HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	卵巣摘出マウスに対するヒト乳歯歯髄幹細胞の細胞培養液を用いた骨吸収抑制効果の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	前田，彩子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13478号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74183
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ayako_Maeda_abstract.pdf，論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　前　田　彩　子

学　位　論　文　題　名

卵巣摘出マウスに対する乳歯歯髄幹細胞の細胞培養液を用いた
骨吸収抑制効果の検討

骨粗鬆症は僅かな外力で骨折を起こす疾患であり、我が国においても、近年の急速な超高齢社会の進行で増加傾向にあり、約 1,300 万人が罹患していると報告されている。特に女性は男性に比べ、骨密度がもともと少ないうえ、更年期以降、卵巣機能の低下に伴い骨吸収が亢進することが知られている。骨量の減少によって引き起こされる腰椎の圧迫骨折や大腿骨頸部の骨折は、歩行困難や寝たきりの誘因となり、著しい quality of life の低下を招くことになる。骨粗鬆症の進行を防ぐことは重要であり、様々な骨形成促進剤や骨吸収抑制剤が治療に用いられている。しかし、特に骨吸収抑制効果の高いビスホスホネート製剤、あるいは抗 Receptor activator of nuclear factor kappa-B(RANKL)モノクローナル抗体製剤は、その副作用として抜歯等の処置後に顎骨壊死を引き起こすことが知られている。そのため、現在もより安全で効果的な治療薬の開発が活発に続けられている。

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)は、骨髄・脂肪・靭帯などの間葉組織に存在している体性幹細胞であり、それらの由来する組織によって異なった特性を有していることが知られている。乳歯の歯髄組織に存在しているヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(Stem cells from human exfoliated deciduous teeth : SHED)は、MSC の特性である多分化能と増殖能が、他の組織に由来する MSC より高く、さらに骨芽細胞への誘導が容易であるため、骨組織再生における細胞ソースとして多くの臨床研究が進んでいる。SHED から放出される分泌因子には、中枢・末梢神経損傷、神経変性疾患、肝硬変、心筋梗塞、糖尿病、自己免疫疾患などの多くの難治性疾患に対して高い治療効果を発揮することが、小動物を用いた実験において報告されている。そこで本研究は、骨粗鬆症モデルとして一般的に用いられる卵巣摘出(OVX)マウスを使用し、骨粗鬆症における SHED 分

泌因子の有効性について検討を行った。

北海道大学病院自主臨床研究審査委員会承認のもと、北海道大学病院歯科外来にて患者の同意を得て提供を受けたヒト脱落乳歯(上顎乳中切歯)より歯髄を採取し、初代培養を行った。継代培養した細胞は骨細胞と脂肪細胞に分化することを確認しており、SHED として使用した。また、乳歯と永久歯の比較を行うために、ヒト歯髄幹細胞(Dental pulp stem cell: DPSC)を使用した。SHED と DPSC を継代培養し、80%コンフルエント状態で無血清培地(serum-free culture medium : SF-MEM)に交換、24 時間培養した後に上清(condition medium)を回収し、それぞれ SHED-CM、DPSC-CM として使用した。動物実験は、北海道大学動物実験委員会承認のもと、北海道大学動物実験に関する規程を遵守し実験を行った。11 週齢 C3H/HeJ 雌マウスに対し、全身麻酔下にて卵巣摘出術(OVX)を施行、OVX 直後から週 2 回、SHED-CM(200μl)あるいは SF-MEM (200μl)を腹腔内に投与した。投与開始 4 週後に CO_2 ガスで安楽死させ、大腿骨、末梢血および腹腔内液を採取し、解析を行った。

大腿骨骨端部のμCT 画像分析および H.E.染色において、骨梁は SF-MEM 群では擬似手術 (Sham) 群と比較し有意に減少していたが、SHED-CM 群と DPSC-CM 群では骨梁の減少は抑制されていた。TRAP 染色においては、全ての群で TRAP 陽性細胞を認めたが、SHED-CM 群では SF-MEM 群と比較し有意に減少していた。腰椎前頭断面における実体顕微鏡での観察においても、SF-MEM 群と DPSC-CM 群では骨梁の一部が喪失しているのに対し、SHED-CM 群では Sham 群と類似した骨梁構造が残存していた。血漿中のサイトカイン濃度については、Sham 群と比較し SF-MEM 群において IL-17、IFN-γ、TNF-αの上昇を認めたが、SHED-CM 群では有意な上昇を認めなかった。フローサイトメトリーにおける末梢血リンパ球解析では、CD4 および CD8 陽性細胞数が、Sham 群と比較して SF-MEM 群、SHED-CM 群、DPSC-CM 群で有意に増加しており、この 3 群間での有意差は認めなかった。一方、末梢血における IL-17 および INF-γ産生細胞数の測定を行った所、IL-17 および IFN-γ産生細胞数は、SHED-CM 群と DPSC-CM 群において有意に減少していた。以上の結果より、SHED-CM 投与による骨吸収抑制効果は、SHED の免疫細胞を介した経路とは別の機序が存在し、破骨細胞による骨吸収を抑制している可能性があるのではないかと推測し、M１および M２マクロファージの分布について検討を行った。腹腔内マクロファージにおける分布の比率は、M1 マクロファージは、SF-MEM 群と比較して SHED-CM 群および DPSC-CM 群で有意に低い値を示した。一方で、免疫調整能を有する M2 マクロファージ数は、SHED-CM 群および DPSC-CM 群において有意に増加しており、特に SHED-CM 群で高い値を示した。このことから、M2 マクロファージの増加は CM 投与によって引き起こされた可能性が高いことが示唆された。M2 マクロファージの分化に必要な IL-4 の中和抗体を用いて、

M2 マクロファージの発現を抑制した所、μCT 画像では IL-4 中和抗体投与群、IL-4 中和抗体と SHED-CM の併用投与群において成長板直下の骨梁減少を認めた。末梢血における IL-17 および INF-γ産生細胞数の測定では、Sham 群と比較して IL-4 中和抗体投与群、IL-4 中和抗体 SHED-CM 併用投与群において有意に高い値を示した。IL-4 中和抗体と SHED-CM の併用投与群において、SHED-CM を投与しているにも関わらず骨梁の減少が抑制されなかった原因は、M2 マクロファージの発現が IL-4 中和抗体によって阻害されたためと考えられる。

今回の結果から、OVX マウスに SHED-CM を投与することで、OVX による骨粗鬆症の症状が緩和されることが示された。SHED-CM 群では、骨吸収促進作用を有する炎症性サイトカインである IL-17 および INF-γの血中濃度が減少していることから、SHED-CM による骨吸収抑制作用は、M2 マクロファージを介した、IL-17 および INF-γ産生細胞への抑制効果が関与している可能性が示唆された。