



Title	頸骨の間葉系幹細胞を用いた骨再生法の開発
Author(s)	西村, 正宏
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2025, 69(1), p. 17-23
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/103301
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

顎骨の間葉系幹細胞を用いた骨再生法の開発

西村 正宏*

(令和6年11月12日受付)

はじめに

歯科補綴治療を困難とさせる大きな要因の一つとして、顎堤の高度吸収（萎縮）や欠損がある。高度に吸収した顎堤上での可撤性補綴装置の安定性は悪く、インプラント埋入のために造骨の必要を迫られる頻度も高い（図1）。さらに腫瘍や外傷で顎堤が失われると、栓塞子や顎補綴装置の製作が必要となり、たとえどんなに素晴らしい装置を提供しても、現状では真に患者のQOLが向上するものではなく、眞の機能回復は本来の自分の顎堤、歯肉の再生によってのみ達成されるものと考えられる。

私は以前から、歯科補綴学には従来からの材料のみ

の研究から組織・細胞を用いて生体そのものを再生する研究も加えるべきであると考え、細胞生物学的な基礎研究にも重点をおいて研究を行ってきた。私の研究の方向性を大きく変える契機となったのが、広島大学での様々な外部資金の採択であった。これらの予算は間葉系幹細胞（以下 MSC）を使って、骨、軟骨、歯周組織を再生する技術を開発し、ベンチャーを創設して再生医療を実現することが目標であり、私もこのプロジェクトに協力させていただいた。その後の大型予算で、無菌的な細胞調整のための施設、Cell Processing Center (CPC) など、多くの設備が設置され、例えば歯周病態学分野において、世界で初めての歯周組織再生のための臨床研究も開始された¹⁾。さらに、加藤幸夫教授らのグループでは2002年度ひろしま産業振興機構の知的クラスター事業「間葉系幹細胞及び上皮細胞の超増幅法」、2003年度科学技術振興機構事業化のための育成研究「歯周病と骨疾患に対する細胞治療の事業化：幹細胞治療法のシステム化」、2007年度JSTイノベーションプラザ広島 育成研究課題「間葉系幹細胞（MSC）の安全性判定法とそれを用いた細胞治療法の事業化」など、数千万円規模の予算が連続して採択され、MSC研究の拠点となっていました。口腔のQOLの向上を目指す連携研究でも広島大学は再生工学代表連携校として、2007年から5年間にわたり全国大学からの研究者を集めて、毎年「ヒト間葉系幹細胞の分離、培養および骨分化の技術についての講習会」を開催し、私もその講師の役を担ってきた。こういった流れの中で、私は顎骨を再生するためのシステムづくりを担当した。歯科補綴領域でこれから最もニーズの高い再生治療は、

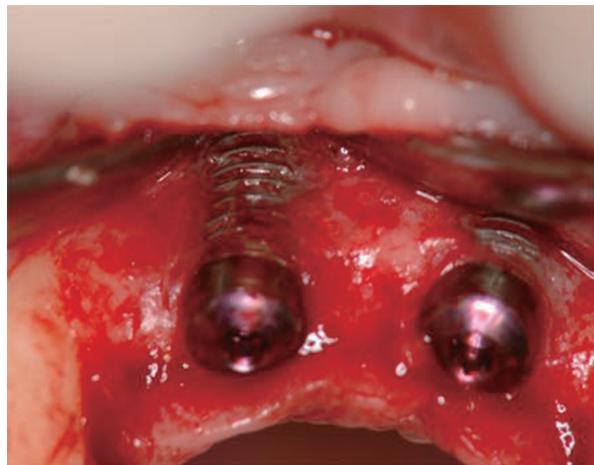


図1：骨の不足によってインプラント体が露出した例。骨量が不足した部位にインプラントを埋入すると、このようにインプラント体が露出し、長期的には脱落することとなる。

* 大阪大学大学院歯学研究科クラウンブリッジ補綴学・顎口腔機能学講座

この顎骨の再生であると感じていたからである。

その後私は長崎大学、鹿児島大学と異動し、それぞれの大学で良き仲間、共同研究者と出会い、一貫して補綴学講座で臨床に携わりながら、MSCを用いた骨再生研究を続けてきた。2024年4月に大阪大学へ異動し、さらに多くの仲間、共同研究者と出会うことができたため、今後はこれまでの仕事を実用化に移したいと考えている。本稿では、これまでの私のMSCに関する研究成果を紹介させていただく。

顎骨再生医療開発のスキーム

再生医療を実現させるためには、目的組織を構成する細胞に分化可能な細胞とそれを支持する担体／支持体が欠かせず、移植サイトの場の環境（niche）と再生するための時間、そして適切な成長因子が必要になる。小範囲の顎骨を再生する目的であれば、バリアメンブレンと人工骨を使う骨再生誘導法（Guided Bone Regeneration；以下 GBR）で骨は再生できるが、広範囲の再生は望めない。そこで骨補填材・人工骨等に骨形成能を持たせるために、自己細胞を複合させる方法が多く研究され、臨床応用もされている²⁾。

しかし自己細胞の安全な培養にはCell Processing Center（CPC）が必要で、安全性の高い培養機器や培地も求められる。顎骨の再生に対しては、これまでには名古屋大学口腔外科のグループや東京大学の医科学研

究所のグループによって腸骨骨髓間葉系幹細胞を用いた骨再生医療が行われてきたが、現在は提供されていない。現在では岐阜大学病院にて歯髓由来細胞を用いた骨再生医療が進行中である（表1）。再生医療安全性確保法の施行により、提供される再生医療は全て厚生労働省への届け出が必要であり日々変化しているため、詳細は厚生労働省のホームページを参照されたい（<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000186471.html>）。生きた自己幹細胞を用いようとすると、細胞を個別に培養してその品質や安全性を評価する必要があるがコスト高に繋がるため、これを回避するために、アログラフトによる治療も検討されている³⁾。しかし現状では特に骨に関してはアログラフトによる骨再生の実用化には検証すべき課題が多いため、生きた状態で自己細胞を移植するのではなく、Spheroid培養したiPS細胞を凍結乾燥した骨補填材や、骨形成タンパクであるBMP-2を用いる方法が研究されている（表1）。しかし我々は、イヌを用いた歯周組織欠損モデルに移植したGFP標識MSCが歯根膜を構成する細胞や歯槽骨の骨細胞に分化していることを見出したことからも、細胞そのものの移植の有用性を感じている⁴⁾。しかし、図2に示すように、MSCによる骨再生医療には多くのステップが必要で、そのスキームが円滑に回らなければ実現は困難である。以下に各段階において解決すべき問題と、それに関わる報告を述べる。

表1：骨再生を目的とした事業一覧

施設名	大阪大学	名古屋大学病院	岐阜大学病院	東北大学病院	岡山大学病院
進捗	AMED 令和5、6年度「橋渡し研究プログラム」シーズA：新規骨補填材の開発	先進医療B（2023年度まで）終了	令和5年6月12日～再生医療第二種開始	AMED 令和3年度「橋渡し研究プログラム」preB：(a)-1 iPS細胞／ハイドロゲル複合体を用いた骨補填材の開発	(株)オステオファーマ 岡山大学 2021年7月1日～医師主導治験開始
有効成分	生細胞（Auto）	生細胞	生細胞	死細胞	成長因子 rhBMP-2
細胞ソース	顎骨骨髓 MSC	腸骨骨髓間葉系幹細胞	歯髓	iPS細胞	なし
骨補填材	炭酸アパタイト	β-TCP	不明	なし	β-TCP
賦形法	多層化細胞シート	PRP	PRP	Spheroid培養後に凍結乾燥	不明

自己細胞を用いた骨再生治療のスキーム

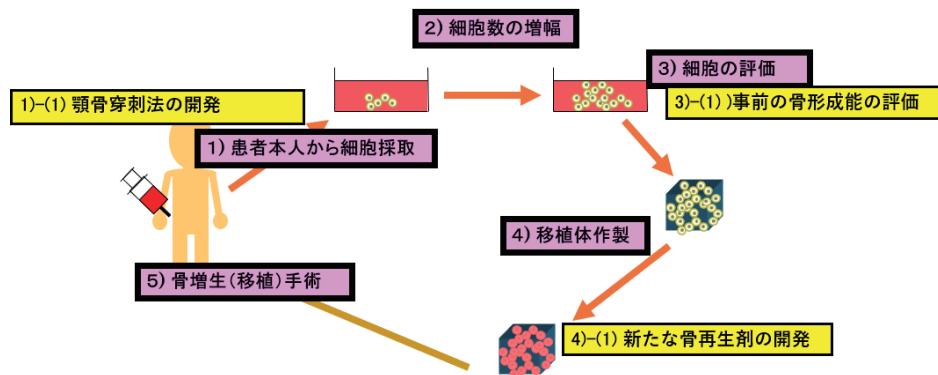


図2：顎骨の骨再生医療を実現するために必要なステップと本論文で紹介する項目

患者顎骨からのMSC採取法の開発

歯科医にとって口腔内の組織は採取が容易であるため、口腔内組織に存在する多分化能細胞は顎骨再生のための有力なツールとなる。口腔内から採取可能な組織は、歯（歯髄と歯根膜）、歯肉、顎骨、骨膜、骨髄、脂肪などが考えられる。顎骨を再生することが目的であれば、骨を構成する骨膜、骨、骨髄、血管、神経などに分化可能な細胞が候補となる⁵⁾。骨片を含めた骨や骨膜は骨切り手術や様々な骨除去手術時に余剰となるが、これらを採取するためには採骨同様に患者の侵襲は大きくなる。歯肉中にも幹細胞が含まれているが、骨分化能の高い細胞数は少なく、採取部位による含有率も異なるため、骨再生のための細胞ソースとしては適していない。脂肪組織は皮下脂肪や口腔内頬粘膜などからも採取が可能で、既に大阪大学の口腔治療学講座では「自己脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた歯周組織再生療法の開発」として臨床研究が実施されている。一方、我々は世界で初めて顎骨骨髄中のMSCの分化能を検討し、これが腸骨由来のMSCと匹敵する骨分化能を持つことを報告した⁶⁾。しかし顎骨から骨髄を採取するためのツールが存在していなかったことから、顎骨専用の穿刺針を企業と共同開発した⁷⁾。その後我々はヒト顎骨骨髄液の採取とMSCの最適な培養法を検討し、採取した骨髄液のWBC/RBC比が高い骨髄液のほうが、培養成功率が高いこと、また、採取部位や患者年齢の差による細胞増殖率には違いがない事を見出したことから、顎骨の萎縮する高齢者からでも有用な細胞が採取できることを見出した。さらに、我々は顎骨骨

髄から採取したMSCと腸骨の骨髄から採取したMSCの形質を調べたところ、顎骨由来MSCは腸骨由来MSCと比べて、脂肪分化能が低いことを見出した。その原因として顎骨由来MSCは腸骨由来MSCと比べてNOX4発現が低く⁸⁾、C/EBPbeta, C/EBPdelta, early B-cell factor 1 (Ebf-1), and Kruppel-like factor 5 (KLF5)の発現が低いことが示された⁹⁾。一方顎骨由来MSCはin vitroでの骨分化能がLotによって大きく異なり、それらのMSCを免疫不全マウスの頭頂骨モデルに移植すると、in vitroで石灰化能の低い細胞でも高い骨再生能を示した¹⁰⁾。したがって、顎骨MSCを用いた骨再生の臨床医療を確実に実行するためには、in vitroでの石灰化能以外に、生体での骨再生能を予測するマーカーを検討する必要性があることが判明した。

生体内での骨形成能を予測するマーカーの開発

顎骨の骨髄から採取する細胞は量が少なく、セルソーターで分取すると数がさらに減少することが考えられるため、我々は採取した骨髄MSCのフェノタイプを培養初期の段階で、「移植後に骨を高度に形成し得る細胞なのか」を見極めるマーカーを探索することとした。そこで、駒走らは、臨床サンプルから培養した7名の顎骨MSCを詳細に検討した¹¹⁾。表面抗原の解析から、それらのすべての細胞が、いわゆる幹細胞マーカーであるCD73, CD90, CD105陽性で、CD14, CD34, CD45陰性であった。それらのMSCを培養して骨分化誘導した場合、細胞のアルカリフォスファターゼ活性やアリザリンレッド染色に大きなバラツキがあった。一方、これ

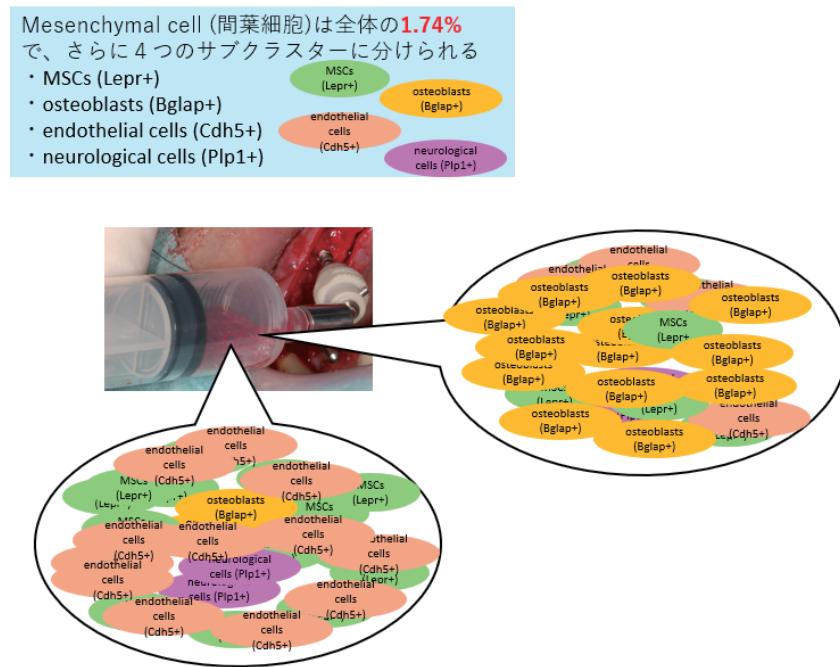


図3：マウス顎骨骨髄のシングル RNA シークエンスによって明らかになった間葉細胞のクラスター

らの7つのMSCを増殖培養し、免疫不全マウスの頭頂骨と骨膜の間に、MSCと β -TCPを3%アテロコラーゲンで封入した骨再生剤として移植し、8週後に組織標本を作成してH&E染色後に新たに形成された骨面積を計測した。その結果、移植したMSCのin vitroでの骨分化能と、そのMSCを移植後のin vivoでの骨形成面積は全く相関性を示さなかった。そのため、何がMSCを移植後の骨形成能を決定しているのかを決定するため、MSCの移植前の培養上清に入っている蛋白質を網羅的に検索することとした。いずれもヒト用のタンパク質アレイで、Angiogenesis, Chemokine, Cytokineの3種を用いて検討したところ、CHI3LI, GRO α , MCP-1, MCP-3, IL-8の5つのタンパク質がMSCの骨形成能と相関性が認められた。さらに定量的に検討するため、各MSCの培養上清を上記5つのタンパク質をELISAにて分析した所、CHI3LI(chitinase-3-like protein 1)の発現量が、MSCの移植後の骨形成面積と反比例していることが判明した。次にCHI3LIの機能を明らかにするため、MSCに外因性にCHI3LIを投与した所、in vitroでCHI3LIはMSCの増殖能も骨分化能も変化させなかった。MSCから放出されたCHI3LIがMSC自身には作用しないことから、MSCが他の細胞に影響を与えていた可能性があるのではないかという仮説を立て、次に、CHI3LIのヒト線維芽細胞と血管内被細胞に対する増殖能と遊走促進効果を調べた。その結果、

CHI3LIは両細胞に対して増殖促進効果を認め、特に線維芽細胞に対しては濃度依存的にその増殖能を亢進した。遊走能についても、線維芽細胞に対してはbell状濃度依存的に、血管内被細胞に対しては濃度依存的にそれぞれの細胞遊走能を亢進させた。さらにin vivoでの膠原線維形成の状態を確認するため、各細胞を移植した部位に対する組織切片に対してMasson's trichrome染色を行ったところ、CHI3LIを多く放出していたMSCを移植した部位はMasson's trichrome染色が濃染された。さらに血管形成の状態を観察するため、各細胞を移植した部位に対する組織切片に対してCD31による免疫染色を行ったところ、CHI3LIを多く放出していたMSCを移植した部位はCD31陽性細胞濃染であった。これらの結果から、我々は、培養時のCHI3LIの産生能の低さが、移植後のMSCの高い骨形成能を保証する可能性があるという結論を導いた。

近年、Linらにより、ヒトの顎骨ではないが、マウスの顎骨からは少なくとも4種類の間葉細胞が存在していることが報告された¹²⁾。つまり、我々が採取・培養した顎骨由来のMSCは、採取部位の違いによって、「たまたま」Osteoblasts系の間葉細胞が多い場合と「たまたま」Endothelial系の間葉細胞が多い場合があり、「たまたま」採取される間葉細胞のサブクラスターの量に応じて、移植後の骨形成能が異なる可能性があることが推定された(図3)。そこで、MSCの培養初期で、

CHI3LI の産生量を検出することで、その MSC の質を評価ができる可能性があり、今後、MSC を骨再生のための細胞ソースとして利用する際のマーカーとして用いる予定である。

移植細胞の局在化による確実な骨再生

我々がイヌによる顎骨再生実験を重ねたところ、確実に骨が再生できる場合と、移植体が全くレシピエントと癒着しない場合があり、実際はその治療成績には大きなばらつきがあることを経験した⁷⁾。そもそも顎骨再生において移植体は移植時とその後に、必要な再生部位で高い賦形性を維持し、レシピエント骨と連続的に癒着することが必要である。そのためには賦形性の高い状態で MSC を移植する必要がある。また、接着細胞をトリプシン消化してバラバラにして移植するよりも、シートや塊 (spheroid) の状態である程度細胞外マトリックスが存在した状態で移植したほうが生存率が高いことが分かつてきため、例えば、Spheroid 培養した MSC を骨分化誘導培養後に移植する方法（図 4-A）^{13,14)}、MSC を生体材料（ β TCP, アパタイト, アテロコラーゲン, ナノファイバー等）と混和して主に細胞 + 生体材料間接着構築させた複合体を骨分化誘導培養後に移植する方法（図 4-B）¹⁵⁾、骨補填材をフィブリングルで固めつつ、周囲に高密度細胞層を配置した状態で移植する方法（図 4-C）（株式会社ジーシー、特許第 5876934 号（2016 年 1 月 19 日登録）、組織再生コンストラクト及び組織再生コンストラクトの製造方法）、MSC の Spheroid をゲルで包埋し、骨分化誘導後に移植する方法（図 4-D）¹⁶⁾、Collagen 生成を亢進させた MSC の Spheroid を凍結可能な状態で保管して用いる方法（図 4-E）（広島大学 加治屋 幹人ら特許第 7105487（2022.7.14 登録）凍結細胞集塊及び凍結細胞集塊の製造方法）などである。しかしいずれの方法も実用化には至っていない。我々は骨補填材を多層化培養したシートで被覆した骨再生剤（現状では直径約 5 mm ~ 10 mm で製作可能）を開発した（図 4-F）（鹿児島大学 末廣史雄、西村正宏ら、特願 2023-102016/PCT/JP2024/022387、骨再生又は増生用複合体及びその製造方法）（図 4, 5）。この骨再生剤はピンセットで保持可能であり、0.5cm × 0.5 cm × 0.5 cm のブロックでもそのまま骨再生剤として製造可能であり、これまで補填困難であった大きな顎欠損も再生可能になることが期待される。臨床応用には安全性試験、大型動物での

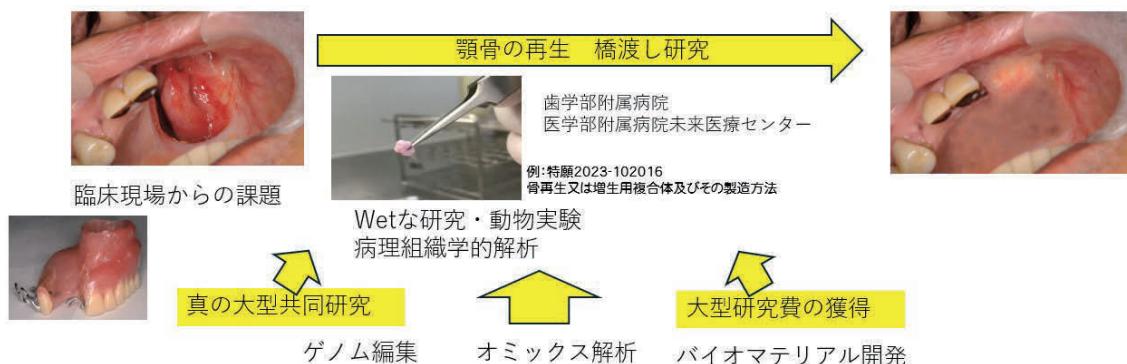


図 4：これまで考案されてきた骨再生剤

有効性試験などが必要であるが、今後必要な資金を得て、実用化に進んでいきたい。

おわりに

以上のように、私と私の関連するグループは様々な公的資金と企業との共同研究によって、顎骨 MSC を用いた骨再生医療の開発に取り組んできた。超高齢社会を迎える日本人の口腔 QOL を向上させるために、インプラント治療は大変有効な手段の一つであるが、そのために採骨を必要とする事も多く、万人が必ずしも簡単に治療が進むわけではない。本再生医療の実現



は補綴・患者主導型のインプラント治療を推進するための有力なツールの一つとなると考えられる。また本医療は、インプラント治療目的の骨再生以外にも、顎口蓋裂や外傷等の骨欠損に対しても有効な治療方法の一つとなろう。ただし、ヒト幹細胞を用いて患者を治療しようとする臨床研究を実施する際には、その有効性と安全性を十分に検証し、厚生労働省の策定したヒト幹細胞指針に則って行うことが求められている。その中で細胞はこの指針の基準を満たす CPC で培養されることが求められており、そのためのコストも極めて高くなる。しかし 2013 年 4 月に再生医療推進法が成立し、細胞・組織の培養・加工を医療機関外に委託できることが明確になったため、培養のコストについては今後解決されることが期待される。今後我々はヒト幹細胞指針に則った、一般歯科開業医に普及しやすい骨再生医療の展開を目指して研究を推進していく予定である。

謝 辞

稿を結ぶにあたり、これまで研究指導いただいた広島大学名誉教授の加藤幸夫先生はじめ、株式会社ツーセルの皆様、長崎大学、鹿児島大学のそれぞれの関係各位、医局の皆様、大学院生をはじめとする共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 河口浩之, 林秀昭, 水野智仁, 藤岡大助, 内田雄士, 平地昭雄, 毛利吉宏, 岩田倫幸, 足利新, 藤田剛, 長谷川直彦, 日野孝宗, 吉野宏, 辻紘一郎, 加藤幸夫 and 栗原英見 (2005) : 自家骨髓間葉系幹細胞移植による歯周組織再生医療法の開発. *再生医療*, **4**, 69-77.
- 2) Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I.

and Akiyama, K. (2012): Stem cells in dentistry - Part II: Clinical applications. *Journal of prosthodontic research*, **56**, 229-248.

- 3) Nagai, T., Sato, M., Furukawa, K. S., Kutsuna, T., Ohta, N., Ushida, T. and Mochida, J. (2008): Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue engineering Part A*, **14**, 1225-1235.
- 4) Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Hirachi, A., Takeda, K., Mizuno, N., Nishimura, M., Koike, C., Tsuji, K., Iba, H., Kato, Y. and Kurihara, H. (2006): Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodont*, **77**, 1003-1007.
- 5) Nishimura, M., Takase, K., Suehiro, F. and Murata, H. (2012): Candidates cell sources to regenerate alveolar bone from oral tissue. *International journal of dentistry*, **2012**, 857192.
- 6) Matsubara, T., Suardita, K., Ishii, M., Sugiyama, M., Igarashi, A., Oda, R., Nishimura, M., Saito, M., Nakagawa, K., Yamanaka, K., Miyazaki, K., Shimizu, M., Bhawal, U. K., Tsuji, K., Nakamura, K. and Kato, Y. (2005): Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, **20**, 399-409.
- 7) 西村正宏 (2014) : 頸骨骨髓間葉系幹細胞を用いた頸骨増生医療の開発. *鹿歯紀要*, **34**, 53-64.
- 8) Ikeda, N., Ishii, M., Miyata, H., Nishi, Y., Suehiro, F., Komabashiri, N., Sakurai, T. and Nishimura, M. (2023): Role of reactive oxygen species (ROS) in the regulation of adipogenic differentiation of human maxillary/mandibular bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep*, **50**, 5733-5745.
- 9) Miyata, H., Ishii, M., Suehiro, F., Komabashiri, N., Ikeda, N., Sakurai, T. and Nishimura, M. (2023): Elucidation of adipogenic differentiation regulatory mechanism

in human maxillary/mandibular bone marrow-derived stem cells. *Arch Oral Biol*, **146**, 105608.

10) 西村正宏, 末廣史雄, 黒木唯文, 坂井裕大 and 朝比奈泉 (2013): 骨増生に向けた顎骨骨髓液採取と間質細胞培養法. *日口腔インプラント誌*, **26**, 668-675.

11) Komabashiri, N., Suehiro, F., Ishii, M. and Nishimura, M. (2021): Efficacy of chitinase-3-like protein 1 as an in vivo bone formation predictable marker of maxillary/mandibular bone marrow stromal cells. *Regen Ther*, **18**, 38-50.

12) Lin, W., Li, Q., Zhang, D., Zhang, X., Qi, X., Wang, Q., Chen, Y., Liu, C., Li, H., Zhang, S., Wang, Y., Shao, B., Zhang, L. and Yuan, Q. (2021): Mapping the immune microenvironment for mandibular alveolar bone homeostasis at single-cell resolution. *Bone Res*, **9**, 17.

13) Langenbach, F., Berr, K., Naujoks, C., Hassel, A., Hentschel, M., Depprich, R., Kubler, N. R., Meyer, U., Wiesmann, H. P., Kogler, G. and Handschel, J. (2011): Generation and differentiation of microtissues from multipotent precursor cells for use in tissue engineering. *Nat Protoc*, **6**, 1726-1735.

14) Mcmillan, A., Nguyen, M. K., Huynh, C. T., Sarett, S. M., Ge, P., Chetverikova, M., Nguyen, K., Grosh, D., Duvall, C. L. and Alsberg, E. (2021): Hydrogel microspheres for spatiotemporally controlled delivery of RNA and silencing gene expression within scaffold-free tissue engineered constructs. *Acta Biomater*, **124**, 315-326.

15) Zujur, D., Kanke, K., Lichtler, A. C., Hojo, H., Chung, U. I. and Ohba, S. (2017): Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. *Sci Adv*, **3**, e1602875.

16) Heo, D. N., Hospoduk, M. and Ozbolat, I. T. (2019): Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, **95**, 348-356.