

論文内容要旨

未分化 MSCs が破骨細胞前駆細胞の
分化・増殖・走化に及ぼす影響

主指導教員：谷本 幸太郎 教授

(応用生命科学部門 歯科矯正学)

副指導教員：二川 浩樹 教授

(統合健康科学部門 口腔生物学)

副指導教員：鷺見 圭輔 助教

(応用生命科学部門 歯科矯正学)

阿部 崇晴

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

唇顎口蓋裂患者の顎裂骨欠損部に対して、一般に自家腸骨移植が広く行われ、良好な成績が得られている。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は、若年の患者にとって大きな負担となり、また顎裂が大きい場合、腸骨からの骨採取量が不十分であることや、複数回手術が必要になることなど、様々な問題を抱えている。このような背景から、未分化間葉系幹細胞(MSCs)と自家腸骨にかわる移植体を用いた、低侵襲の骨再生治療への応用が期待されている。

我々は、これまでにビーグル犬顎裂モデルを用いて、自家腸骨より採取したMSCsの移植実験を行い、骨再生の誘導を確認した。その実験において、MSCsを移植した場合、担体として用いたCAPの吸収が、対照側と比較して速やかであることが明らかになった。顎裂部再生骨において、歯の萌出や、矯正歯科治療による歯の移動を必要とする事が多いため、移植された担体は速やかに吸収され、それに続く骨再生が重要となる。すなわち、移植された担体は骨再生過程において、担体は破骨細胞により吸収された後、続いて骨芽細胞により骨に置換されるという骨再生プロセスを達成する必要がある。担体の吸収と骨再生の関連性の観点から論じられた論文は少なく、移植した未分化MSCsの生体内の破骨細胞への影響については不明な点が多い。そこで本研究では、MSCsが破骨細胞前駆細胞の分化および走化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

細胞はBalb/cマウス骨髄由来MSCsとBalb/cマウス白血病単球由来、破骨細胞前駆細胞様細胞であるRAW264を用い、間接共培養下での分化および走化に及ぼす影響について検証した。

1. MSCsがRAW264の増殖能に及ぼす影響について、タイムラプス撮影およびMTS assayにより経時的な生細胞数の変化について比較検討を行った。
MSCsが破骨細胞分化に及ぼす影響について、未分化MSCsにおける破骨細胞分化関連遺伝子発現の経時的変化を、Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)、Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)、RANKLのデコイ受容体であるOsteoprotegerin (OPG)、血管内皮細胞増殖因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF)について定量PCRにより、遺伝子発現の比較を行った。また、RANKL添加時における破骨細胞数の共培養による影響について検討し、さらにRAW264の破骨細胞分化関連遺伝子に対する共培養による影響を、RANKLの受容体であるreceptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK)、M-CSFの受容体であるcolony stimulating factor 1 receptor (CSF1R)、破骨細胞形成転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B)、nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic1 (NFATc1)について、またMSCsの共培養における破骨細胞分化関連遺伝子発現の経時的変化について定量PCRにより比較検討を行った。
2. MSCsがRAW264の走化性に及ぼす影響についての実験(*in vitro*)では、細胞走化因子であるCC Chemokine Ligand 2 (CCL2)およびその受容体であるCC chemokine receptor 2 (CCR2)遺伝子発現の共培養による影響について定量PCRを用い比較検討を行った。また、Boyden Chamber Assayにより、RAW264の走化性に対するCCL2を介したMSCsとの共培養の影響について比較を行った。
3. MSCsがRAW264の走化性に及ぼす影響についての実験(*in vivo*)では、Balb/cヌードマウスの頭蓋骨骨欠損モデルを作製し、MSCs移植が、RAW264の生体内における動態にどのように

影響を及ぼすか検証した。

これらの実験結果、以下のことが明らかとなった。

1. タイムラプス撮影およびMTS assayにより、MSCsとの共培養におけるRAW 264の生細胞数は有意な増加を認めた。
未分化MSCsにおいて、RANKL、M-CSFおよびVEGF遺伝子発現は6日、8日目をピークとし、その後抑制が認められたのに対し、OPG遺伝子発現は4日目から10日目にかけて有意に亢進した。また、単独培養群と比較し、RANKL添加時のRAW 264の成熟破骨細胞への分化はMSCsとの共培養により有意に抑制された。RAW 264におけるRANK、CSF1R、NFkBおよびNFATc1遺伝子発現はMSCsとの共培養により、単独培養群と比較して、有意に抑制された。共培養時におけるMSCsのRANKL、M-CSFおよびVEGFの経時的遺伝子発現変化は、経時的に有意な差が認められなかったのに対し、OPGの遺伝子発現は、経時的に有意に抑制された。
2. MSCsにおけるCCL2遺伝子発現およびRAW264におけるCCR2遺伝子発現は共培養により、単独培養と比較して、有意に亢進した。また、RAW264走化細胞数はMSCsとの共培養により、単独培養群と比較して、有意に増加した。一方、抗CCR2抗体を添加すると、RAW264走化細胞数は共培養群と比較して、有意に減少した。このことから、RAW264の走化性にMSCsの発現するCCL2が関与していることが示唆された。
3. *in vivo*における実験では、骨欠損部に移植したMSCsは移植15日後においては移植1日後のものと比較して、蛍光強度は約30%に減少した。尾静脈より移植したRAW264はMSCs存在下で骨欠損部へより高度な集積を認めた。

以上のことより、MSCsは共培養において破骨細胞への分化を抑制するとともに、破骨細胞前駆細胞の増殖能および走化性を亢進することが明らかとなり、骨移植時におけるMSCsの破骨細胞への影響が示唆された。今後MSCsによる担体の吸収を最適に調節することにより、骨再生効率を高めた治療を確立し、CLP患者負担の少ない再生医療が達成される可能性が示唆された。