均質に混和して大型動物に移植しても骨増生効果にバラツキが大きく、十分な骨形成効果を得られないことが判明してきた。

MSC 移植による顎骨増生効果のバラツキの原因として、①細胞/骨補填材複合体の作成法、および移植法が確立していなかった点。②移植体を移植部位に生着させ、移植細胞がその場に一定期間生存し、骨に分化するためには、移植部位へ十分な酸素と栄養を供給するための脈管 (血管、リンパ管) の誘導が重要となるが、これまで骨増生における脈管系再生についての寄与について十分に考慮されていなかった点が挙げられる。従って、MSC 移植による顎骨増生療法を成功させるためには、上記2点について詳細に検討を行う必要がある。

### 2. 研究の目的

顎骨 MSC 移植による骨増生効果のバラツキを軽減させるため、細胞/骨補填材複合体の作成方法の確立し、骨形成時の脈管系 (血管、リンパ管) 誘導の寄与について評価を行う。さらに、本研究においては脈管の中でもリンパ管に焦点を置き、リンパ管新生因子 (VEGF-C) の骨再生効果に与える影響について詳細に検討を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞/骨補填材複合体の作成法の確立および、骨形成時における脈管 (血管、リンパ管) 新生の寄与：細胞と骨補填材を均一に固める方法の検討のため、①血漿+塩化カルシウム、②市販のフィブリン製剤 (ボルヒール)、③コラーゲンゲル、④アガロースゲル、⑤アルギン酸ナトリウム (アルト) を用いて、細胞/骨補填材複合体を作成し、複合体の均一性、移植時の操作性 (固さ)、マウスへ移植した

際の骨形成能について評価を行う。骨形成の評価は H&E 染色によって行い、骨形成部位の血管およびリンパ管新生はそれぞれ、CD31、LYVE-1 抗体を用いて免疫染色によって評価を行った。

(2) リンパ管新生因子 (VEGF-C) による骨形成促進効果の検討：MSC における VEGF-C および VEGF-A 分泌の評価は angiogenic protein array を用いて測定を行った。VEGF-C が MSC の骨分化に与える影響については、アリザリンレッド染色、アルカリフォスファターゼ活性定量、RUNX2 発現によって評価を行った。骨分化促進の分子メカニズム解析には、ERK 等の細胞内シグナル変化をウエスタンブロットによって評価を行い、変化が認められた因子に関しては選択的阻害剤を用いることによってさらに詳細なメカニズムの解明を行った。

(3) リンパ管新生因子 (VEGF-C) による MSC の細胞遊走促進効果の検討：VEGF-C による MSC の遊走促進効果は transwell chamber を使い、outer chamber に 50 ng/ml の VEGF-C を添加し、遊走した細胞をギムザおよびメイグリュンワルドにて染色し評価を行った。

### 4. 研究成果

(1) 細胞/骨補填材複合体の作成法の確立および、骨形成時における脈管 (血管、リンパ管) 新生の寄与

細胞と骨補填材を均一に固める方法の検討のため、前記方法を用いた。①では採取された血漿の質により固まり方にバラツキが生じることが判明した。また、②では、移植体が固まりすぎるため、移植体内部に細胞の侵入ができず十分な骨再生効果が得られなかった。次に、③では移植に耐えうる十分な強度を保つことができず、④で作成した移植体は、マウスへ移植を行っても骨の形成は認められなかった。⑤を用いる方法は、比較的操作性も高く、細胞/骨補填材の均一性も前述の方法よりも向上することが明らかとなった (図1)。

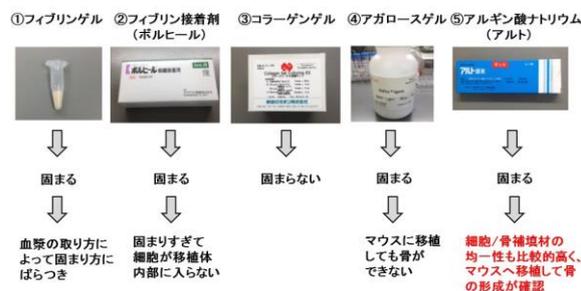


図1) 細胞/骨補填材複合体の作成法の検討

次に、アルギン酸ナトリウムを用いて作成した MSC/骨補填材複合体をマウス頭頂部へ移植を行うことにより、骨補填材周囲に新生骨の形成が確認された。骨形成部位への脈管誘導作用の評価を行ったところ、移植体内部に血管 (矢頭) およびリンパ管 (矢印) が誘

導されていることが明らかとなった (図2)。本研究結果より、細胞/骨補填材複合体の作成にはアルギン酸ナトリウムを用いる方法が効果的であることが明らかとなり、さらにMSC 移植による骨の形成過程には血管のみならずリンパ管も誘導されることが見いだされ、骨再生におけるリンパ管新生の必要性が示唆された。

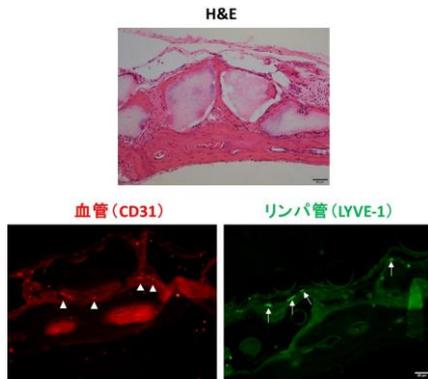


図2) 骨形成部位における血管およびリンパ管の誘導

### (2) リンパ管新生因子 (VEGF-C) による骨形成促進効果の検討

MSC 移植による骨形成過程において新生骨周囲にリンパ管の新生が確認されたことから、骨組織の再生においては血管のみならずリンパ管導入の必要性が示唆された。そこで、MSC においてリンパ管形成の主要な因子である VEGF-C を分泌しているか angiogenic protein array を用いて評価を行ったところ、培養上清中に血管新生因子である VEGF-A の分泌は確認されたが VEGF-C の分泌は認められなかった (図3)。

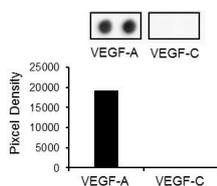


図3) MSCにおけるVEGF-A, VEGF-C発現比較

次に、VEGF-C が MSC に与える効果について評価を行ったところ、MSC の増殖には影響しなかったが、有意な骨分化促進作用を有することが見いだされた (図4)。また、VEGF-C の添加によって、MSC の骨分化に重要な転写因子である RUNX2 発現が増加することも明らかとなった。

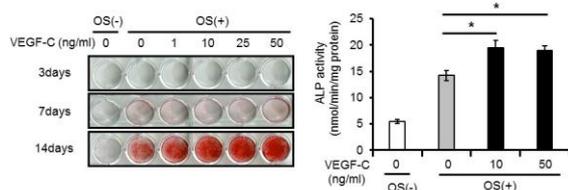


図4) VEGF-C添加によるMSCの骨分化促進作用

VEGF-C 添加による MSC の骨分化促進作用の分子メカニズムの解明のために、VEGF-C 添加による細胞内シグナル変化を評価したところ、VEGF-C の添加によって ERK のリン酸化が有意に亢進することが明らかとなった。さらに、ERK の活性化を抑制することによって VEGF-C による MSC の骨分化促進作用が減弱することから、VEGF-C による骨分化促進は ERK シグナルを介して誘導されることが明らかとなった (図5)。

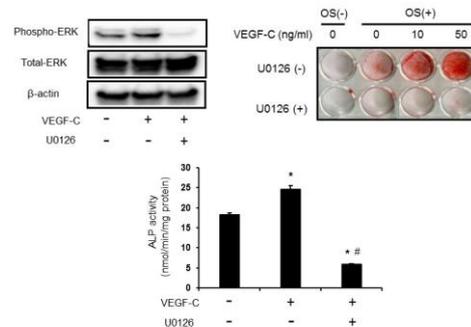


図5) VEGF-Cによる骨分化促進におけるERKシグナルの関与

### (3) リンパ管新生因子 (VEGF-C) による MSC の細胞遊走促進効果の検討

上記の研究により、VEGF-C は MSC において ERK シグナルを活性化することが明らかとなった。ERK シグナルは細胞の増殖、分化、遊走に関与することが知られている。骨再生において、再生部位に効果的に MSC を遊走させることができれば、再生促進につながる。そこで、VEGF-C が MSC の遊走に与える影響について評価を行った。50 ng/ml の VEGF-C の添加によって MSC の遊走が有意に亢進することが示され (図6)、ERK シグナルを阻害することによって VEGF-C によって促進される遊走効果が完全に抑制されることも明らかとなった。以上の結果から、リンパ管新生因子である VEGF-C は MSC の骨分化を促進するのみならず、再生部位に MSC を遊走することによっても骨再生を促進する可能性が示唆された。今後はリンパ管新生促進作用と骨再生効果との相関性に関して動物モデルを用いて評価を行う予定である。

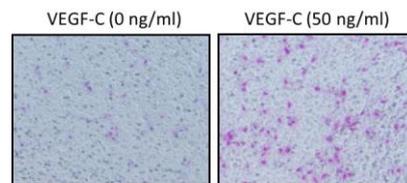


図6) VEGF-CによるMSCの遊走促進作用

## 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 6 件)

- ① Suehiro F, Ishii M, Asahina I, Murata H, Nishimura M. Low-serum culture with

novel medium promotes maxillary/mandibular bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation ability. *Clin Oral Investig.* 2017:(in press) 査読有 doi:10.1007/s00784-017-2073-7.

- ② Murakami J, Nishimura M et al. 6人中6番目. Vascular Endothelial Growth Factor-C Induces Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells through the ERK and RUNX2 Pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017:484:710-718. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.001.
- ③ Ahmed GJ, Nishimura M, et al. 11人中10番目. Regulation and Biological Significance of Formation of Osteoclasts and Foreign Body Giant Cells in an Extraskelatal Implantation Model. *Acta Histochemica et Cytochemica.* 2016: 49:97-107. 査読有 doi: 10.1267/ahc.16007.
- ④ Morishita K, Nishimura M, et al. 10人中9番目. Diversity of multinucleated giant cells by microstructures of hydroxyapatite and plasma components in extraskelatal implantation model. *Acta Biomaterialia.* 2016:39: 180-191. 査読有 doi: 10.1016/j.actbio.2016.05.002.
- ⑤ Ishii M, Nishimura M et al. 4人中4番目.  $\beta$ -Amyrin induces angiogenesis in vascular endothelial cells through the Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015, 467: 676-682. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.085.
- ⑥ Ishii M, Nishimura M et al. 10人中8番目. Vildagliptin stimulates endothelial cell network formation and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 2014:289: 27235-27245. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M114.557835.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 益崎与泰ら、3次元連通気孔を有する炭酸アパタイトブロックの骨新生能の検討 2016. 11. 21、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016. 11. 21 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ② 石井正和ら、 $\beta$ -amyrin による血管新生促進効果の検討、2016. 10. 21、第23回日本歯科医学会総会 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ③ 金田尚子ら、老化に伴う骨組織再生能低下と血管新生との関連性、2016. 10. 22、

第23回日本歯科医学会総会 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

- ④ 末廣史雄ら、顎骨増生を目的とした低侵襲・効率的な顎骨骨髄間質細胞培養法の開発、2016. 09. 04、平成28年度日本補綴歯科学会九州支部、中国・四国支部合同学術大会 熊本県歯科医師会館 (熊本県熊本市)
- ⑤ Sakai Y et al, Is Cellular Distribution Crucial Factor for Bone Augmentation. 2016. 6. 24. 94th General Session & Exhibition of the IADR (Seoul Korea)
- ⑥ 益崎与泰ら、炭酸アパタイト-スタチン複合体の骨欠損部填入による骨形成促進の評価、2016. 3. 27、KIRG30周年記念学術講演会 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑦ 村上寿理ら、VEGF-Cによる骨髄間葉系幹細胞の骨分化促進効果の検討、2016. 3. 17、第15回日本再生医療学会総会 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- ⑧ 石井正和ら、 $\beta$ -amyrin による血管新生促進効果の検討、2016. 3. 17、第15回日本再生医療学会総会 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- ⑨ 末廣史雄ら、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、2016. 1. 31、第33回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会 佐賀市文化会館 (佐賀県佐賀市)
- ⑩ 末廣史雄ら、高膨潤性高分子を用いた超低侵襲な骨膜挙上材の開発、2015. 9. 23、第45回日本口腔インプラント学会学術大会 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)
- ⑪ 末廣史雄ら、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、2015. 1. 31、日本口腔インプラント学会 第32回九州支部学術大会 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)
- ⑫ 坂井裕大ら、骨髄間葉系幹細胞(MSC)を用いた骨増生治療法の検討 ~臨床サイズの骨増生とインプラント適応の可能性評価~、2014. 9. 13、第44回日本口腔インプラント学会学術大会 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
- ⑬ Suehiro F et al, Novel culture method of alveolar bone marrow stromal cells for alveolar ridge augmentation, 2014. 7. 4, Asian Academy of Osseointegration 2014 Sapporo Education and Culture Hall (Hokkaido Sapporo)

[図書] (計 1 件)

- ① 西村正宏、医学情報社、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ーシック—、H27. 12. 1 全87ページ.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：細胞接着因子発現抑制剤  
発明者：石井正和，西村正宏，中原達雄  
権利者：丸善製薬株式会社、鹿児島大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-245727  
出願年月日：2016. 12. 19  
国内外の別： 国内

名称：血管新生促進剤  
発明者：中原 達雄、池内 慎悟，石井 正和、西村 正宏  
権利者：丸善製薬株式会社、鹿児島大学  
種類：特許  
番号：特願 2015-099488  
出願年月日：2015. 5. 14  
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/prostho2/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

小賤 健一郎 (KOSAI Kenichiro)  
鹿児島大学医歯学域医学系・教授  
研究者番号：90301663

### (3) 研究分担者

朝比奈 泉 (ASAHINA Izumi)  
長崎大学医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：30221039