

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17327

研究課題名(和文)由来の異なる間葉系幹細胞と半導体レーザーを用いた骨再生技術と顎裂閉鎖治療への展開

研究課題名(英文) The development to bone regeneration treatment for CLP patients using mesenchymal stem cells of different origins and semiconductor lasers.

研究代表者

鷲見 圭輔 (Sumi, Keisuke)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・専門研究員

研究者番号：00707078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂(CLP)は口腔顎顔面領域において一般的な先天性疾患である。間葉系幹細胞(MSCs)は、様々な組織再生医療への応用が期待されている。本研究では、犬ビーグル種に対して口蓋裂モデルを作製し、MSCsとCAPによる移植を行ったところ、骨組織の再生が確認された。一方、レーザーは、近年、医療分野に広く応用されており、その有効性が示唆されている。本研究により、半導体レーザー照射は、ヒト培養歯髄細胞の細胞増殖能および石灰化能を亢進させることが明らかとなった。このことから、半導体レーザー照射を応用した組織再生の可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇・口蓋裂(CLP)は、口腔顎顔面領域において一番多く認められる先天性疾患である。ほとんどの症例において同部への腸骨移植が学齢期に行われる。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は患者の大きな負担となる。近年、間葉系幹細胞(MSCs)を用いた組織再生医療への応用が期待されている。本研究では、MSCs、炭酸アパタイト担体および半導体レーザーによる骨代謝活性を高めた骨再生法を確立し、顎裂閉鎖治療に応用することを目的とした。MSCsの代謝を亢進させる手段としての半導体レーザーの応用が示唆された。さらに、MSCsとCAPを併用することで顎裂部の骨再生に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cleft lip and palate (CLP) is a common anomaly of the orofacial region. Mesenchymal stem cell (MSC) transplantation has been a focus of regenerative medicine and its application to the repair of bone defects in CLP patients is highly anticipated. This study investigated the potential for using MSCs to regenerate bone in a jaw cleft as well as the survival of transplanted MSCs using a canine model of CLP. Co-transplantation of MSCs and CAP represents a promising strategy for correcting bone defects including CLP. Laser irradiation activates a range of cellular processes in a variety of cell types, including stem cells, and can promote tissue repair. The purpose of this study was to examine the effects of diode laser irradiation on the proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp cells (hDPCs). The present study showed that diode laser irradiation may contribute to the regeneration of dental pulp in terms of enhancement of hDPC proliferation and differentiation.

研究分野：矯正歯科

キーワード：口唇口蓋裂 幹細胞 炭酸アパタイト レーザー 組織再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口唇・口蓋裂 (CLP) は、複数の遺伝子要因と環境要因から発症する多因子性の疾患であり、日本人における発症率は 0.19% である。病態は、胎生期における顔面突起の癒合不全に起因する顎裂を特徴とし、構音障害や顔面の変形が認められる。顎裂の存在により歯列の連続性が失われ、上顎歯列弓の狭窄や先天的な歯の欠損、歯の位置異常による不正咬合を発症するため、矯正歯科治療が必要となることが多い。また、骨架橋の確立や歯槽堤の形成、鼻口腔瘻の完全閉鎖などを目的として、ほとんどの症例において同部への腸骨移植が学齢期に行われる。移植体として腸骨が多用される理由は、第一に顎裂部の充填に必要な骨量を確保できることが挙げられる。さらに、顎裂閉鎖後の歯の矯正移動や移植に適した再生骨が得やすい点も重要である。移植骨の生着の鍵を握るのは、移植骨内部での速やかな血管網の再構築と骨改造であり、腸骨から採取した移植体に含まれる骨髄成分が、歯を維持するために必要な骨代謝能を有した骨再生を誘導することが示唆されている。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は患者の大きな負担となり、長期入院の必要性や腸骨採取後の疼痛とそれに伴う歩行障害など、種々の問題が伴うのも現実である。骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSCs) は、骨髄から分離した後に種々の細胞への分化能を保持したまま培養、増殖させることが可能である。また、骨髄穿刺による細胞の採取法が確立されていることより、様々な組織再生医療への応用が検討されてきた。近年、医科領域において、閉塞性動脈硬化症に対する骨髄細胞移植を用いた血管新生療法や培養骨髄細胞移植による骨延長術が高度先進医療としてそれぞれ認可されている。一方、CLP 患者における骨再生治療の応用例は少数にとどまっている。この理由として、顎裂部における骨欠損部の三次元的形状が複雑であること、口腔機能時の外力を受けやすいことが挙げられる。

そこで、申請者らは、新規材料である未焼結炭酸アパタイト顆粒 (CAP) 担体に着目した。CAP は、元來生体の骨や歯の主要な無機成分であるため生体親和性が高く、良好な賦形性を有しているという特長がある。一方、近年、レーザーは医療分野に広く応用されており、様々な種類の機器が使用されているが、とりわけ半導体レーザーは生体親和性が高く、優れた組織浸透性を有するため、関節炎や骨折の治癒促進等に応用されているが、顎裂閉鎖治療に対する半導体レーザー照射の影響について詳細な検討や最適な条件の検討を行った報告は見られない。そこで、MSCs と破骨細胞の相互作用による CAP を含めた骨代謝機構を解明するとともに、骨リモデリングの亢進が生じる条件を検証することとした。さらに、レーザー照射によって、MSCs の代謝を活性化させることにより、さらなる骨誘導効果が期待される。以上の背景から、MSCs による骨代謝活性を高めた骨再生法を確立し、顎裂閉鎖治療に応用することを目的とした本研究計画を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、MSCs における骨再生および血管誘導能を検討する。また、移植時に担体として用いる CAP が、破骨細胞の働きによりどのような骨吸収様相を呈し、骨再生が誘導されているのかを検証することにより、MSCs による詳細な骨代謝調節機構を解明する。さらに、半導体レーザー照射が MSCs の誘導にどのような影響を及ぼすのかを検証する。

### 3. 研究の方法

実験 1 では、MSCs と破骨前駆細胞である RAW264 の共培養を行い、MSCs の血管新生と破骨細胞分化に及ぼす影響について検討する。

実験 2 では、MSCs における半導体レーザー照射の影響について検討を行う。

実験 3 では、我々が考案したビーグル犬両側顎裂モデルを用い、*in vivo* 実験系での MSCs の骨再生能および血管新生能について検討するとともに CAP の吸収速度と骨形成の関連性について検討を行う。さらに、矯正装置を用いて実験的な歯の移動を行うことで、矯正的歯の移動が正常に行われるか否かを検証する。

#### 4 . 研究成果

実験 1 では、MSCs の血管新生と破骨細胞分化に及ぼす影響についての検討を行った。その結果、以下の知見を得た。

MSCs は破骨前駆細胞 (RAW264) との共培養によって破骨細胞 分化を抑制する。

MSCs は RAW264 との共培養によって RAW264 の細胞増殖能を亢進させる。

MSCs は RAW264 を走化させる。

RAW264 の走化には MSCs の発現する CCL2 が関与する。

以上の結果は 3 題の雑誌にて誌上発表された (Abe T et al., 2018 J Dent Sci; Abe T et al., 2018 J Oral Sci; Sumi K et al., 2018 J Oral Sci)。そして、MSCs と血管内皮細胞株との共培養により、VEGF-A の遺伝子発現とタンパク質発現を亢進させることが明らかとなった (Oki N et al., 2018 Biomed Res)。

実験 2 では、レーザー照射が MSCs の代謝に及ぼす影響についての検討を行った。

その結果、810 nm の半導体レーザー照射によって、ヒト歯髄由来の MSCs の細胞増殖能及び基質代謝能を亢進させることが解明された。

実験 3 では、MSCs と CAP による骨再生の誘導と血管新生の検討を行った。

犬ビーグル種に対して口蓋裂モデルを作製し、MSCs と CAP による移植を行ったところ、骨組織の再生が確認された。そして、実験的歯の移動モデルによって再生骨への歯の移動が確認された。

以上の背景より、MSCs は、血管新生や破骨細胞に対して相互作用を及ぼすことが明らかとなった。そして MSCs の代謝を亢進させる手段としての半導体レーザーの応用が示唆された。さらに、MSCs と CAP を併用することで顎裂部の骨再生に有用であることが示され、臨床応用の可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Sumi K, Abe T, Kunimatsu R, Oki N, Tsuka Y, Awada T, Nakajima K, Ando K, Tanimoto K. The effect of mesenchymal stem cells on chemotaxis of osteoclast precursor cells. J Oral Sci. 2018; 60(2): 221-225. doi: 10.2334/josnusd.17-0187.(査読有)

Abe T, Sumi K, Kunimatsu R, Oki N, Tsuka Y, Nakajima K, Ando K, Tanimoto K. The effect of mesenchymal stem cells on osteoclast precursor cell differentiation. J Oral Sci. 2019;61(1):30-35. doi: 10.2334/josnusd.17-0315. (査読有)

Abe T, Sumi K, Kunimatsu R, Oki N, Tsuka Y, Nakajima K, Tanimoto K. Dynamic imaging of the effect of mesenchymal stem cells on osteoclast precursor cell chemotaxis for bone defects in the mouse skull. J Dent Sci. 2018;13(4):354-359. doi: 10.1016/j.jds.2018.08.001. (査読有)

Oki N, Abe T, Kunimatsu R, Sumi K, Awada T, Tsuka Y, Nakajima K, Ando K, Tanimoto K. The role of vascular endothelial growth factor and mesenchymal stem cells during angiogenesis. Biomed Res. 2018;29:3079-3084 10.4066/biomedicalresearch.29-18-887 (査読有)

Kunimatsu R, Gunji H, Tsuka Y, Yoshimi Y, Awada T, Sumi K, Nakajima K, Kimura A, Hiraki T, Abe T, Naoto H, Yanoshita M, Tanimoto K. Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts. Lasers Med Sci. 2018;33(5):959-966. doi: 10.1007/s10103-017-2426-0. (査読有)

Gunji H, Kunimatsu R, Tsuka Y, Yoshimi Y, Sumi K, Awada T, Nakajima K, Kimura A, Hiraki T, Hirose N, Yanoshita M, Tanimoto K. Effect of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on periodontal tissues during experimental tooth movement in rats. Lasers Surg Med. 2018 in press. doi: 10.1002/lsm.22797. (査読有)

Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Ando K, Hirose N, Tanne Y, Sumi K, Tanimoto K. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. J Periodontol. 2018;89(4):496-505. doi: 10.1002/JPER.17-0087. (査読有)

Ando K, Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Tsuka Y, Sumi K, Horie K, Abe T, Nakajima K, Tanimoto K. Effects of Human Full-length Amelogenin and C-terminal Amelogenin Peptide on the Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue. Curr Pharm Des. 2018;24(25):2993-3001. doi: 10.2174/1381612824666180816093227. (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://home.hiroshima-u.ac.jp/orthod/recruit/report/2013.html>

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/dent/research/achievements>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。