

令和元年6月20日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11700

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞を用いた新規三次元骨再生医療戦略

研究課題名(英文) Novel three-dimensional bone regenerative medicine strategy using human dental pulp stem cells

研究代表者

古賀 陽子 (YOKO, Kawase-Koga)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10392408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯髄幹細胞(DPSCs)に骨芽細胞誘導能を有する低分子化合物であるヘリオキサントイン誘導体(TH)を用いることにより高効率な骨分化誘導法の確立、さらにTH添加培地で作製したDPSCシートによるin vivoにおける骨再生能を検討した。in vitroでのTHによるDPSCsの骨分化誘導能について検討しTH(10-6M)群で、骨分化マーカーの発現が最も有意に上昇し、さらに早期に骨分化可能であることが分かった。その後、TH添加骨分化誘導培地にてDPSCsシートを作製し、マウス頭蓋骨欠損部への移植を行い、in vivo群で広範囲な骨再生を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、DPSCsの骨分化誘導におけるTHの有用性が示唆され、TH添加DPSCシート移植は、骨再生のための足場素材を必要としない簡便な移植法として期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Establishment of a highly efficient bone differentiation induction method by using helioxanthin derivative (TH), which is a small chemical compound having osteoblast-inducing ability for human dental pulp stem cells (DPSCs), and further using a DPSC sheet prepared with TH-added medium. The bone regeneration ability in vivo was examined. The ability of DPSCs to induce bone differentiation by TH in vitro was examined, and it was found that the expression of bone differentiation markers was most significantly increased in the TH (10-6 M) group, and that bone differentiation was possible by short-term culture with TH. Furthermore, DPSCs sheets were prepared in TH-added bone differentiation induction medium and transplanted to calvarial bone defect of mice, and extensive bone regeneration was observed in the in vivo group.

研究分野：再生医療、口腔外科

キーワード：歯髄幹細胞 3次元骨再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラントを要する歯牙欠損、歯周病、外傷、腫瘍切除後などの後天性骨欠損、また、口唇口蓋裂を始めとする先天性顎裂欠損や骨形成不全症などの不可逆性の骨欠損に対する治療は焦眉の課題であり、その治療法として骨再生療法が注目を浴びて久しい。現在までに簡便かつ効率的に骨組織を回復・再生させる方法は未だ見出されておらず、遊離自家骨移植や血管柄付骨移植などの再建外科医療にとって代わる治療法として、まさに再生医療が脚光を浴びている。人工骨における進歩も目覚ましいが、感染や露出の問題、また術中の操作性などに多くの問題を残している。このような問題を解決する細胞源として、ヒトES細胞、iPS細胞、骨髄間葉系幹細胞などが動物モデルを用いて解析されてきた。しかし、実用化に際しては、倫理面や移植安全性、分化細胞の低い作出効率、治療効果の不安定性、幹細胞採取における生体侵襲性など多くの問題を抱えているのが現状である。一方、近年の骨再生医療においては、成体幹細胞を生分解性の足場材料と組み合わせる骨欠損や変形部位へ移植する細胞移植に基づく戦略の有効性が示されている (Cell Prolif. 37:97-110, 2004 など) が、効率的な再生骨を得るまでには至っていない。このような現状下、われわれは、「細胞源・足場」の各要素を改善することに着目し、骨髄間葉系幹細胞よりも高い増殖能を有する歯髓幹細胞が三次元骨再生法への新たな幹細胞源になる可能性があると考えた。このヒト歯髓幹細胞は、2000年に Gronthos らがヒト歯髓に分化能の高い間葉系幹細胞が存在することを報告し (Proc Natl Acad Sci U S A, 2000) さらに、Miura らは脱落乳歯由来歯髓幹細胞 (SHED) において、骨芽細胞の前駆細胞でもある骨髄由来間葉系幹細胞と比較し約 3 倍の増殖能を有することを導き出し、in vitro において象牙芽細胞、脂肪細胞、神経細胞に分化することを報告した (Proc Natl Acad Sci U S A, 2003) 。さらに Inoue らは SHED の培養液を脳梗塞モデルラットに移植しその有効性を見出した (Tissue Eng Part A, 2012) 。このように歯髓幹細胞の応用は、特に脊髄損傷モデルや脳梗塞モデルなどの中枢神経系への有用性は報告されている。しかし、骨分化誘導に関する研究は存在するものの基礎的な研究は乏しく、高効率な骨芽細胞分化への分子メカニズムについては不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

われわれがこれまでに見出してきた骨形成シグナルに関する基礎的知見と骨形成低分子化合物群に関する知識を集約させ、さらに発展・融合させることで、日常診療において遭遇する抜去歯からのヒト歯髓幹細胞をソースとした高効率な骨芽細胞への分化誘導を行い、採取が容易である自家細胞を用いた新たな三次元骨再生医療戦略へとつなげることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髓幹細胞の高効率・安定的な骨分化法の開発：骨髄間葉系幹細胞にて骨芽細胞へと分化誘導が報告されている低分子化合物、ヘリオキサンチン誘導体 (TH) を使用することにより高効率かつ、安価で安全性の高いヒト歯髓幹細胞の骨芽細胞分化誘導法が確立できると仮定して、TH による誘導期間・濃度 (10⁻⁸ ~ 10⁻⁵M) を含めて検討し、歯髓幹細胞における骨芽細胞誘導条件の最適化を検討した。

(2) ヒト歯髓幹細胞由来骨芽細胞の三次元培養法の確立：(1) で得られたヒト歯髓幹細胞由来骨芽細胞を三次元培養へと導き、移植片を作製した。

(3) 動物実験による三次元骨移植片の骨誘導能に関する検証：免疫不全マウスを用いて、マウス頭頂骨臨界骨欠損モデル (直径 3.5mm) を作製した。このモデルは、単純な骨欠損形態での骨再生の評価に利用され、骨再生能の基礎的な評価にも適している。移植後、4、6、8 週の時点でマイクロ CT による 3 次元画像評価を行った。さらに、組織切片を作製し、HE 染色、マッソントリクローム染色を行い骨再生能の評価をした。

4. 研究成果

(1) アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色、リアルタイム PCR により、至適濃度は、10⁻⁶M であることが分かった。さらに、TH 添加により ALP、CollI、Osteocalcin などの骨芽細胞マーカーの発現の有意な上昇を認めた (図 1)。また、通常 4 週間の骨分化誘導期間を有するところ TH 添加により 2 週間での骨分化誘導が可能になった (図 2)。

(2) 計画当初はテトラポット型 -TCP 微小人工骨を用いて三次元培養を行う予定だったが、低分子化合物 (TH) を用いることで高効率な骨芽細胞誘導法を確立し、シート培養を積層することで三次元培

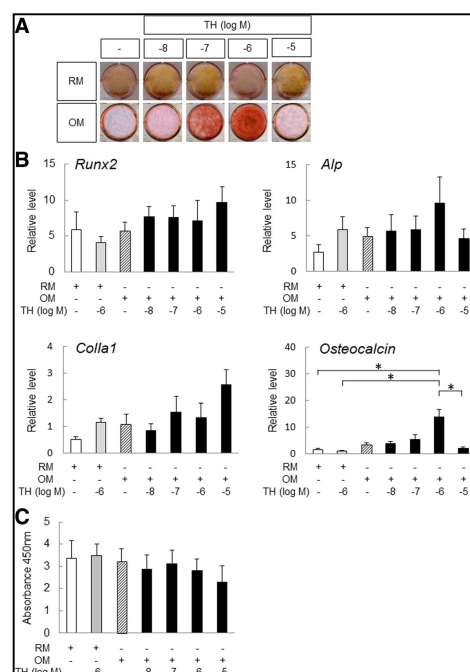


図 1. 発表雑誌論文 より引用

養に成功した。三次元培養には、シート培養を用いた。シート培養には温度応答性培養皿 (Up Cell®) を用いてヒト歯髄由来骨芽細胞シートを作製した。

(3) 積層したヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞シートを免疫不全マウスの頭頂骨臨界骨欠損マウスを作製し移植実験を行った。マイクロCT, 骨濃度、密度、および HE 染色、Masson Trichrome 染色より、TH 添加群で有意な骨形成を認め、その概要を国際英文誌 (*Stem Cell Res Ther*, 2018) に報告した。

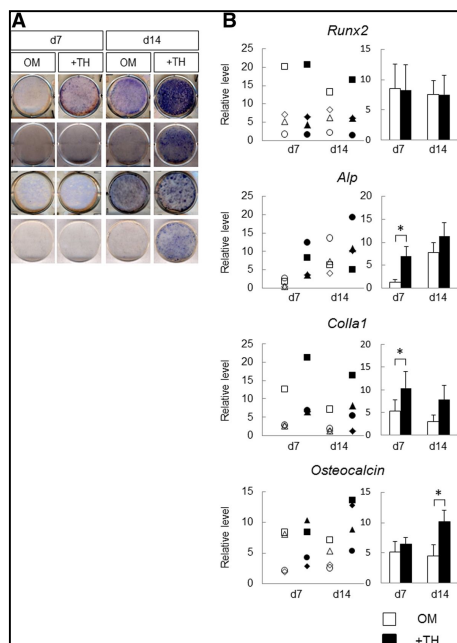


図 2. 発表雑誌論文 より引用

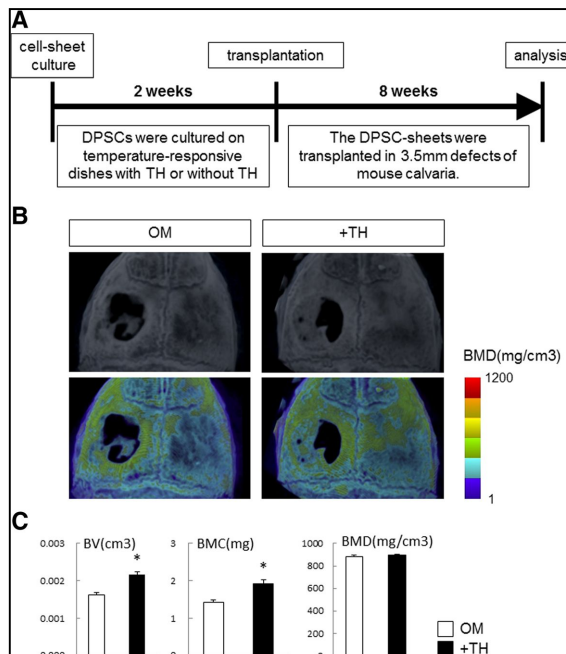


図 3. 発表雑誌論文 より引用

<引用文献>

Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif*. 2004 Feb;37(1):97-110.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(25):13625-30.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12.

Inoue T, Sugiyama M, Hattori H, Wakita H, Wakabayashi T, Ueda M. Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jan;19(1-2):24-9. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0385.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Fujii Y, **Kawase-Koga Y**, Hojo H, Yano F, Sato M, Chung UI, Ohba S, **Chikazu D**. Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin derivative and cell-sheet technology. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Feb 1;9(1):24. doi: 10.1186/s13287-018-0783-7. 査読有

Abukawa H, Ogawa T, Kono M, Koizumi T, **Kawase-Koga Y**, **Chikazu D**. Intravenous Dexamethasone Administration Before Orthognathic Surgery Reduces the Postoperative Edema of the Masseter Muscle: A Randomized Controlled Trial. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Jun;75(6):1257-1262. doi: 10.1016/j.joms.2016.12.048. 査読有

[学会発表](計 9 件)

Yasuyuki Fujii, **Yoko Kawase-Koga**, Marika Sato, Takafumi Satomi, **Daichi Chikazu**, Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin-derivate and cell-sheet technology, 24th Congress of the European Association for cranio Maxillo Facial Surgery, 2018, Munich, Germany

Yoko Kawase-Koga, Yasuyuki Fujii, Marika Sato, Daiki Yamakawa, Hayato Hamada, Michihide Kono, Masato Watanabe, Takafumi Satomi, **Daichi Chikazu**, 13th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Surgery, 2018, Taipei, Taiwan

藤居泰行、**古賀陽子**、佐藤麻梨香、北條宏徳、矢野文子、鄭雄一、大庭伸介、**近津大地**、ヘリオキサントン誘導体添加ヒト歯髄幹細胞シートによる骨再生能の検討、第 17 回日本

再生医療学会総会、2018

木本明、**古賀陽子**、渡辺正人、虻川東嗣、里見貴史、松尾朗、**近津大地**、東京医科大学における過去14年間の顎矯正手術に対する臨床的検討、第27回日本顎変形症学会総会・学術大会、2017

藤居泰行、**古賀陽子**、北條宏徳、大庭伸介、鄭雄一、**近津大地**、ヒト歯髄幹細胞の骨分化誘導におけるヘリオキサントン誘導体の有用性の検討、第16回日本再生医療学会総会、2017

藤居泰行、**古賀陽子**、矢野文子、大庭伸介、**近津大地**、ヒト歯髄幹細胞の骨分化誘導におけるヘリオキサントン誘導体の有用性、第62回日本口腔外科学会総会・学術大会、2017
古賀陽子、藤居泰行、池畑美紀子、虻川東嗣、長濱浩平、鈴木巖、**近津大地**、下顎枝矢状分割術後の早期プレート抜去術の有用性、第26回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会、2016

Y Kawase-Koga, Y Fujii, M Ikehata, N Ikehata, M Kono, H, Abukawa, **D Chikazu**, The usefulness of early plate removal in patients with occlusal discrepancies after sagittal split ramus osteotomy; focusing on positional relation of temporomandibular joint. 23rd Congress of the European Association for Cranio Maxillo-Facial Surgery, 2016, London, UK

Y Fujii, **Y Kawase-Koga**, **D Chikazu**, Highly efficient osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells using a helioxanthin-derivative. 23rd Congress of the European Association for Cranio Maxillo-Facial Surgery, 2016, London, UK

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：近津 大地

ローマ字氏名：(CHIKAZU, daichi)

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：主任教授

研究者番号(8桁)：30343122

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：鄭 雄一
ローマ字氏名：(CHUNG ung-il)

科研費による研究は、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。