

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462990

研究課題名(和文) 幹細胞のニッチに注目した顎骨再建法の開発

研究課題名(英文) Stem cells for bone regeneration in the jaw bone

研究代表者

鄭 漢忠 (Tei, Kanchu)

北海道大学・歯学研究科・教授

研究者番号：80180066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、顎骨再建法における骨髄由来間葉系幹細胞の有用性を明らかにすることを目指して行った。マウスへの移植実験において骨髄由来間葉系細胞と造血幹細胞の移植は骨形成の誘導をもたらした。移植体における担体の骨組織への置換に寄与することを示した。移植体中の造血幹細胞は、骨髄由来間葉系幹細胞に対して何らかのシグナルを送ることによって骨髄由来間葉系幹細胞からの骨形成を強化していることが示唆された。本研究では、骨髄由来間葉系幹細胞の分化機構に関する重要な細胞生物学的知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to demonstrate the usefulness of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) in jaw bone reconstruction. In transplant experiments in mice, we demonstrated that transplantation of MSCs and HSCs led to the induction of bone formation and contributed to the replacement of carriers in the grafts by bone tissue. It was suggested that HSCs in the graft enhance bone formation from MSCs by sending multiple signals to MSCs. In this study, we were able to obtain important cell biological findings on the mechanism underlying the differentiation of MSCs.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯学 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔悪性腫瘍などの外科処置に伴う骨切除、外傷による骨欠損、あるいは唇顎口蓋裂のような先天性の骨形成不全症などの患者に対して、欠損部の骨組織を再生させることは、患者のQOLを維持する上でも大変重要な治療である。一方、骨組織は生理的に再生能力を有しており、骨欠損の範囲が小さければ自然に骨組織は再生するが、骨欠損の範囲が大きければ大きいほど、骨組織の再生はより困難となるため、広範囲の骨欠損に対しては自家骨移植あるいは人工骨移植が行われる。自家骨移植は、自分の骨を移植するために拒絶反応が出ることはないが、採取する量には限界がある。また、人工骨移植は、年月が経っても自分の骨に置き換わらず、母骨との融合も完全でないことが知られている。

幹細胞を用いた再生医療は顎骨組織の再生においても有用な治療法となる事が期待されている。骨髄中に存在している骨髄間葉系幹細胞は、多分化能を有する体性幹細胞であり、容易に骨芽細胞へ分化することが知られている。また、骨髄穿刺で容易に採取する事ができ、培養技術も確立していることから、骨組織再生のための幹細胞ソースとして極めて有用である。臨床応用への実現化には、適切な移植方法を特定する必要があるため、これまで、細胞工学の観点から分化培養条件・分化誘導因子・キャリアーの性状等を検討した様々な研究が行なわれている。しかし、いずれの研究においても、広範囲にわたる骨欠損部位を取り戻せるような大量で高品質な骨組織を作り出すまでには至っていない。

2. 研究の目的

幹細胞を用いた再生医療は今後もっとも重要な医療技術であり、顎顔面領域においても間葉幹細胞を用いた顎骨再建法への臨床応用が期待されている。しかし、移植した間葉系幹細胞がどのような分化転換を経て骨

芽細胞に分化するかそのメカニズムは明らかにされていない。そこで、本課題では、臨床的に有用な顎骨再建法を確立するために間葉系幹細胞の分化転換機構を明らかにし、臨床応用を前提とした顎骨再建法の基礎理論を構築するため研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞の採取および細胞培養

骨髄由来間葉系幹細胞は、髄穿刺によりシリンジを用い採取した。採取した骨髄液は10%牛胎仔血清、L-グルタミン酸(20mM/ml)、および抗菌薬(ペニシリン 1000U/ml、ストレプトマイシン 0.1mg/ml)を添加したMesenchymal Stem Cell Growth Medium培地(TaKaRa社)を用いて、100cm²の細胞培養皿に播種した。播種1時間後に培養液を交換し浮遊した細胞を除去し、培養プレートに付着しコロニーを形成した細胞に対して継代培養を行い実験に用いた。

造血幹細胞の採取は、メス C3H/He Slc マウスより採取した。回収した骨髄細胞に対して、Anti-Sca-1 MicroBead Kit (Milteny Biotec社)を用いて造血幹細胞を分離した。また、全ての動物実験に関しては北海道大学動物実験委員会の承認を受けた。

(2) *in vitro*における検討

継代後の幹細胞を培養プレートに播種し、各々分化培地に交換し多分化能について比較検討を行った。分化培地にはOsteoblast Differentiation Medium (DS Pharma Biomedical社) Adipocyte Differentiation Medium (DS Pharma Biomedical社)を使用した。分化培地交換3週間後に、骨芽細胞はAlizarin Red染色およびvon Kossa染色を行い、各群の石灰化度を比較した。また、骨形成の指標となる各種遺伝子の発現を比較するため、real time-PCRを行いmRNAの発現量を比較した。脂肪細胞はOil Red O染色を行い、脂肪細胞への分化度を比較した。

(3) *In vivo*における骨組織誘導実験

骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞を骨補填材であり吸収性を有する第三リン酸カルシウム顆粒もしくは多孔性アパタイトに混和した細胞凝集複合体をマウスの頭頂部に人工的に作成した骨欠損部および腹部の皮下に移植を行った。移植 8 週間後にマウスを屠殺し、移植体を EDTA にて脱灰。脱灰後、通法に従い切片を作成、HE 染色を行い形成された新生骨について組織学的に検討した。

4. 研究成果

骨髄由来間葉系幹細胞の初代培養からコロニーを形成した細胞を継代し、継代ごとにおける間葉系幹細胞の表面マーカーの発現について FACS 解析を用いて比較した。継代を重ねるごとに、これらの表面マーカーを発現している細胞数は減少する傾向が認められた。しかし、継代を重ねた骨髄由来間葉系幹細胞に対して造血幹細胞を加え共存培養を行ったところ、これらの表面マーカーの陽性率が上昇した。骨髄由来間葉系幹細胞の生細胞数に対する造血幹細胞の影響を検討したところ、造血幹細胞の添加によって骨髄由来間葉系幹細胞の生細胞数の減少は認められなかった。つまり短期間の造血幹細胞の影響は骨髄由来間葉系幹細胞の生死にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。生細胞数には変化がなく、幹細胞様の性質を持つ細胞の比率が増加したことは、造血幹細胞により継代後の骨髄由来間葉系幹細胞が脱分化することにより、自己複製能を有する幹細胞様細胞が増加した結果と推測された。さらに造血幹細胞添加群の骨髄由来間葉系幹細胞は、各種分化誘導培地で培養することによりそれぞれの分化マーカー遺伝子の発現が克進し、非添加群と比較してより短期間で各系統の細胞に分化することが可能であった。このことから、造血幹細胞を作用させた骨髄由来間葉系幹細胞は一度分化

した細胞、分化の方向性の決定した細胞が再び多分化能を獲得したと考える。

マウスの頭頂部に人工的に作成した骨欠損部に、第三リン酸カルシウム顆粒とともに骨髄由来間葉系幹細胞を移植し、継時的に骨欠損部に再生した骨組織について組織学的に検討を行った。結果、骨髄由来間葉系幹細胞のみを移植した実験群では、1 ヶ月後には移植した担体の周囲にわずかに石灰化した層板状の骨様構造物が確認された。2 ヶ月後には担体の周囲に広範囲な石灰化が亢進した骨様組織が再生していることが確認されたが、第三リン酸カルシウム顆粒は吸収されずに残存したままであった。一方、骨髄由来間葉系幹細胞とともに造血幹細胞を移植した実験群では、1 ヶ月後において第三リン酸カルシウム顆粒の一部が吸収され、その周囲に成熟した骨様組織が再生していた。さらに2 ヶ月後には第三リン酸カルシウム顆粒の大部分はほぼ吸収されており、形成した骨欠損部は再生した新生骨に置き換わっていた。また、間葉系幹細胞のマーカーに対する免疫染色を行ったところ骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞との共存培養を行った実験群では骨髄由来間葉系幹細胞を単独培養した実験群と比較して、細胞表面に幹細胞マーカーを強く発現している細胞が多く存在していることが判明した。以上の結果から、骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞間には何らかの相互作用が存在し、骨髄由来間葉系幹細胞の幹細胞として可塑性を維持している可能性が示唆された。つまり、移植した骨髄由来間葉系幹細胞に存在するある種の細胞が造血幹細胞によるある種のシグナルの影響により未分化な状態、いわゆる多分化能を有する幹細胞様細胞に脱分化され、骨組織再生に必要な細胞成分を供給する役割を担っている可能性が示唆された。

多孔性アパタイトを担体として使用した実験では、間葉系幹細胞のみを移植した実験

群では、多孔性アパタイトの周囲に新生骨の形成が確認された。しかし、新生していた骨組織は層板状構造を呈しており、多孔性アパタイトが吸収されずに残存しており、骨組織のリモデリングを示す骨吸収像と骨添加像は観察されなかった。一方、間葉系幹細胞と造血幹細胞を同時に移植した実験群では、間葉系幹細胞のみを移植した実験群と比較して、有意に多くの骨組織が形成されていた。

骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞の幹細胞凝集複合体を多孔性アパタイトと共に、マウスの皮下に移植し、骨髄由来間葉系幹細胞からの骨細胞への分化過程に置ける細胞動態について検討を行った。移植後骨欠損部に生じる骨組織については、骨髄由来間葉系幹細胞のみ移植した場合は、骨補填材が吸収されずに残存していたのに対し、骨髄由来間葉系幹細胞および造血幹細胞の細胞凝集体を移植すると、移植体中の骨補填材が吸収され、骨欠損部が完全に新生骨に置き換わることが判明した。以上の所見から、幹細胞凝集複合体中の骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞の細比率について検討を行った。

幹細胞凝集複合体中における骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞の細胞比率については、造血幹細胞の細胞数に関係なく骨組織が新生することが判明した。しかし、経時的な骨組織過程について検討したところ、造血幹細胞の細胞数が多いほど骨補填材における吸収と骨添加が活発に行われていた。

細胞培養系の実験を行い、骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞との共存培養において幹細胞凝集複合体中における造血幹細胞の作用が液性因子によるものか、骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞との細胞接触によるものであるか検討した。骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞を直接接触させた共存培養と、骨髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞をメンブレンで隔離して細胞接触を阻害させた場合を比較したところ、直接接触させた場合

では、活発に骨髄由来間葉系幹細胞から骨芽細胞が分化することが確認された。幹細胞凝集複合体中の造血幹細胞は、骨髄由来間葉系幹細胞に対して直接細胞シグナルを送ることによって骨髄由来間葉系幹細胞からの骨形成を増強していることが示めされた。今後は、さらに骨髄由来間葉系幹細胞からの骨形成を増強しているシグナル因子について明らかにする必要が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0件)

[学会発表](計0件)

[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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

6．研究組織

(1)研究代表者

鄭 漢忠 (TEI、Kanchu)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号： 80180066

(2)研究分担者

吉村 善隆 (YOSHIMURA、Yoshitaka)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号： 30230816

菊入 崇 (KIKUJIRI、Takashi)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号： 10322819

(3)連携研究者

なし