



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13478
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77058
Type	doctoral thesis
File Information	Ayako_Maeda.pdf



博 士 論 文

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

平成 3 1 年 3 月 申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

前 田 彩 子

要旨: ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)は、乳歯歯髄組織に存在している間葉系幹細胞であり、SHED が放出する分泌因子には、組織修復能と免疫調整能があることが報告されている。本研究は、骨粗鬆症に対する SHED の有効性について検討を行った。

交換期のため脱落した乳歯から SHED を分離し、継代培養を行った後に、培養上清を回収し実験に用いた。11 週齢 C3H/HeJ 雌マウスに対し卵巣摘出(OVX)を施行、OVX 直後から週 2 回、無血清培地(SF-MEM 群)あるいは SHED 培養上清(SHED-CM 群)を腹腔内に投与した。投与開始 4 週後に、大腿骨の状態を μ CT で観察した。さらに、腹腔内液におけるマクロファージ分画と、末梢血中の IL-17 および IFN- γ 産生細胞数について FACS 解析を行った。

大腿骨における骨量は、SHED-CM 群では SF-MEM 群と比較し有意に高い値を示した。IL-17 および IFN- γ 産生細胞数は、SHED-CM 群では有意に減少していた。また腹腔内液中のマクロファージは、SHED-CM 群では M2 マクロファージの有意な増加を認めた。さらに、中和抗体を用いて M2 マクロファージの発現を抑制したところ、SHED-CM の投与にも関わらず、IL-17 および IFN- γ 産生細胞数と骨量は、SF-MEM 群と有意差は確認されなかった。

OVX による骨粗鬆症において、SHED-CM は、骨吸収抑制効果を有することが明らかになった。この SHED-CM による骨吸収抑制効果は、M2 マクロファージと IL-17 および IFN- γ 産生細胞の活性が関わっていることが示唆された。

キーワード: SHED, 骨粗鬆症, マクロファージ

緒言

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¹⁾。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、そのため、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 ligand (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²⁾。

近年の分子レベルにおける骨代謝調整機序の解明によって、多くの骨粗鬆症治療薬が開発されている。骨粗鬆症治療薬における留意点は、疾患の性格上、薬物の投与期間が長期に及ぶことから、高い骨吸収抑制作用を有するとともに、他の組織に対する高い安全性が重視される。現在、臨床で用いられている治療薬は、骨吸収抑制作用のあるエストロゲン製剤、ビスホスホネート製剤、抗 RANKL モノクローナル抗体製剤、選択的エストロゲン受容体モジュレーターその他、骨形成促進作用のある副甲状腺ホルモン製剤などが挙げられる。

しかし、ホルモン補充療法として投与されるエストロゲン製剤は、がんの発症率が上昇するとの報告もある^{3,4)}。また、ビスホスホネート製剤あるいは抗 RANKL モノクローナル抗体製剤服用者に発症する顎骨壊死はよく知られた副作用である^{5,6)}。さらに、ヒト副甲状腺ホルモンの遺伝子組換えペプチドであるテリパラチドは、強力な骨形成促進があり、骨吸収抑制薬による治療効果が不十分な症例で使用されているが、小動物に投与した実験において骨肉腫発症の副作用の報告があるため、臨床上の累計使用期間は2年と制限されている^{7,8)}。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・靱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⁹⁾。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¹⁰⁾。また、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^{11,12)}。

そこで本研究は、SHED の分泌因子が骨粗鬆症の治療に有効であるか検討を行なった。

方法

1. 細胞培養

北海道大学病院自主臨床研究審査委員会承認(自 010-0116)のもと、北海道大学病院小児・障害者歯科で患者の同意を得て提供された脱落乳歯(上顎乳中切歯)より SHED を分離・培養した。比較対照群として、ヒト永久歯歯髄由来間葉系幹細胞(Dental pulp stem cell: DPSC)(Lonza, Switzerland)を使用した。各細胞は、20%牛胎児血清 (Roche Diagnostic, Australia)を添加した α minimum essential medium (Invitrogen, USA)を用い、37°C, 5%CO₂ の気相下にて培養を行った。各細胞は継代培養を行い、80%コンフルエント状態で血清無添加の α MEM 培地に交換、さらに 24 時間培養した後に培養上清を回収した。回収した培養上清は、遠心分離を行い、細胞残骸を除去した。

2. 動物実験

動物実験にあたっては北海道大学動物実験指針を遵守し北海道大学動物実験委員会承認(15-0015)を得て行った。生後 11 週齢の C3H/HeJ 雌マウス(三協ラボサービス, Japan)を用いた。ネンブタール麻酔下で卵巣摘出手術(OVX)または開腹のみの偽手術(Sham)を行い、骨粗鬆症モデルマウスおよび対照マウスを作製した。OVX を施行したマウスに対して、OVX 直後から週 2 回の頻度で 4 週間にわたり計 8 回、200 μ l の無血清培地(SF-MEM), 200 μ l の SHED

培養上清(SHED-CM), 200 μ l の DPSC 培養上清(DPSC-CM)をそれぞれ腹腔内に投与した. OVX 施行 4 週間後に CO₂ ガスにて安楽死させ, 各種の解析を行った(図 1-A).

3. 試料の観察

大腿骨と腰椎は, 採取後に 4%パラホルムアルデヒドで 2 日間浸漬固定を行った. 固定した試料は, Latheta LCT200(Hitachi, Japan)を用いて管電圧: 50kV, ピクセルサイズ 24.0 μ m の条件で μ CT 撮影を行った. 撮影試料における測定は, Lathea LCT200 標準付属の解析ソフトウェアを使用して計測した. μ CT 撮影後, 大腿骨は 10%EDTA 溶液で 10 日間脱灰を行い, 通法に従いアルコール脱水およびパラフィン包埋を行った. パラフィン包埋した試料は 5 μ m の切片を作製し, 通法に従い H. E. 染色および TRAP 染色を行った. 切片画像の取り込みと解析は Image-Pro Premier(Media Cybernetics, USA)を用いた. 腰椎は, マイクロ・カッティング・マシーン BS-300CP(Meiwafosis, Japan)を用いて前頭断方向に中央部で切断を行い, 実体顕微鏡で骨梁の状態を観察した.

4. FACS 分析

末梢血はヘパリンコートしたガラス毛细管を用いて眼底静脈叢より採血した. 採取した末梢血は均等に二分し, 一方は, PE/Cy7 anti-mouse CD4(Biolegend, USA), FITC anti-mouse CD8a(Biolegend)で多重染色を行った後に 1X RBC Lysis Buffer (eBioscience, USA) を用いて

赤血球の溶血を行った。もう一方の末梢血には, Cell Fixation & Permeabilization Kit (Abcam, USA) を用いて細胞の固定, 透過処理を行い, PE/Cy7 anti-mouse IFN- γ (Biolegend), FITC Rat IgG_{2b}, κ (Biolegend), PerCP/Cy5.5 anti-mouse IL-17A (Biolegend) で染色を行なった後に 1X RBC Lysis Buffer (eBioscience) を用いて赤血球の溶血を行った。マクロファージは, 冷 PBS10ml をマウスの腹腔内に注入し滲出細胞浮遊液を回収した。滲出細胞浮遊液は洗浄後, APC anti-mouse F4/80 (Biolegend), PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD80 (Biolegend) で染色を行った。染色後に FACS Verse(BD Biosciences)を用いて測定を行った。測定後のデータは Flowjo(Tomy Digital Biology, USA)で分析を行った。また, Isotype Control として PE/Cy7 Rat IgG₁, κ (Biolegend), Per/Cy5.5 Rat IgG₁, κ (Biolegend), PerCP/Cy5.5 Armenian Hamster IgG(Biolegend), APC Rat IgG_{2a}, λ (Biolegend)を使用した。

5. 血漿中のサイトカイン濃度測定

血漿中のサイトカイン濃度は, ELISA 法により測定した。Interleukin-17(IL-17), Interferon- γ (IFN- γ), Tumor necrosis factor alpha(TNF- α), Osteoprotegerin(OPG)濃度は, Quantikine ELISA Kit (R&D systems, USA)を用いて測定した。

6. IL-4 中和抗体による影響

OVX を施行したマウスに対して, OVX 施行翌日に, IL-4 の中和抗体として Monoclonal

antibody Mouse IL-4(U-CyTech, Netherlands)を 25 μ g 腹腔内に投与した. IL-4 中和抗体単独投与群および IL-4 中和抗体と SHED-CM 併用投与群, コントロール群として Rat IgG₁(Thermo Fisher Scientific, USA)投与群, Sham 群について各種の解析を行った(図 5-A).

7. 統計分析

各群間は, 解析ソフトウェア Statview(SAS Institute, USA)を用いて多重比較検定による有意差検定を行なった.

結果

1. 試料の観察(大腿骨 μ CT 分析)

μ CT 画像において骨梁の減少を認めない Sham 群と比較すると, SF-MEM 群では成長板直下の骨梁減少が著明であるが, SHED-CM 群では骨梁の残存を認めた(図 1-B). μ CT 画像解析において全骨体積は, SF-MEM 群では, Sham 群と比較し有意に低い値を示した. また, SHED-CM 群および DPSC-CM 群では, SF-MEM 群と比較し有意に高い値を示した. SHED-CM 群では, DPSC-CM 群と比較し, 有意に高い値を示した. 皮質骨体積は, SF-MEM 群では, Sham 群と比較し有意に低い値を示した. また, SHED-CM 群および DPSC-CM 群では, SF-MEM 群と比較し有意に高い値を示した. SHED-CM 群では, DPSC-CM 群と比較し, 有意に

高い値を示した。骨梁体積は, SF-MEM 群では, Sham 群と比較し有意に低い値を示した。また, SHED-CM 群および DPSC-CM 群では, SF-MEM 群と比較し有意に高い値を示した。SHED-CM 群と DPSC-CM 群間では, 有意差を示さなかった(図 1-C)。骨密度は, 全骨および皮質骨で SF-MEM 群では, Sham 群と比較し有意に低い値を示した。また, SHED-CM 群は, SF-MEM 群と比較し有意に高い値を示した。SHED-CM 群は, DPSC-CM 群と比較し, 有意に高い値を示した。しかし, 骨梁密度では, 各群間に有意差は認められなかった(図 1-D)。骨量(BV/TV)は, SF-MEM 群では Sham 群と比較し有意に低下していたが, Sham 群と SHED-CM 群間では, 有意差は認められなかった。また, DPSC-CM 群は SHED-CM 群と比較し, 有意に低下していた(図 1-E)。骨幅についても, SF-MEM 群では Sham 群と比較し有意に低下していたが, Sham 群と SHED-CM 群間では, 有意差は認められなかった。また, DPSC-CM 群は SHED-CM 群と比較し, 有意差に低下していた(図 1-F)。

2. 試料の観察(大腿骨における組織学的分析)

H. E. 染色では大腿骨成長板下において, Sham 群, SHED-CM 群と DPSC-CM 群で骨梁の残存が認められるのに対し, SF-MEM 群では骨梁が減少していた(図 2-A, B)。TRAP 染色ではすべての群で破骨細胞を認めたが, 観察された破骨細胞数は, SF-MEM 群では Sham 群と比較し, 有意に増加していた。しかし, SHED-CM 群, DPSC-CM 群では OVX を実施後にも関わらず, Sham 群との有意差は確認されなかった(図 2-C, D)。

3. 試料の観察(腰椎における実体顕微鏡での分析)

前頭断で切断した腰椎の骨梁構造について観察を行ったところ, SF-MEM 群および DPSC-CM 群では中央部の骨梁の消失が認められた. SHED-CM 群では OVX 実施後にも関わらず, Sham 群と類似した骨梁構造が観測された(図 2-E, F).

3. FACS 分析

末梢血における CD4 および CD8a 陽性細胞数は, Sham 群と比較し SF-MEM 群で有意に増加していたが, SHED-CM 群と DPSC-CM 群および SF-MEM 群との比較では有意差を認めなかった(図 3-A, B, C). 末梢血における IL-17 産生細胞数は, SF-MEM 群では Sham 群と比較し, 有意差に高い値を示した. また, SHED-CM 群および DPSC-CM 群では SF-MEM 群と比較し, 有意差に低い値を示した(図 3-D, E). 末梢血における IFN- γ 産生細胞数は, SF-MEM 群では Sham 群と比較し, 有意差に高い値を示した. また, SHED-CM 群および DPSC-CM 群では SF-MEM 群と比較し, 有意差に低い値を示した(図 3-F, G). 腹腔内マクロファージの分布については, M1 マクロファージのマーカーである CD80 陽性細胞(F4/80⁺CD80⁺MNCs)の発現比率は, Sham 群と SF-MEM 群では統計学的な有意差は認めなかったが, SHED-CM 群と DPSC-CM 群では, SF-MEM 群と比較して有意に低い値を示した(図 3-H, I). 一方, SHED-CM 群と DPSC-CM 群では M2 マクロファージのマーカーである F4/80 陽性 CD80 陰性

(F4/80⁺CD80⁺ MNCs)の細胞集団が顕著に出現していた(図 3-H, J). F4/80⁺CD80⁺ MNCs の発現比率は, SHED-CM 群と DPSC-CM 群間では, SHED-CM 群が有意に高い値を示した(図 3-J).

4. 血漿中サイトカイン濃度測定

炎症性サイトカインである IL-17, IFN- γ , TNF- α および破骨細胞分化抑制因子である OPG の血漿中の濃度を ELISA で分析した. IL-17, IFN- γ , TNF- α は OVX 実施により上昇しており, SF-MEM 群と比較して SHED-CM 群で有意に低下していた. IL-17 については SF-MEM 群と比較して DPSC-CM 群でも有意な低下を認めた. 破骨細胞分化抑制因子である OPG は, Sham 群で最も高く, OVX を実施した SF-MEM 群, SHED-CM 群, DPSC-CM 群において有意な低下を認めた(図 4-A, B, C, D).

5. IL-4 中和抗体による影響

μ CT 画像において Sham 群では, 骨梁の残存が認められるのに対し, IgG₁ 投与群, IL-4 中和抗体投与群, IL-4 中和抗体および SHED-CM 併用投与群では, 成長板直下の骨梁減少が著明であった(図 5-B). μ CT 画像解析では, 全骨体積, 皮質骨体積および骨梁体積, すべての解析項目において, Sham 群に比較し, IgG₁ 投与群, IL-4 中和抗体投与群, IL-4 中和抗体および SHED-CM 併用投与群では, 有意に低い値を示した. IgG₁ 投与群, IL-4 中和抗体投与群, IL-4 中和抗体および SHED-CM 併用投与群間では, 統計学的有意差は認められなかった. 全骨

密度および皮質骨密度においては, Sham 群に比較し, IgG₁ 投与群, IL-4 中和抗体投与群, IL-4 中和抗体および SHED-CM 併用投与群では, 有意に低い値を示した. IgG₁ 投与群, IL-4 中和抗体投与群, IL-4 中和抗体および SHED-CM 併用投与群間では, 統計学的有意差は認められなかった(図 5-D). 末梢血における IL-17 産生細胞数は, Sham 群に比較し, IgG₁ 投与群, IL-4 中和抗体投与群, IL-4 中和抗体および SHED-CM 併用投与群では, 有意に高い値を示した(図 5-E). また, IFN- γ 産生細胞数は, IL-4 中和抗体投与群, IL-4 中和抗体および SHED-CM 併用投与群では, Sham 群と比較し有意差に高い値を示した(図 5-F). 腹腔内における M1 マクロファージの比率(F4/80⁺CD80⁺MNCs)は, IgG₁ 群では Sham 群と比較し有意に低い値を示したが, IL-4 中和抗体投与群, IL-4 中和抗体および SHED-CM 併用投与群では, 有意に高い値を示した(図 5-G).

考察

MSCは, 全身の間葉系組織に分布する体性幹細胞であり, 中胚葉系細胞に分化する分化能を有する他⁹⁾, 胚葉の異なる神経細胞や肝細胞へ分化することが報告されている. MSCの重要な機能として, 多分化能以外に強力な免疫調整能を有していることが挙げられる¹¹⁾. MSCの免疫調整機能は, 複数の機序を介して免疫担当細胞を制御していることが明らかになっている. Akiyamaらは, MSCがT細胞との細胞接触によって, T細胞のFas経路を活性化し

一過性にT細胞のアポトーシスを誘発することで、過剰なT細胞の増殖を制御すると報告している¹³⁾。また、MSCから産生されるProstaglandinE₂, Transforming growth factor beta1やHepatocyte growth factorなどのサイトカインが、T細胞の細胞周期や増殖を制御するとの報告もなされている^{14,15)}。さらに、MSCが、炎症性サイトカインであるIL-17を産生するリンパ球の分化を抑制するだけでなく、抗炎症性作用を持つTreg細胞を活性化させるといった報告もなされている¹⁶⁾。そのため、このような免疫調整機能を持つMSCが、自己免疫疾患に対して有効な治療となることが報告されている。例えば、全身性エリテマトーデスや多発性硬化症などの自己免疫疾患患者に対してMSCの移植を行うと、レシピエント側に免疫寛容が生じ、症状が緩和することが示されている^{17,18)}。

骨粗鬆症治療の開発を行う上で、骨粗鬆症発症モデル動物は、重要な知見を与えてくれる。骨粗鬆症は、骨組織のリモデリングを制御する遺伝的要因やホルモンなどの内因性因子と、栄養や身体などの外因性因子との複雑な相互作用によって引き起こされるが、閉経後のエストロゲンの産生低下によって骨粗鬆症が発症することは、良く知られた事象である¹⁹⁾。そのため、卵巣摘出(OVX)マウスは、ヒトの骨粗鬆症の原因解明と治療薬の開発に最も重要なモデルとされている。エストロゲン欠乏による骨粗鬆症の発症は、その原因については完全には解明されていないが、幾つかの機序が提唱されている。Sunらは、エストロゲンの欠乏が、脳下垂体からの卵胞刺激ホルモン(FSH)の分泌亢進を引き起こし、過剰に増加したFSHが破骨細胞の分化を促進していると、報告している²⁰⁾。またNakamuraらは、FasL異

変マウスではOVXを施行しても、野生型と比較し破骨細胞数や骨量に変化を認めないことから、エストロゲンは、破骨細胞内のFasLに直接作用して破骨細胞のアポトーシスを誘導していると報告している²¹⁾。エストロゲン欠乏は、骨髄内のT細胞における炎症性サイトカインの産生を亢進し、破骨細胞を活性化させるとの報告もある^{22,23)}。さらに、エストロゲン欠乏の状態では、骨髄のプレB細胞が選択的に増加していることから、B細胞の抗体産生亢進が骨吸収に関与しているとの報告もある^{24,25)}。以上の報告から、エストロゲン欠乏に起因した骨吸収は、ホルモンバランスの変化の他に、免疫機能の異常が重要な役割を果たしている。

Shiらのグループは、動物実験において、MSCが骨粗鬆症の治療法となり得ることを報告している²⁶⁾。OVXマウスに対してSHED移植を行ったところ、OVXによる骨吸収が完全に改善されることを示している。この作用機序について、移植されたSHEDが活性化したTh17細胞のFas経路を活性化し、Th17細胞のアポトーシスを誘導することで、間接的に破骨細胞の分化を抑制すると報告している。SHED移植は、骨粗鬆症に対して有効的な治療法と思われるが、細胞移植は、免疫拒絶の危険性、移植細胞の生着率の低さ、移植した細胞の腫瘍形成や培養に関わる安全性など、実際に臨床応用を実施する上で、解決しなければならない課題が山積されている。一方、幹細胞が産生する分泌因子には、様々な治療効果があることが報告されている^{11,12)}。そのため、MSCから分泌されるサイトカインなどの細胞シグナルやエキソソームもまた、多くの疾患の創薬として研究が行われている。そこで本研究は、SHED

分泌因子が骨粗鬆症の治療に効果があるか検討を行なった。

我々の実験では, SHED-CMの投与を行ったOVXマウスでは, 骨吸収が抑制されるとともに出現している破骨細胞数が減少していた(図1). 破骨細胞は造血系幹細胞に由来する多核巨細胞であり, 破骨細胞分化には種々のサイトカインの作用が必要であることが知られている. CD4陽性T細胞は様々なサイトカインを産生し免疫応答を制御することからヘルパーT細胞とも呼ばれる. 産生するサイトカインの種類によりヘルパーT1細胞, ヘルパーT2細胞, ヘルパーT17細胞, Treg細胞に分けられる. もうひとつのT細胞サブセットとして, CD8陽性T細胞が挙げられる. 標的細胞を特異的に認識して傷害することからキラーT細胞とも呼ばれる. そこで今回は, 破骨細胞の活性を促進する炎症性サイトカインであるIL-17, IFN- γ , TNF- α についてSHED-CM投与後の変動を検討したところ, OVXによって増加した末梢血中のサイトカイン濃度は, 正常値まで減少していた(図4-A, B, C). これらの炎症性サイトカインの濃度が改善した理由は, SHED-CM投与により血中のTh17細胞とIFN- γ 産生細胞数の減少によるものと考えられる(図3-D, E, F, G). つまり, SHED-CMの投与によって, IFN- γ , TNF- α , IL-17の血漿中の濃度が低下し, 間接的に破骨細胞の分化を抑制していることが示唆された. 一方, MSCは, OPGの分泌能を有することが報告されている²⁷⁾. そこで本実験において, 培養上清中に溶解しているSHED由来のOPGが実験結果に影響を及ぼしているか検証を行った. 血漿中のOPG濃度は, Sham 群と比較しSF-MEM群とSHED-CM群では, 有意に低い値を示した. しかし, SF-MEM群とSHED-CM群間では, 有意差は確認されなかった(図4-D). SF-MEM

群とSHED-CM群において、血漿中のOPG濃度がSham群より低い値を示したことは、OVXによる影響のためと推測されるが、本実験においてSHED-CM群で骨量の減少が抑制された結果については、血漿中のOPG濃度変動の影響は低いものと考えられる。SHED-CMの投与によってIL-17, IFN- γ , TNF- α などの炎症性サイトカイン濃度がSham群と比較し低い値を示したことについては、Shiらの実験結果と一致するものであるが、彼らは移植されたSHEDが、免疫細胞に直接作用することで、血漿中の炎症性サイトカイン濃度を下げることが報告している。しかし、我々の実験では、SF-MEM群とSHED-CM群間では、CD4およびCD8a陽性細胞数に有意差は確認されなかった(図3-A, B, C)。この結果は、Shiらの報告と相違するものであり、SHED-CM投与による骨吸収抑制効果は、SHEDと免疫細胞との直接のcell to cellを介した経路とは別の作用機序が存在して、破骨細胞による骨吸収を抑制している可能性があることが推測された。そこで我々は、T細胞とは別の免疫細胞であるマクロファージに注目した。

マクロファージは、自然免疫において中心的な役割を果たしているが、疾患の発症に関わる様々なサブタイプのマクロファージが存在していることが明らかになっている²⁹⁾。細菌やウイルス感染、アレルギー応答などの際に活性化するM1マクロファージと、抗炎症・免疫抑制機能をもったM2マクロファージに分別される。M1マクロファージは、多くの炎症性サイトカインを発現しTh1型の免疫応答を誘導する。M2マクロファージは、抗炎症性メディエーターを産生して損傷反応の消退と組織修復を促進する。破骨細胞の分化には、M1マク

ロファージとM2マクロファージが関わっていることが報告されている²⁹⁾. そこで, M1マクロファージとM2マクロファージの比率を調べるため, 腹腔内のマクロファージに対して, 全マクロファージのマーカーであるF4/80とM1マクロファージのマーカーであるCD80の二重染色を行なった. FACS解析結果, Sham群とSF-MEM群ではわずかに存在していなかったM2マクロファージ(F4/80⁺CD80⁻MNCs)が, SHED-CM群ではM2マクロファージの比率が有意に増加していることが確認された(図3-H, I, J). SHED-CM群におけるM2マクロファージ比率の増加は, 投与したSHED-CMによって引き起こされたと推測される. そこで, M2マクロファージの分化に必要なIL-4の中和抗体の投与を行った. その結果, 骨体積量において, IgG₁投与群とIL-4中和抗体およびSHED-CM併用投与群間には統計学的有意差がないことから, IL-4中和抗体およびSHED-CM併用投与群では, SHED-CM投与しているにも関わらず, OVXによる骨吸収が抑制されなかったことを示している(図5-B, C, D). さらに, 血漿中のIL-17とIFN- γ 濃度については検討を行っていないが, 血中のTh17とIFN- γ 産生細胞数は, IL-4中和抗体の投与を行った実験群では, 有意に増加していた(図5-E, F). つまり, 血中のTh17とIFN- γ 産生細胞数の増加は, 中和抗体の影響によりM2マクロファージへの分化が抑制されたことが原因と考えられる.

SHED培養上清による骨吸収抑制効果は, 培養液中に存在する何らかの因子が, M2マクロファージの分化に影響を与えたものと推測される. しかし, 今回の研究では, M2マクロファージに影響を与えた因子については検索を行っていない. 今回の実験では, SHED-CMと

ともに, DPSC-CMについても検討比較を行なった. SHED-CM群では骨吸収抑制効果が確認されたが, SHED-CM群とDPSC-CM群を比較した結果, DPSC-CM群では効果が低いことが明らかになった(図1-B, C, D, E, F). DPSCは, SHED同様に歯髄組織に存在するMSCであり, 共に細胞増殖能, コロニー形成能, 多分化能等多くの類似した特性を有していることが報告されている³⁰⁾. しかし, 遺伝子や細胞表面抗原の発現において両者に違いがあることも報告されている. 今回の研究においても, 骨吸収抑制効果に差が生じたことは, 両者の幹細胞としての特性の差が現れたと考えられる. 両者の培養液中に含まれている分泌因子の差を比較検討することで, 骨吸収抑制効果に影響を与えた特定の因子を同定できる可能性があり, さらなる研究が必要と思われる.

結論

骨粗鬆症に対する SHED-CM の治療効果について検討を行なった. マウスの腹腔内に SHED-CM を投与したところ, OVX による骨粗鬆症の病態は改善を認めた. SHED-CM による骨吸収抑制効果は, M2 マクロファージを介した IL-17 および IFN- 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. 本研究により, SHED-CM は骨粗鬆症に対する有効な治療戦略となることが示唆された.

謝辞

本稿を終えるにあたり数々のご援助，ご協力をいただきました北海道大学歯学研究院
小児・障害者歯科学教室，細胞分子薬理学教室および学術支援部の教室員各位に厚く御礼
申し上げます．

文献

- 1) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T: Cohort profile: research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study. *Int J Epidemiol*, 39(4): 988-995, 2010.
- 2) Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*, 72(10): 1938-1956, 2014.
- 3) Barrett E: Hormone replacement and cancer. *Br Med Bull*, 48(2): 345-355, 1992.
- 4) Lacey JV, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, Schairer C: Monopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA*, 288(3): 334-341, 2002.
- 5) Marx RE: Pamidronate(Aredia) and zoledronate(Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *61(9): 1115-1117*, 2003.
- 6) Saad F, Brown JE, Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, Diel IJ, Takahashi S, Shore

- N, Henry DH, Barrios CH, Facon T, Senecal F, Fizazi K, Zhou L, Daniels A, Carriere P, Dansey R: Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol*, 23(5): 1341-1347, 2012.
- 7) Jollette J, Wilker CE, Smith SY, Doyle N, Hardisty JF, Metcalfe AJ, Marriott TB, Fox J, Wells DS: Defining a noncarcinogenic dose of recombinant human parathyroid hormone 1-84 in a 2-year study in fischer 344 rats. *Toxicol Pathol*, 34(7): 929-94, 2006.
- 8) Subbiah V, Madsen VS, Raymond AK, Benjamin RS, Ludwig JA: Of mice and men: divergent risks of teriparatide-induced osteosarcoma. *Osteoporos Int*, 21(6): 1041-1045, 2010.
- 9) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Monica JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-147, 1999.
- 10) Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, Shi S: SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*, 14(5): 428-434, 2008.
- 11) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosyu K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R: Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 30(1): 42-48, 2002.
- 12) Mita T, Furukawa Y, Takeuchi H, Hattori H, Yamada K, Hibi H, Ueda M, Yamamoto A:

Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, 293: 189-197, 2015.

13) Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S: Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*, 10(5): 544-555, 2012.

14) Nicola M, Stella C, Magni M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM: Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10): 3838-3843, 2002.

15))Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F: Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105(7): 2821-2827, 2005.

16) Ghannam S, Pene J, Moquet G, Jorgensen C, Yssel H: Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol*, 185(1): 302-312, 2010.

17) Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, Hou Y, Zeng X, Gilkenson GS, Sun L: Allogenic mesenchymal stem cell transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis*, 69(8): 1423-1429, 2010.

18) Connick P, Kolappan M, Crawlry C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, Du MQ, Luan SL, Altmann DR, Thompson AJ, Compston A, Scott MA, Miller DH, Chandran S: Autologous

- mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-concept study. *Lancet Neurol*, 11(2): 150-156, 2012.
- 19) Raisz LG: Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*, 2(1): 5-12, 2001.
 - 20) Sun L, Peng Y, Sharrow AC, Iqbal J, Zhang Z, Papachristou DJ, Zaidi S, Zhu LL, Yaroslavskiy BB, Zhou H, Zallone A, Sairam MR, Kumar TR, Bo W, Braun J, Cardoso L, Schaffer MB, Moonga BS, Blair HC, Zaidi M: FSH directly regulates bone mass. *Cell*, 125(2): 247-260, 2006.
 - 21) Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S: Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130(5): 811-823, 2007.
 - 22) Kawaguchi H, Pilbeam CC, Vargas SJ, Morse EE, Lorenzo JA, Raisz LG: Ovariectomy enhances and estrogen replacement inhibits the activity of bone marrow factors that stimulate prostaglandin production in cultures mouse calvariae. *J Clin Invest*, 96(1): 539-548, 1995.
 - 23) Pacifici R: Estrogen deficiency, T cells and bone loss. *Cell Immunol*, 252(1-2): 68-80, 2008.
 - 24) Masuzawa T, Miyaura C, Onoe Y, Kusano K, Ohta H, Nozawa S, Suda T: Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J Clin Invest*, 94(3): 1090-1097, 1994.
 - 25) Miyaura C, Onoe Y, Inada M, Maki K, Ikuta K, Ito M, Suda T: Increased B-lymphopoiesis by

- interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. Proc Natl Acad Sci USA, 94(17): 9360-9365, 1997.
- 26) Liu Y, Wang L, Liu S, Liu D, Chen C, Xu X, Chen X, Shi S: Transplantation of SHED prevents bone loss in the early phase of ovariectomy-induced osteoporosis. J Dent Res, 93(11): 1124-1132, 2014.
- 27) Li GC, Ye QH, Xue YH, Sun HJ, Zhou HJ, Ren N, Jia HL, Shi J, Wu JC, Dai C, Dong QZ, Qin LX: Human mesenchymal stem cells inhibit metastasis of a hepatocellular carcinoma model using the MHCC97-H cell line. Cancer Sci, 101(12): 2546-2553, 2010.
- 28) Murray PJ Wynn TA: Protective and pathogenic function of macrophage subsets. Nat Rev Immunol, 11(11): 723-737, 2011.
- 29) Lu LY, Loi F, Nathan K, Lin Pajarinen J, Gibon E, Nabeshima A, Cordova L, Jamsen E, Yao Z, Goodman SB: Pro-inflammatory M1 macrophages promote Osteogenesis by mesenchymal stem cells via the COX-2-prostaglandin E2 pathway. J Orthop Res, 35(11): 2378-2385, 2017.
- 30) Huang G, Gronthos S, Shi S: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res, 88: 792-806, 2009.

図説

図 1 実験プロトコールと大腿骨における μ CT 解析

A.実験プロトコール B.大腿骨 μ CT 画像 C.大腿骨各部位における骨体積 D.大腿骨各部位における骨密度 E.大腿骨の骨量 F.大腿骨の骨幅 *P<0.01,**P<0.005,***P<0.001 Mean $\pm$ S.E.

図2 大腿骨および腰椎における形態解析

A.大腿骨遠位端における HE 染色 B.大腿骨遠位端における骨梁量 C.大腿骨遠位端における TRAP 染色 D.大腿骨遠位端における破骨細胞数 E.腰椎の前頭断面 E.腰椎における骨梁量 *P<0.01,**P<0.005,***P<0.001 Mean $\pm$ S.E.

図3 FACS 解析

A-C.末梢血における CD4 陽性 T 細胞と CD8a 陽性 T 細胞の割合 D,E.末梢血における IL-17 産生細胞数の割合 F,G.末梢血における IFN- γ 産生細胞数の割合 H-J.腹腔内マクロファージにおける F4/80 陽性細胞および CD80 陽性細胞の割合 *P<0.01,**P<0.005,***P<0.001 Mean $\pm$ S.E.

図4 血漿中のサイトカイン濃度

A.IL-17 濃度 B.IL-17 濃度 C.TNF- α 濃度 D.OPG 濃度 *P<0.01,**P<0.005,***P<0.001 Mean $\pm$ S.E.

図 5 IL-4 中和抗体投与後の解析結果

A.実験プロトコール B.大腿骨 μ CT 画像 C.大腿骨各部位における体積 D.大腿骨各部位における密度 E.末梢血の IL-17 産生細胞数の割合 F.末梢血の IFN- γ 産生細胞数の割合 G,H.腹腔内マクロファージにおける F4/80 陽性細胞および CD80 陽性細胞の割合

*P<0.01,**P<0.005,***P<0.001 Mean $\pm$ S.E.

図

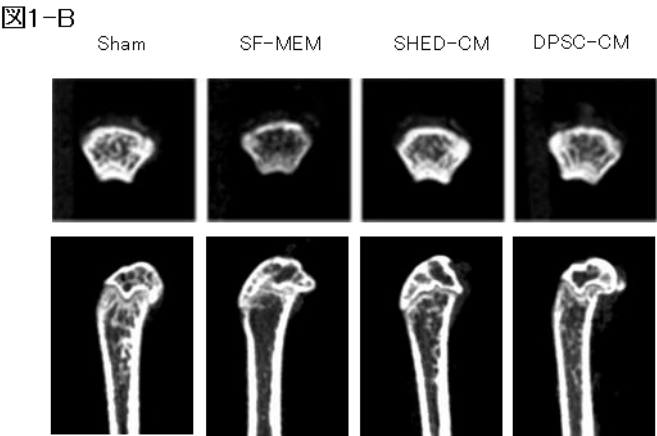
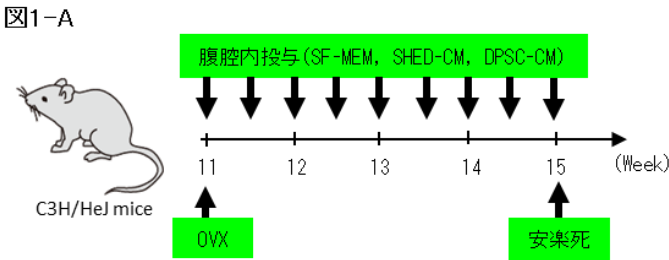


图1-C

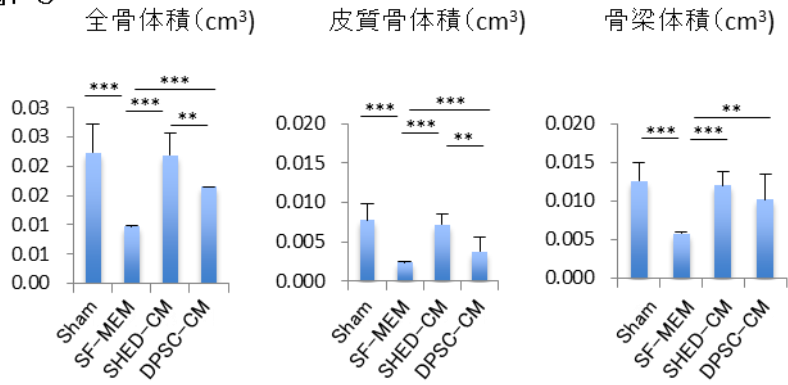


图1-D

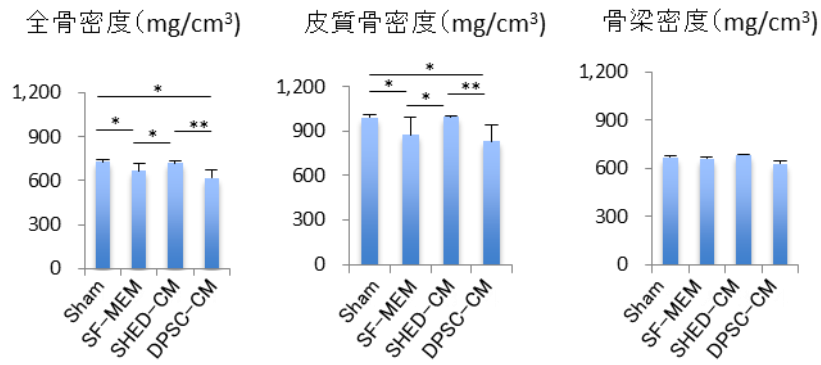


图1-E

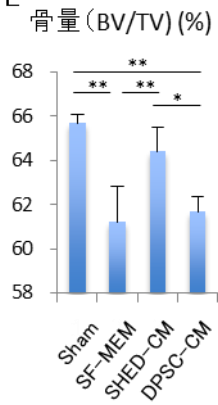


图1-F

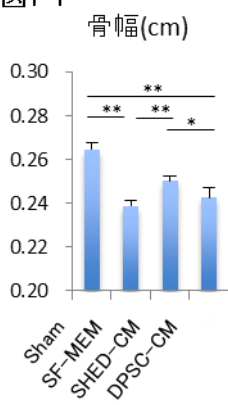


図2-A

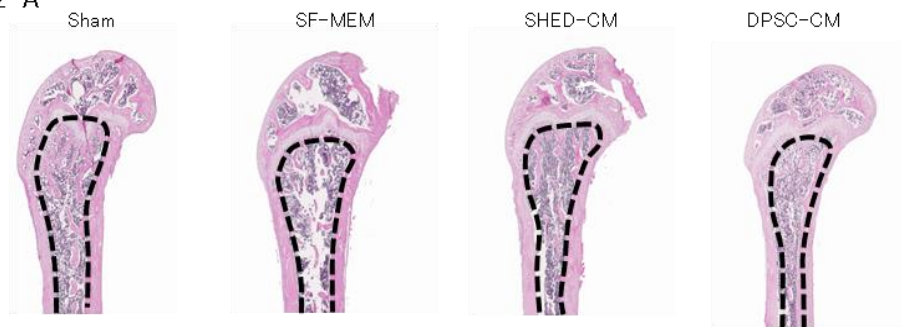


図2-B

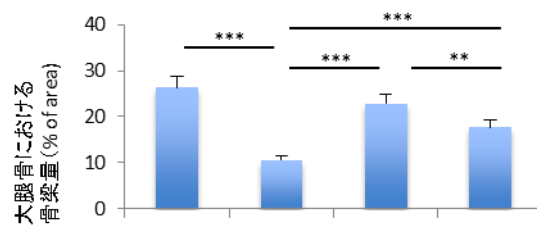


図2-C

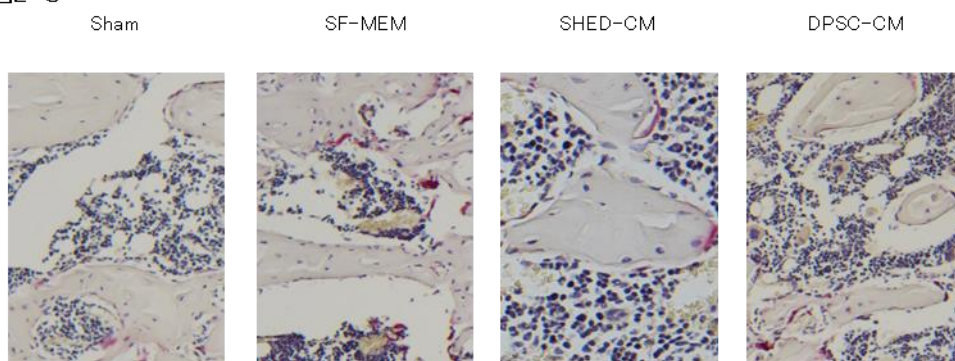


図2-D

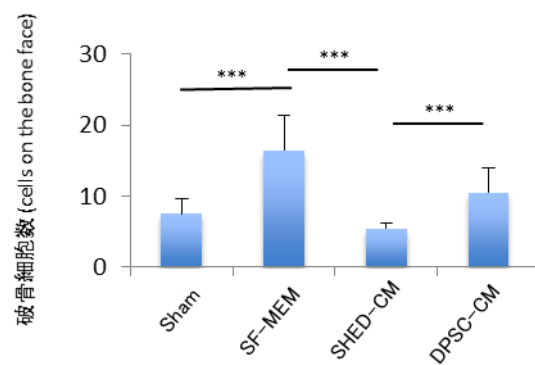


図2-E

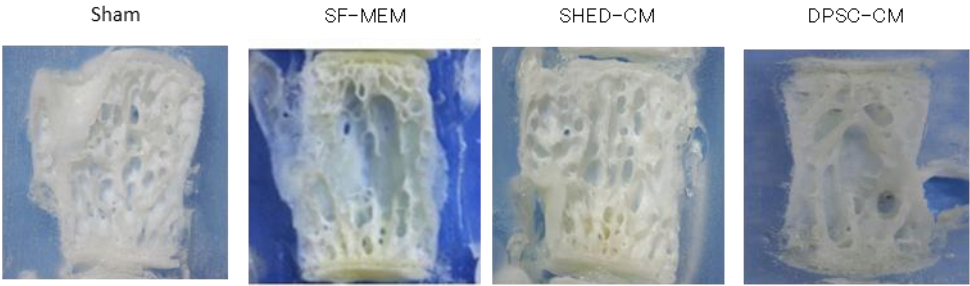


図2-F

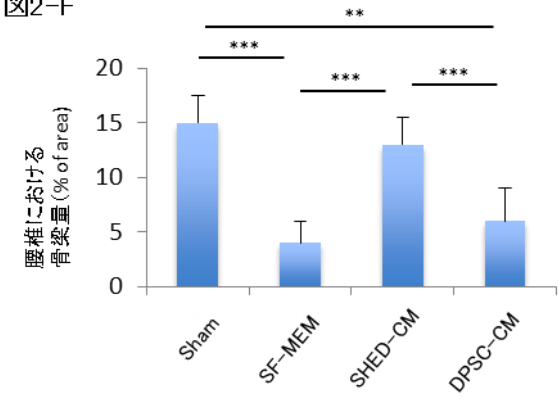


図3-A

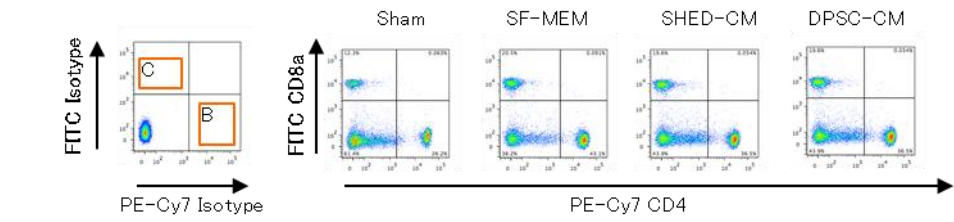


図3-B

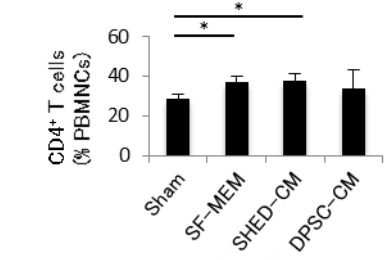


図3-C

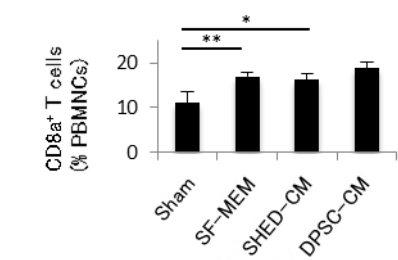


图3-D

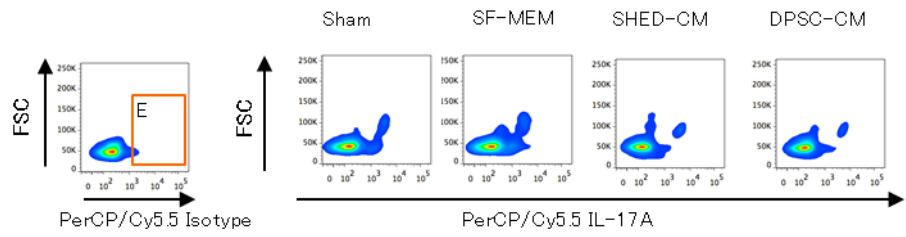


图3-E

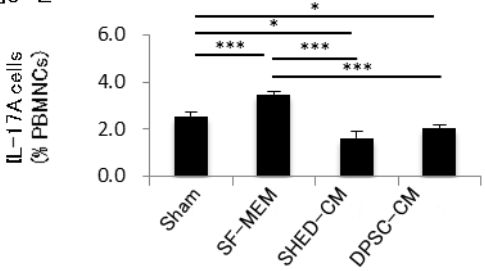


图3-F

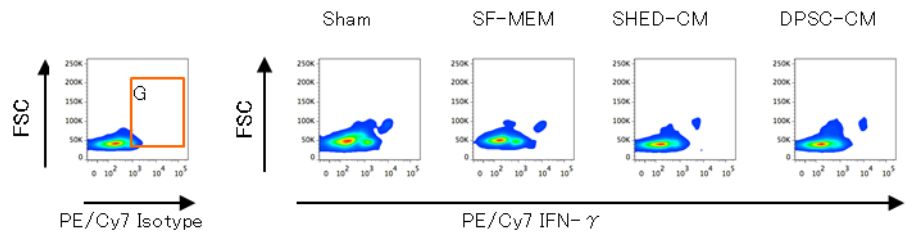


图3-G

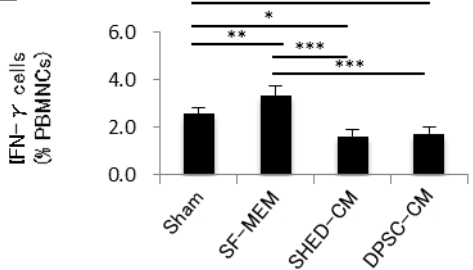


Figure 3-H

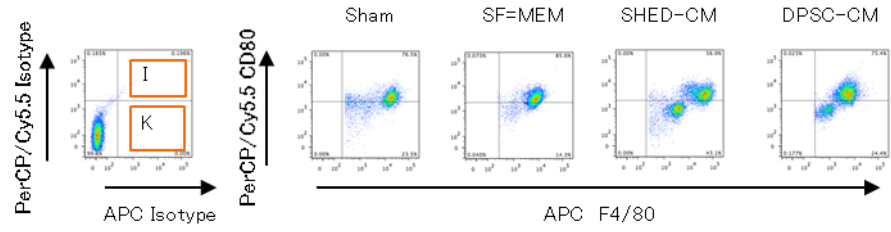


Figure 3-I

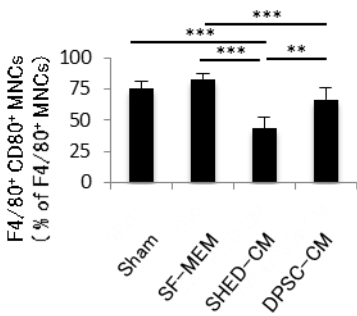


Figure 3-J

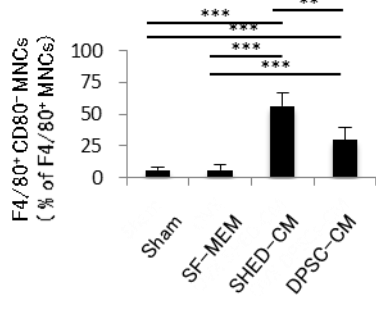


Figure 4-A

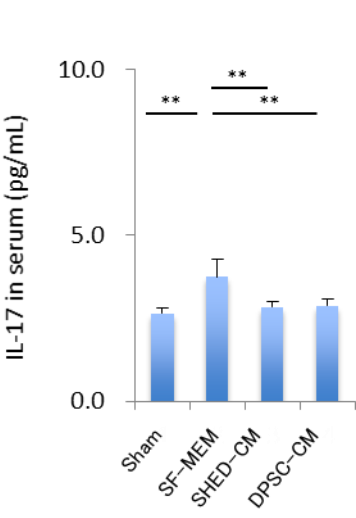


Figure 4-B

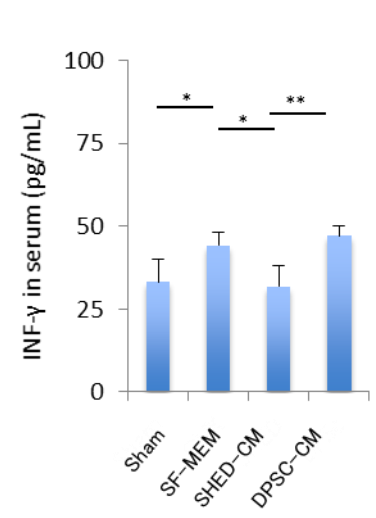


图4-C

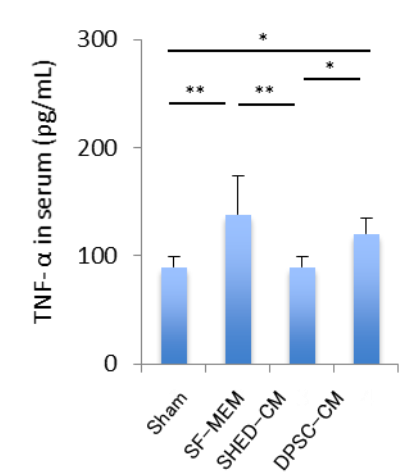


图4-D

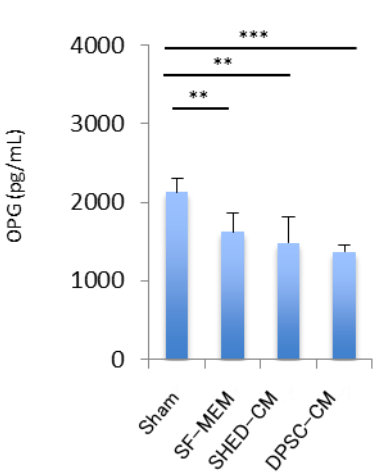


图5-A

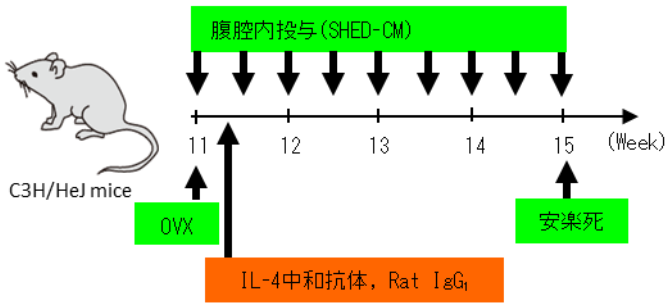
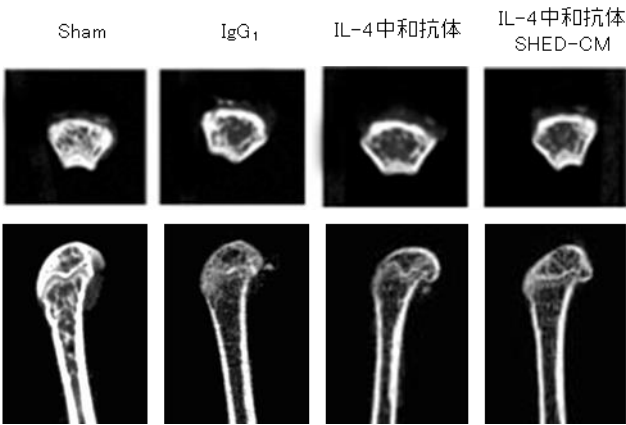


图5-B



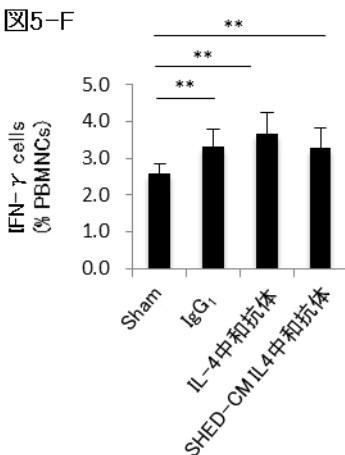
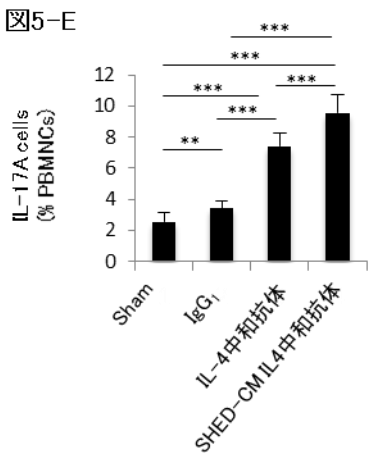
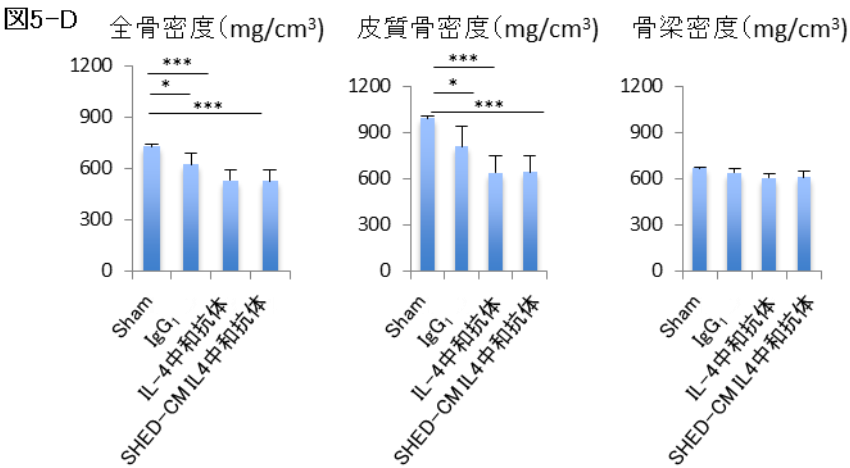
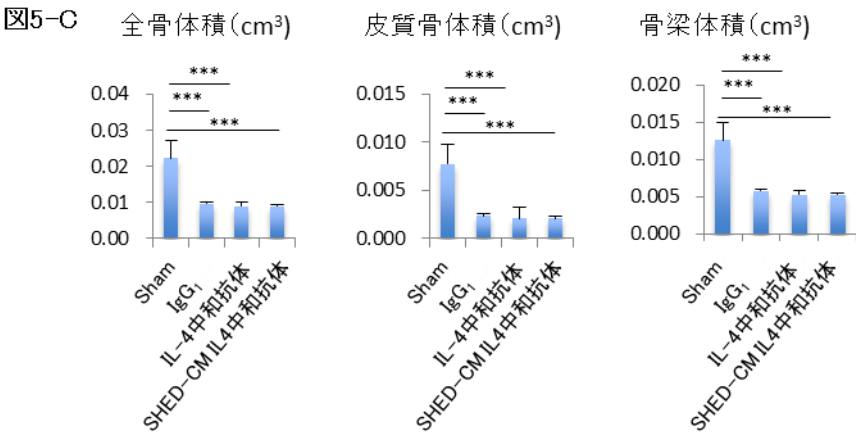


図5-G

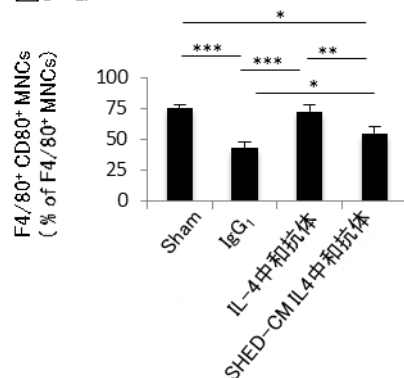
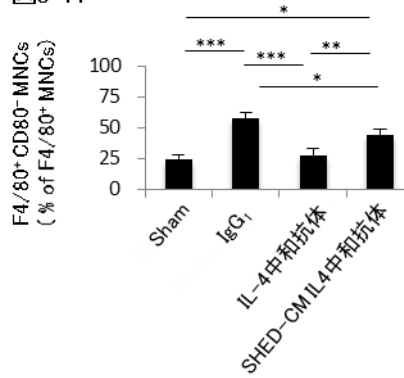


図5-H



英語抄録

Improvement of the bone resorption by condition medium of SHED in ovariectomized mice

Ayako Maeda ¹⁾, Takashi Kikuri ²⁾, Takahiro Sugiyama ³⁾, Daisuke Izumiyama ⁴⁾,

Daigo Yahata ⁴⁾, Yoshitaka Yoshimura ⁵⁾ and Yasutaka Yawaka ²⁾

¹⁾ Department of Dentistry for Children and Disabled Person, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University(Chief: Prof. Yasutaka Yawaka), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾ Department of Dentistry for Children and Disabled Person, Faculty of Dental

Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University Hokkaido University (Chief: Prof. Yasutaka Yawaka), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

- 3) Department of Oral Diagnosis and Medicine, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University(Chief: Prof. Yoshimasa Kitagawa), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan
- 4) Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University(Chief: Prof. Kanyu Tei), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan
- 5) Department of Molecular Cell Pharmacology, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Associate prof. Yoshitaka Yoshimura), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

Keywords: SHED, osteoporosis, macrophage

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) are mesenchymal stem cells that exist in deciduous dental pulp tissue. Studies have reported that the secretory component from SHED plays a role in tissue repair and immune system adjustment. This

study aimed to evaluate the efficacy of SHED against osteoporosis.

SHED were separated from deciduous teeth, which fell out during the exchange period, and were subcultured. When cells were 80% confluent, the culture supernatant was exchanged with a serum-free medium. After being further cultured for 24 hours, the culture supernatant was harvested for use in an experiment. Ovarian extraction (OVX) was performed on 11-week-old female C3H/HeJ mice who were intraperitoneally administered a serum-free medium (SF-MEM group) or an SHED culture supernatant (SHED-CM group) twice a week. Four weeks after initiating the administration, the state of the femur bone mass was observed using micro-computed tomography. In addition, the macrophage fractions in the intraperitoneal fluid and interleukin-17 (IL-17) and interferon-gamma (IFN- γ)-producing cell numbers in the peripheral blood were analyzed using fluorescence-activated cell sorting.

The femur bone mass was significantly high and the number of IL-17 and IFN- γ -producing cells was significantly low in the SHED-CM group compared with the SF-MEM group. The M2 macrophages in the intraperitoneal fluid increased significantly in the SHED-CM group. Further, the suppression of M2 macrophage expression using a neutralizing antibody demonstrated no significant difference between the number of IL-17 and IFN- γ -producing cells and bone mass in the SF-MEM group despite SHED-MEM

administration.

In osteoporosis caused by OVX, SHED-CM exhibits an inhibitory effect on bone resorption, and this effect is suggested to be associated with the activities of M2 macrophage, IL-17, and IFN- γ -producing cells.