

顎骨骨髓間質細胞を用いた顎骨再生に向けて

末廣 史雄

鹿児島大学病院 成人系歯科センター 義歯補綴科

Prospects for alveolar ridge augmentation using transplanted maxillary/mandibular bone marrow stromal cells

Fumio Suchiro

Department of Denture Prosthodontic Restoration, Kagoshima University Hospital

ABSTRACT

The transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) originating from the iliac crest, promotes bone regeneration; this method has already proven useful in clinical studies. We have conducted research aimed at the development of alveolar ridge augmentation, via transplantation of maxillary/mandibular bone marrow stromal cells (MBMSCs). In this article, I report methods for use in cell culture and subsequent evaluation of cells, in the context of alveolar ridge augmentation.

Low-serum STK2 culture conditions might be useful in promoting MBMSC proliferation and osteogenic differentiation. This method requires a lower volume of autologous blood collection for cell expansion, relative to conventional methods, thus reducing the burden on patients.

Eleven transcription factors were identified that were specifically induced during early stages of osteogenic differentiation; subsequently, 11 respective siRNAs for these transcription factors were transfected into MSCs and further examined. Analysis showed that several of the transcription factors suppressed osteogenic differentiation of MSCs; thus, interaction of these factors might promote osteogenic differentiation in MSCs. In particular, factors that suppress osteogenic differentiation might provide negative feedback during attempts to promote osteogenic differentiation. We suspect that ZHX3 may act later than RUNX2 and may be located upstream of Osterix in the MSC osteogenic process. Thus, ZHX3 may be useful as an early osteogenic differentiation marker.

As our research is translational in nature, further research is necessary to bring our research to clinical settings. Therefore, we aim to rapidly perform clinical research and deliver regenerative medicine to patients in need of bone restoration.

Key words: regenerative medicine, maxillary/mandibular bone marrow stromal cells, alveolar ridge augmentation

I. はじめに

1993年に Langer や Vacanti によって提唱された Tissue engineering (組織工学) において、組織再生には細胞・足場・成長因子の3要素が必要であるとされる¹⁾。再生医療は組織工学と同義として用いられることがあるが、上記5要素の中でも特に幹細胞や前駆細胞

を用いた組織再生・機能回復を目指すことに重点が置かれている。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : MSC) をはじめとした組織幹細胞は生体のあらゆる組織に存在するとされる。ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent

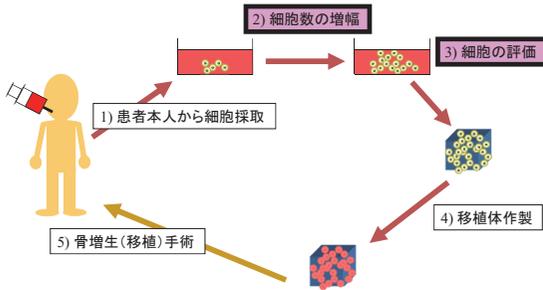


図1. 顎骨増生治療研究のスキーム

本稿では 2) 細胞数の増幅, 3) 細胞の評価について述べるが, 我々の研究グループでは各ステップにおける様々な基礎的研究を実施している。

stem cells : iPS 細胞) と比較して分化が進んでいるため再生対象は限定的であるものの, 腫瘍化のリスクは無く安全であると考えられており, 歯科領域においても既に臨床応用が始まっている^{2,3)}。骨髄 MSC (Bone marrow derived MSC : BMSC) を用いた骨再生研究の歴史は古く数多くの報告が行われており^{4,5)}, 我々の研究グループでも顎骨骨髄間質細胞 (maxillary/mandibular bone marrow stromal cells : MBMSC) を用いた顎骨増生治療の開発を目的とした研究を行っている。図1に我々の研究グループにおける顎骨増生治療のスキームを示す。本稿では私がこれまでにやってきた顎骨増生治療に関する研究, 具体的には細胞数の増幅と移植細胞の評価に関する研究について報告する。

II. 低血清培地での MBMSC 培養方法の開発

細胞移植治療において, 免疫反応や感染等の危険性が少ない自己細胞移植の有効性は高い。また, 細胞の培養には血清の添加が一般的であるが, 安全性確保の観点から動物由来血清の使用は困難である。自己血清を用いれば安全性は確保されるものの, 大量の自己血が必要であり, 健康な成人であれば問題なくとも老人や若年者にとっては大きな侵襲となる。さらに, 血清中には未知の成分を含む数多くのたんぱく質が存在するため, 使用する血清のロットにより細胞に及ぼす影響が異なり, 細胞の品質管理が困難となる。これらの課題を克服するために無血清培地の開発が行われ, 異種由来成分を含まない製品が多数販売されている。

我々は無血清培地 STK[®] シリーズを用いて MBMSC の培養方法を検討し報告した⁶⁾。STK 培地は腸骨骨髄あるいは滑膜由来の MSC を対象として開発されており, STK 培地を用いて MBMSC を通常の培養皿上で培養すると, 細胞の接着はみられるものの, 培養を続

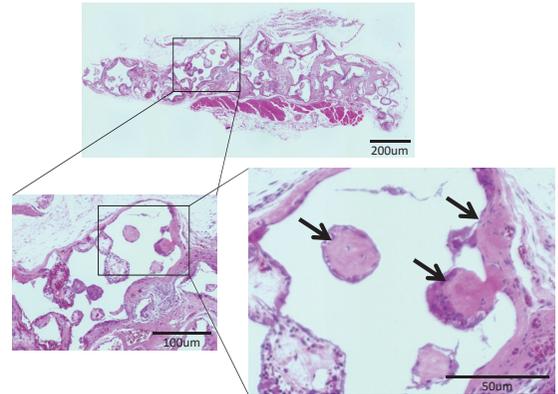


図2. *in vivo* における骨形成能

低血清法で培養した MBMSC を SCID マウス背部皮下に移植し, 11週後の組織切片。矢印の部位に骨形成が認められる。

けるに従い細胞が凝集・剥離してしまい, 細胞数を増幅させることが困難であった。幹細胞用, あるいは無血清培地用等の様々なコーティングが施された培養皿上でも同様の結果を示したが, 血清を1%添加して低血清培養とすることで, 10%血清含有 α -MEM (従来法) と同等の結果を得ることができた。この低血清培養法で培養した MBMSC の細胞表面抗原を flow cytometry にて解析したところ, MSC のポジティブマーカーとされる CD73, CD90, CD105 は陽性であり, ネガティブマーカーとされる CD14, CD34, CD45, HLA-DR は陰性であった。この結果は従来法で培養した MBMSC でも同様の傾向を示し, 培養法の違いによる細胞表面抗原への影響はみられなかった。一方で, 低血清培養法は従来法と比較して有意に MBMSC の増殖能を促進した。細胞株間によって差はあるが, 最終的に得られた細胞数は8倍から262倍に及んだ。低血清培養法は MBMSC の骨分化に関しても促進し, Alkaline phosphatase (ALP) 活性や骨分化関連遺伝子発現の亢進, alizarin-red による染色の増強を示した。Western blot 法にて, 低血清培養法による MBMSC の骨分化促進は ERK のリン酸化が関わっていることも示唆された。また, 低血清培養した MBMSC を SCID マウスの背部皮下に移植し, *in vivo* においても骨形成能を持つことを確認した (図2)。以上より, 低血清培養法を用いる事で患者からの採血量を減らすだけでなく, 細胞培養期間を短縮でき, 骨分化能を促進できることが示唆された。

Ⅲ. BMSC の骨分化能評価方法の開発

MSC の多分化能を確認するには、骨・軟骨・脂肪への分化誘導を行った後に各種染色や酵素活性を測定する方法が主流であるが、2～4週間程度の期間が必要となる。我々はより早期に MSC の骨分化能を確認するために、MSC の骨分化予知マーカーとして骨分化誘導開始直後に発現が上昇する転写因子11種類を、DNA マイクロアレイを用いて選定した。各転写因子に対する siRNA が細胞増殖、Alkaline phosphatase (ALP) の mRNA 発現および ALP 活性、Alizarin-red 染色、細胞層中のカルシウム量に及ぼした影響の一覧を図3に示す。

転写因子	各転写因子に対するsiRNAの作用				
	細胞増殖	ALP mRNA 発現レベル	ALP 活性	Alizarin-red 染色	細胞層中のカルシウム量
BARD1	→	→	→	→	→
RAD51	→	→	→	→	→
TCEB2	→	→	→	→	→
ZHX3	→	→	→	→	→
KLF5	→	→	→	→	→
PRRX2	→	→	→	→	→
ATBF1	→	→	→	→	→
SP110	→	→	→	→	→
KLF6	←	←	←	←	←
ZBTB7A	→	→	→	→	→
SSBP3	→	→	→	→	→
RUNX2	→	→	→	→	→

図3. siRNA の作用

各転写因子に対する siRNA を作用させることで細胞に及ぼした影響の一覧を示す。下向き矢印は抑制的に、上向き矢印は促進的に作用した。RUNX2は既知の転写因子でありコントロールとして示す。

骨分化初期に誘導される転写因子には骨分化に促進的に作用するものと抑制的に作用するものが存在し、抑制的に作用する転写因子が存在することにより、骨分化の初期からネガティブフィードバック機構が作動していることが示唆された。その中でも zinc fingers and homeoboxes 3 (ZHX3) は骨分化誘導24時間後に発現亢進のピークを迎え、48時間後には発現量が低下し、その後28日後まで大きな変化は示さなかった。一方で脂肪分化誘導や軟骨分化誘導では発現の変化はみられなかった。ZHX3に対する siRNA を作用させることで細胞増殖に対する若干の抑制効果がみられたが、細胞の生存に必須の転写因子ではない事が明らかとなった。ZHX3に対する siRNA は既知の骨分化関連転写因子 RUNX2の発現には影響を及ぼさなかった一方で Osterix の発現を抑制し、ALP 活性や細胞層中のカルシウム沈着を抑制した。このことから ZHX3は RUNX2の下流および Osterix の上流で MSC の骨分化

に影響を与えており、骨分化能評価マーカーとして有用であることが示唆された⁷⁾。

Ⅳ. 今後の展望

ES 細胞や iPS 細胞が発見されたことで再生医学は飛躍的な発展を遂げ、再生医療が現実のものとなることに多くの期待が寄せられるようになった。再生医療を広く国民に普及させるためには費用対効果の検証や、安全性、再生医療製品としての品質の均質化など依然として多くの課題が残されていたが、再生医療製品がより早く実用化され、再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようになることを目的として、2014年11月25日に「再生医療等安全性確保法」と「薬事法改正法」が施行された。本法律の施行前は施設内に細胞培養加工設備が必要であったが、法律施行後は細胞の培養・加工は基準を満たした細胞培養加工施設に外部委託が可能となり、施設の問題は解決されたと思われる。

本稿では我々のグループが行ってきた研究の中で移植細胞の増幅法と骨分化能評価法(品質評価法)について抜粋して述べてきたが、これらを臨床に用いるためにはさらなる研究が必要である。顎骨骨髓は腸骨骨髓と比較して採取量が限られ、部位特異性が高いため、一定の性能を持つ MBMSC を採取するためには、より最適化された採取法あるいは評価法を見出さなければならない。骨髓中にはヘテロな細胞集団が存在するため、骨分化能の高い細胞だけでなく、骨分化能の低い細胞も採取される。骨分化能の高い細胞はⅢで述べたように一部の転写因子発現を調べることで選別できるかもしれない。一方で、in vitro では骨分化能の低い株を用いても in vivo では骨がよく形成されることも分かっており⁸⁾、in vivo で骨が形成されやすい状況が何によるものなのかは今後研究を進めていく予定である。

我々が行っている研究は正に translational research であり、基礎的研究の結果を組み合わせ、再生医療等安全性確保法のもと臨床研究を実施し、一日でも早く国民に再生医療を届けることを目標としている。最終的には、高度な設備の整った医療機関のみで実施可能な治療法ではなく、一般的な開業医においても細胞培養・加工施設で製作した、品質の保証された移植体をデリバリーすることで実施可能な骨再生医療を目標に研究を推進していく予定である。

謝辞

本研究は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科口腔顎顔面補綴学分野西村正宏教授のご指導の下に遂行できたことを厚くお礼申し上げます。

- 1) Langer R, Vacanti JP. : Tissue engineering, *Science*, 260, 920-926, 1993.
- 2) Kaigler D, Pagni G, Park CH, Braun TM, Holman LA, Yi E, Tarle SA, Bartel RL, Giannobile WV. : Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial, *Cell transplantation*, 22, 767-777, 2013.
- 3) Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Umemura E, Hara K, Nagasaka T, Abe A, Baba S, Furuichi Y, Izumi Y, Klein OD, Wakabayashi T. : Injectable bone tissue engineering using expanded mesenchymal stem cells, *Stem cells*, 31, 572-580, 2013.
- 4) Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. : Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, *Journal of embryology and experimental morphology*, 16, 381-390, 1966.
- 5) Deans RJ, Moseley AB. : Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses, *Experimental hematology*, 28, 875-884, 2000.
- 6) 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, *Clinical oral investigations*, 21, 2709-2719, 2017.
- 7) Suehiro F, Nishimura M, Kawamoto T, Kanawa M, Yoshizawa Y, Murata H, Kato Y. : Impact of zinc fingers and homeoboxes 3 on the regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation, *Stem cells and development*, 20, 1539-1547, 2011.
- 8) 西村正宏, 末廣史雄, 黒木唯文, 坂井裕大, 朝比奈泉 : 骨増生に向けた顎骨骨髓液採取と間質細胞培養法, *日本口腔インプラント学会誌*, 26, 668-675, 2013.