

令和元年6月7日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19774

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の抗炎症性マクロファージ誘導機構を応用した難治性顎骨壊死新規治療戦略

研究課題名(英文) Establishment of novel therapy for intractable necrosis of the jaw with mesenchymal stem cells-induced anti-inflammatory macrophages

研究代表者

石崎 明 (ISHISAKI, Akira)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：20356439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、M2-M をex vivoで簡便且つ大量に増殖させる革新的な細胞培養技術の確立と、それを応用したBRONJ根治療法を可能にする全く新しい細胞治療の確立のための分子基盤の確立を目的とした。

これまでに我々は、骨髄由来血球系細胞(Linage (+))細胞と間葉系幹細胞MSCとの非接触性共培養と接触性共培養により、IL-10の発現レベルが段階的に上昇することを明らかとしている。また我々は、このM2-M への段階的な分極化を誘導する液性因子と接着性因子をそれぞれ同定した。現在、この研究成果を利用して、BRONJ根治療法を可能にする全く新しい細胞治療の確立を目指した研究を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビスホスホネートbisphosphonate (BP)は、悪性腫瘍の形成に伴う高カルシウム血症、腫瘍の骨転移、ならびに骨粗鬆症において、破骨細胞の骨吸収を抑制することによりそれらの症状を改善する臨床的に有効性の高い薬剤である。しかし、近年、BP系薬剤関連顎骨壊死(bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ))が高い頻度で発生している。今回の我々の研究成果により、BRONJの新規治療戦略確立のための基盤が確立された。

研究成果の概要(英文)： We tried to establish research basis for novel therapy against BRONJ with mesenchymal stem cells (MSCs)-induced anti-inflammatory macrophages.

We found that expression level of IL-10 was up-regulated in bone marrow-derived lineage-positive (Lin (+)) blood cells co-cultured with MSCs. We also found that MSCs-derived liquid factor and cell-cell adhesion between MSCs and Lin (+) blood cells synergistically increased IL-10 expression in the Lin (+) blood cells. We keep developing our research results into the establishment of novel therapy against for BRONJ.

研究分野：生化学

キーワード：ビスホスホネート BRONJ 間葉系幹細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ビスホスホネート bisphosphonate (BP) は、悪性腫瘍の形成に伴う高カルシウム血症、腫瘍の骨転移、ならびに骨粗鬆症において、破骨細胞の骨吸収を抑制することによりそれらの症状を改善する臨床的に有効性の高い薬剤である。しかし、近年、BP 系薬剤関連顎骨壊死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) が 2003 年に最初に報告されて以来、注射剤では 0.8~12%、経口剤では 0.001% という高い頻度で発生している (米国口腔外科学会報告, J Oral Maxillofac Surg, 2007)。とくにゾレドロン酸 zoledronic acid (ZA) をはじめとする窒素含有 BP 製剤の注射での長期投与では、BRONJ の発症率はさらに高まり、ZA を 1~4 年経静脈的に投与し続けた場合では実に 20% 以上の発症率があるとの報告もある (Kühl *et al*, Oral Oncol, 2012)。BRONJ の発生機序については、BP による骨代謝回転の著しい抑制あるいは血管新生の抑制による骨芽細胞や骨細胞のアポトーシスによるものなどの諸説がある (国際骨粗鬆症協会ワーキンググループ報告, 2007)。

(2) (1) で述べた BP 製剤自身によるリスクファクターに加え、顎骨への侵襲的な歯科治療や歯周病などの炎症性疾患あるいは口腔内細菌による感染などの局所的なリスクファクターと、糖尿病や肥満などの全身的なリスクファクターが複雑に関係して発症するものと考えられている (Yoneda *et al*, J Bone Miner Metab, 2010) が、その発生機序の詳細は細胞レベルや分子生物学レベルで明らかとされていない。このため、BRONJ に対する治療法には局所洗浄や抗菌薬の塗布による保存的治療法、壊死骨の搔爬、ならびに顎骨の辺縁切除や区域切除が選択されるのみであり、根治的な治療方法は確立されていない。現在の我が国の超高齢化社会への変遷の状況下では、国民全体における骨粗鬆症や癌の発症率は年々上昇しており、BP を投与する機会は増加する一方であることから、その副作用としての BRONJ に対する有効な治療法の確立が急務である。興味深いことに最近、Zhang らは、マウスを用いた BRONJ モデルにより、その患部では炎症性マクロファージ (M1-M $\Phi$ ) の数が抗炎症性 (治癒促進性) マクロファージ (M2-M $\Phi$ ) の数よりも多く、また M2-M $\Phi$  を腹腔内投与することにより、BRONJ の発症を抑制しうることを発見した (Zhang *et al*, Clin Cancer Res, 2013)。この研究成果の医療応用のために *ex vivo* で M2-M $\phi$  を大量に調製するには、M2-M $\phi$  分化を誘導するサイトカイン (interleukin (IL)-4 や IL-13) を骨髄から採取した単球/マクロファージ系細胞集団に大量投与することが必要であり、サイトカインを用意するためのコストが高むうえに骨髄細胞を大量に外科的に採取する必要がある。M2-M $\phi$  の医療応用を一般化するためには *ex vivo* で非侵襲的且つ低コストで実現しうる M2-M $\phi$  大量調製法の開発が急務であるが、未だ実現されていない。

### 2. 研究の目的

(1) これまでに我々は、骨髄由来の間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) と lineage marker 陽性の血球系細胞 (Lin (+) 細胞) とを低酸素環境下 (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) で共培養すると Lin (+) 細胞中の M2-M $\Phi$  数が選択的に増加することを見出した。加えて、トランスウェルを用いた非接触性共培養をした場合と、接触性共培養をした場合とでは、Lin (+) 細胞における M2-M $\Phi$  マーカーとしての IL-10 の発現が段階的に上昇することを見出した (データ示さず)。すなわち、MSC による Lin (+) 細胞における M2-M $\Phi$  への誘導においては、MSC 由来の液性成分に加え、MSC と Lin (+) 細胞との間での接着分子等を介した細胞間相互作用が働いていることが示唆されている。本研究では、① M2-M $\Phi$  前駆細胞の増殖や分化を誘導する液性因子ならびに細胞表面上の非液性因子 (接着因子) を同定すると共に、これらを応用して M2-M $\Phi$  を *ex vivo* で簡便且つ大量に調製しうる革新的な細胞培養技術を確立すること、② この M2-M $\Phi$  の *ex vivo* 大量培養系を利用して、BRONJ の根治を目指した全く新しい細胞治療確立のための分子基盤を樹立すること、さらには、③ 外科的な骨髄穿刺などの侵襲を必要とせず、末梢血中のわずかな M2-M $\phi$  前駆細胞から低コストで M2-M $\phi$  の大量調製が可能となる技術開発のための研究基盤を整えることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養法: 2~3 週齢の tdTomato (赤色蛍光) 強発現 TG マウスあるいは EGFP (緑色蛍光) 強発現 TG マウスの脛骨骨髄より骨髄組織を採取後、MSC 専用培地で低酸素環境下 (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) にて骨髄由来細胞を培養した。また、必要に応じ、骨髄細胞採取後に MACS 磁気細胞セパレーター装置を用いて、Lin (+) 細胞とその他の細胞 (MSC) を分離した後、それぞれの細胞を単独培養あるいはトランスウェルを用いた非接触性共培養ならびに接触性共培養を実施した。

(2) Lin (+) 細胞の M2-M $\phi$  分極化の確認法: qRT-PCR 法や免疫蛍光的手法を用いて M2-M $\phi$  マーカーとしての CD206 や IL-10 の発現を調査した。

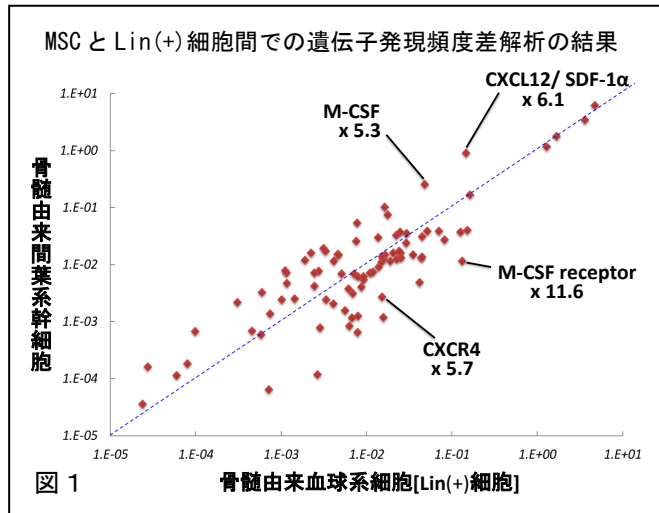
(3) mRNA レベルでの網羅的発現頻度差解析法: 骨髄由来 Lin (+) 細胞と MSC それぞれの細胞で発現する液性因子ならびに接着因子についての調査をプライマーアレイにより実施した。

(4) タンパク質レベルでの網羅的発現頻度差解析法: 骨髄由来 Lin (+) 細胞と MSC それぞれの細胞で発現する液性因子ならびに接着因子についての調査を LC-MS/MS により実施した。

(5)細胞増殖の解析法：細胞代謝活性を指標として、WST-1 法あるいは alamarBlue 法を用いて調査した。

#### 4. 研究成果

(1) 強蛍光発現 TG マウスの骨髄組織を採取し、MACS 磁気細胞セパレーター装置を用いて、Lin (+)細胞とその他の細胞 (MSC) とに分離してそれぞれの細胞における液性因子ならびに接着因子の遺伝子発現頻度差についてプライマーアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、図1に示すように、MSC と Lin (+)細胞では、その発現頻度に差を示すものが多く認められた。とくに、各細胞間で5倍以上の発現頻度差が認められたものの中に M-CSF (Lin (+)細胞に比べて MSC で 5.3 倍の発現量を示す)、CXCL12/SDF-1 (Lin (+)細胞に比べて MSC で 6.1 倍の発現量を示す)、M-CSF 受容体 (MSC に比べて Lin (+)細胞で 11.6 倍の発現量を示す)、ならびに CXCL12/SDF-1 受容体である CXCR4 (MSC に比べて Lin (+)細胞で 5.7 倍の発現量を示す) が認められた。これらの結果より、MSC より分泌された液性因子としての M-CSF と CXCL12/SDF-1 は、Lin (+)細胞上のこれらの液性因子受容体に作用しうることが示唆された。

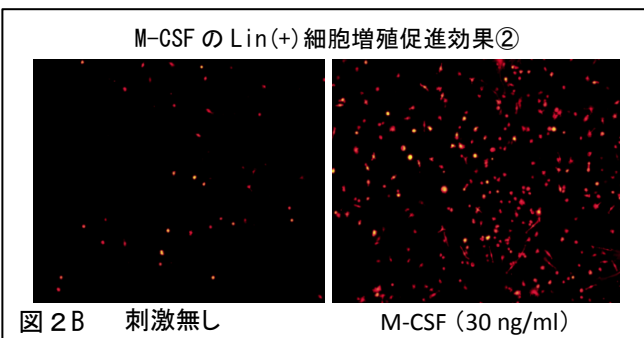
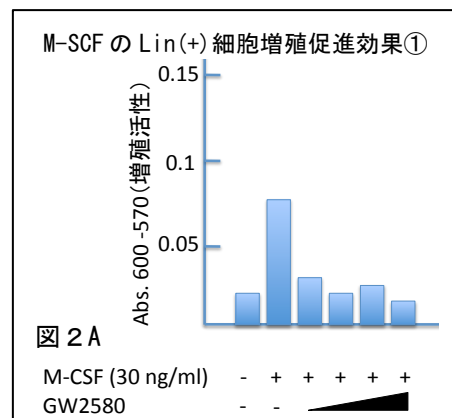


(2) 強蛍光発現 TG マウスの骨髄組織を採取し、MACS 磁気細胞セパレーター装置を用いて、Lin (+)細胞とその他の細胞 (MSC) とに分離した後、それぞれの細胞の培養上清中に存在する液性因子 (タンパク質) について LC-MS/MS 装置を用いて網羅的に解析した。その結果、表 1 に示すごとく、M-CSF と SDF-1 が MSC の培養上清中に存在することが確認された。一方、Lin (+)細胞の培養上清中にはこれらの液性因子は確認されなかったが、granulin/PC cell-derived factor や macrophage migration inhibitory factor などの存在が判明した。

表1 骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC)ならびに骨髄由来血球系細胞 [Lin (+)細胞]の培養上清中のタンパク質をLC-MS/MS装置にて網羅的に検出した結果

|   | MS                  | function   |
|---|---------------------|--|
| <b>間葉系幹細胞</b>                                       |                     |  |
| Connective tissue growth factor (CTGF)              | MS=321              | fibroblast differentiation                                 |
| Inhibin beta A chain                                | MS=245              |  |
| Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)        | MS=165              |  |
| Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)               | MS= 92              |  |
| Pigment epithelium-derived factor (SDF-3)           | MS=335              |  |
| C-C motif chemokine 9 (CCL9)                        | MS=44               |  |
| others:   |                     |  |
| Insulin-like growth factor-binding protein 4, 5 & 7 | MS= 106, 208 & 1060 | cell adhesion  |
| LG3 fragment from Perlecan                          | MS=698              | anti-angiogenesis, anti-apoptosis (MSC)                    |
| <b>Lin (+)細胞</b>                                    |                     |  |
| Granulins / PC cell-derived factor                  | MS=101              | inflammation, wound repair, and tissue remodeling AA=52~56 |
| Macrophage migration inhibitory factor              | MS=128              |  |
| others: Galectin-3                                  | MS=191              |  |
| Apolipoprotein E                                    | MS=157              |  |

(3) Lin (+)細胞はこの細胞単独で培養するよりも MSC と共培養する方が、増殖効率が著しく上昇すること (データ示さず) から、MSC から分泌される液性因子が Lin (+)細胞に対する増殖促進効果を有することが予測された。そこで、(1)と(2)で確認された M-CSF ならびに SDF-1 を Lin (+)細胞単独培養系に投与し、この細胞の増殖活性がどのように変化するかを調査した。図 2A ならびに図 2B で示すごとく、Lin (+)細胞に M-CSF を 30 ng/mL で与えたところ、この細胞の増殖活性が増強



されることが判明した。また、この M-CSF による増殖活性誘導効果は、M-CSF 受容体阻害剤の投与により抑制されることが明らかとされた。また、図 3 で示すごとく、SDF-1 による刺激でも Lin (+)細胞における増殖活性は増強された。

(4) 以前に我々は、Lin(+)細胞の単独培養ではこの細胞のM2-MΦへの分極化すなわちM2-MΦマーカーとしてのCD206の発現は誘導されないが、MSCとの共培養ではCD206の発現が顕著に誘導されることを明らかとしていた。また、M2-MΦが分泌する免疫抑制因子であるIL-10のLin(+)細胞における発現は、トランスウェルを用いたMSCとの非接触性共培養では上昇しないが、MSCとの接触性共培養では上昇することを明らかとしていた(データ示さず)。また、骨髓から採取した直後のLin(+)細胞にM-CSFを与えて単独培養しても、前述のごとく増殖は促進されるが、M2-MΦへの分極化は誘導されないことが明らかとなった(データ示さず)。これらの結果から、MSCとの接触性共培養系にて誘導されるLin(+)細胞のM2-MΦ分極化には、MSCとLin(+)細胞との細胞接着が重要な働きを有するものと予測された。そこで、MSCで発現が確認された細胞接着因子のうち、その発現量が多く認められたものの中から、intercellular adhesion molecule 1(ICAM1)とvascular adhesion molecule 1(VCAM1)に着目してLin(+)細胞とMSCとの接着に働く分子機構はいずれの細胞接着因子が働くのかについて調査した。表2に示されるごとく、抗ICAM1抗体の投与により、MSCに接着するLin(+)細胞は69.3%に減少した。一方、抗VCAM1抗体の投与により、MSCに接着するLin(+)細胞は76.4%に減少した。加えて、抗ICAM1抗体ならびに抗VCAM1抗体の同時投与により、MSCに接着するLin(+)細胞は53.7%に減少した。これらの結果より、MSCとLin(+)細胞との細胞間接着には、ICAM1とVCAM1の両方が働くことが示唆された。また、たいへん興味深いことに、Lin(+)細胞で発現するICAM1受容体(leukocyte function-associated antigen(LFA)-1)に対する阻害剤を投与したところ、MSCとLin(+)細胞との接触性共培養で認められたLin(+)細胞のM2-MΦへの分極化は部分的に抑制されたが、Lin(+)細胞で発現するVCAM1受容体に対する阻害剤を投与しても同様な効果は認められなかった(データ示さず)。

これらの結果より、MSC由来の液性因子M-CSFやSDF-1は、Lin(+)細胞中のM2-MΦ前駆細胞あるいはM2-MΦに対し増殖促進的に働くが、MSCとLin(+)細胞間のICAM1/LFA-1接着機構は、Lin(+)細胞のM2-MΦ分極化を誘導するように働くことが示唆された。しかしながら、LFA-1阻害剤ではLin(+)細胞とMSCとの接触性共培養系で認められるLin(+)細胞のM2-MΦ分極化は部分的にしか抑制できなかったことから、ICAM1/LFA-1接着機構以外にこのM2-MΦ分極化に働く接着機構が存在する可能性は高く、現在、ICAM1/LFA-1以外のM2-MΦ分極化誘導性細胞間接着機構の同定を進めているところである。

(5) (1)から(4)の研究成果により、MSCならびにLin(+)細胞由来液性因子と接着因子を用いた低酸素条件下M2-MΦ大量培養技術の基盤が確立された。現在、M2-MΦのさらなる大量培養を可能にするM-CSFやSDF-1以外の液性因子ならびにICAM1/LFA-1因子の同定作業を継続して実施している。また、今回の研究成果を利用して、BRONJ根治療法を可能にする全く新しい細胞治療の確立を目指した研究を進めているところである。

これらの結果より、MSC由来の液性因子M-CSFやSDF-1は、Lin(+)細胞中のM2-MΦ前駆細胞あるいはM2-MΦに対し増殖促進的に働くが、MSCとLin(+)細胞間のICAM1/LFA-1接着機構は、Lin(+)細胞のM2-MΦ分極化を誘導するように働くことが示唆された。しかしながら、LFA-1阻害剤ではLin(+)細胞とMSCとの接触性共培養系で認められるLin(+)細胞のM2-MΦ分極化は部分的にしか抑制できなかったことから、ICAM1/LFA-1接着機構以外にこのM2-MΦ分極化に働く接着機構が存在する可能性は高く、現在、ICAM1/LFA-1以外のM2-MΦ分極化誘導性細胞間接着機構の同定を進めているところである。

(5) (1)から(4)の研究成果により、MSCならびにLin(+)細胞由来液性因子と接着因子を用いた低酸素条件下M2-MΦ大量培養技術の基盤が確立された。現在、M2-MΦのさらなる大量培養を可能にするM-CSFやSDF-1以外の液性因子ならびにICAM1/LFA-1因子の同定作業を継続して実施している。また、今回の研究成果を利用して、BRONJ根治療法を可能にする全く新しい細胞治療の確立を目指した研究を進めているところである。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

① [Naoki Fujiwara](#) and [Akira Fujimura](#). Insulin-like growth factor-I stimulates the disintegration of Hertwig's epithelial root sheath and cellular cementogenesis in mouse molars in vitro. Dent J Iwate Med Univ, 43: 140-152, 2019. 査読有

② [Miho Ibi](#), [Sawa Horie](#), [Seiko Kyakumoto](#), [Naoyuki Chosa](#), [Mariko Yoshida](#), [Masaharu Kamo](#), [Masato Ohtsuka](#), [Akira Ishisaki](#). Cell-cell interactions between monocytes/macrophages and synovocyte-like cells promote inflammatory cell infiltration mediated by augmentation of MCP-1 production in temporomandibular joint. Biosci Rep, 38: BSR20171217, 2018. DOI: 10.1042/BSR20171217, 査読有

③ [石崎 明](#), [客本 齊子](#), [横田 聖司](#), [加茂 政晴](#), [帖佐 直幸](#). 間葉系幹細胞を利用した再生医療における新たな戦略. お茶の水醫學雑誌, 66巻: 247-258, 2018. 査読有

④ [Naoki Fujiwara](#), [Ji-Won Lee](#), [Mika Kumakami-Sakano](#), [Keishi Otsu](#), [Je-Tae Woo](#), [Sachiko](#)

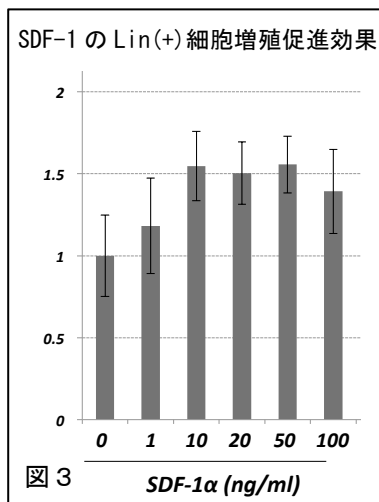


図3

SDF-1α (ng/ml)

表2 ICAM1とVCAM1はMSCとLin(+)細胞との接着に働く

| Condition                                   | Percentage (%) |
|---|----------------|
| None (Control)                              | 100            |
| Anti-ICAM1 (10μg/ml)                        | 69.3           |
| Anti-VCAM1 (10μg/ml)                        | 76.4           |
| Anti-ICAM1 (10μg/ml) + Anti-VCAM1 (10μg/ml) | 53.7           |

Iseki, Masato S Ota. Harmine promotes molar root development via SMAD1/5/8 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 497: 924-929, 2018.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.062, 査読有

⑤ Manabu Inoue, Junko Yamada, Emiko Aomatsu-Kikuchi, Kazuro Satoh, Hisatomo Kondo, Akira Ishisaki, Naoyuki Chosa. SCRG1 suppresses LPS-induced CCL22 production through ERK1/2 activation in mouse macrophage Raw264.7 cells. *Mol Med Rep*, 15: 4069-4076, 2017.

DOI: 10.3892/mmr.2017.6492, 査読有

⑥ Yosuke Kanno, Akira Ishisaki, Hiromi Kuretake, Chihiro Maruyama, Ayaka Matsuda, Osamu Matsuo. Alpha2-antiplasmin modulates bone formation by negatively regulating the osteoblast differentiation and its function. *Int J Mol Med*, 40: 854-858, 2017.

DOI: 10.3892/ijmm.2017.3055, 査読有

〔学会発表〕(計5件)

① 横田 聖司、帖佐 直幸、松本 識野、客本 齊子、加茂 政晴、佐藤 和朗、石崎 明、顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるプリン体作動性シグナルの役割、第41回日本分子生物学会年会(横浜)、2018年

② 松本 識野、横田 聖司、帖佐 直幸、菊池 恵美子、木村 仁迪、加茂 政晴、佐藤 和朗、石崎 明、細胞外ヌクレオチドが顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞に与える影響について、第41回日本分子生物学会年会(横浜)、2018年

③ 太田 麻衣子、帖佐 直幸、横田 聖司、客本 齊子、加茂 政晴、佐藤 健一、城 茂治、石崎 明、歯周靭帯由来細胞における神経栄養因子 NGF の発現機構に関する研究、2017年度生命科学系学会合同年次大会(神戸)、2017年

④ 根本 章、帖佐 直幸、客本 齊子、横田 聖司、加茂 政晴、野田 守、石崎 明、歯科材料からの溶出成分がヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に与える影響、2017年度生命科学系学会合同年次大会(神戸)、2017年

⑤ 藤原 尚樹、大津 圭史、原田 英光、Hertwig 上皮鞘から遊走する細胞動態の解析、第59回歯科基礎医学会学術大会(松本)、2017年

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

① 研究分担者氏名：藤原 尚樹

ローマ字氏名：(FUJIWARA, Naoki)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20190100

② 研究分担者氏名：帖佐 直幸

ローマ字氏名：(CHOSA, Naoyuki)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80326694

※科費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。