

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19210

研究課題名（和文）ヒト歯髄幹細胞由来の力学的強度を有する三次元軟骨再生法の開発にむけた前臨床試験

研究課題名（英文）Preclinical studies toward the development of a three-dimensional cartilage regeneration method with mechanical strength derived from human dental pulp stem cells.

研究代表者

菅野 勇樹 (Kanno, Yuki)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80451813

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では高効率な軟骨細胞の分化・培養を目的として、近年軟骨への分化誘導能が報告されている低分子化合物であるThienoindazole Derivative (TD-198946、以下TD)に注目している。本研究において、TDの最適な濃度を検索した結果、最低濃度は 10^{-7} Mであることが明らかとなった。さらにTD添加のメリット最大化するためには、従来の培地の簡略化と低価格化を目的に、従来添加していたbFGFを使用せずに軟骨細胞へと分化させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋顎顔面領域における軟骨組織は、鼻、耳、下顎頭に存在することが知られている。これらの軟骨組織に障害が生じると、外鼻変形、小耳症、顎関節疾患をきたし治療に難渋する。そこで、力学的強度と三次元形態を有する再生軟骨を作製することによって、新たな治療法を考案することができると考えた。応募者は、骨髄間葉系幹細胞よりも高い増殖能を有するヒト歯髄幹細胞が三次元軟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。ヒト歯髄幹細胞を活用した新規軟骨再生法が確立された暁には、口腔外科的疾患のみならず、小耳症や気管軟化症、変形性関節症など他臓器の軟骨再建にも有用であり、広く医療および社会への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to achieve highly efficient differentiation and culture of chondrocytes. We focus on Thienoindazole Derivative (TD-198946, hereafter TD), a low molecular weight compound that has been recently reported to induce differentiation into chondrocytes.

In this study, we searched for the optimal concentration of TD. As a result, the lowest concentration was found to be 10^{-7} M. In addition, to maximize the advantage of TD addition, we succeeded in differentiating the cells into chondrocytes without using bFGF, which was conventionally added. The elimination of bFGF contributed to the simplification and lower cost of conventional culture media.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯髄幹細胞 軟骨再生医療

1. 研究開始当初の背景

頭蓋顎顔面領域における軟骨組織は、鼻、耳、下顎頭に存在することが知られている。これらの軟骨組織に障害が生じると、外鼻変形、小耳症、顎関節疾患をきたす。特に口腔外科領域においては、口唇裂における外鼻変形や、顎関節強直症の再発あるいは下顎頭吸収などの顎関節疾患の治療に難渋することから、力学的強度と三次元形態を有する再生軟骨を作製することによって、新たな治療法を考案することができると考えた。具体的には、口唇裂における変形軟骨の修正手術や、顎関節強直症に対する顎関節授動術における再発予防のための中間挿入物として応用できると考えられる。軟骨再生のための細胞源としては、軟骨細胞、骨髄間葉系幹細胞、ES細胞、iPS細胞などを用いた研究も行われているが、実用化に際しては、細胞採取部位への侵襲、倫理面や移植安全性、分化細胞の低い作出効率など多くの問題を抱えているのが現状である。応募者は、骨髄間葉系幹細胞よりも高い増殖能を有するヒト歯髄幹細胞 (Gronthos et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000) が三次元軟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。現在まで軟骨細胞の高効率な誘導法の報告はなく、力学的な強度を有する三次元軟骨片を作製した報告はない。ヒト歯髄幹細胞を活用した新規軟骨再生法が確立された暁には、前述の口腔外科的疾患のみならず、小耳症や気管軟化症、変形性関節症など他臓器の軟骨再建の細胞源としても有用であり、広く医療および社会への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脱落した乳歯や親知らず(智歯)などの入手の容易である歯髄を細胞源として、ヒト歯髄幹細胞を用いて力学的強度を有する三次元軟骨再生法を開発し確立することである。応募者の研究実績として、骨再生医療においては足場素材に着目し、非晶性体カルシウム欠損型HAが生体内にて速やかに骨組織に置換する、いわゆる in situ Tissue Engineering 型カスタムメイド人工骨を応用してきた(Kanno Y et al. Regenerative Therapy. 2017)。さらに、特にヒト耳介軟骨から細胞を採取し増殖させて、再生軟骨を成熟させる方法を研究してきた(基盤研究C. 再生前駆細胞と生体内成熟促進因子を活用した新規軟骨再生法の開発.平成 26 - 28 年度)。今回の研究においては、足場素材としての PLLA にヒト歯髄幹細胞由来の軟骨細胞を播種して、力学的強度を有する三次元軟骨を作製することを考えており、応募者の現在までの研究成果を結集させた独創的な研究であるといえる。

3. 研究の方法

東京医科大学病院歯科口腔外科・矯正歯科および東京女子医科大学歯科口腔外科において、患者の同意を得たうえで、Gronthos らの手法 (Gronthos et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000) を用いて抜去歯からヒト歯髄幹細胞を採取し、応募者の所属研究施設において、これまでに確立した培養法で単離・培養した。

ヒト歯髄幹細胞を軟骨細胞への分化誘導することに成功した Meta らの方法に従って、単離・培養したヒト歯髄幹細胞を培養の後(Mata et al. Stem Cells Int.2017)、遺伝子レベルにおいては、COL1A1, COL2A1, ALP などの発現量を qPCR で定量し、軟骨細胞への分化誘導能を確認した。さらに、近年軟骨への分化誘導能が報告されている低分子化合物である Thienoinazole Derivative (TD-198946、以下 TD)を既知の軟骨分化誘導培地に添加することで、高効率な軟骨細胞の分化・培養の実現を目的とした。既知の軟骨分化誘導培地に、 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M の TD を添加し COL1A1, COL2A1, ALP の発現量を qPCR で定量した。

TD の最適濃度は 10^{-7} M であることが分かったが、既知の軟骨分化誘導培地の誘導能が十分に優秀であったことから、TD 添加の効果を最大限に生かすことが困難であった。そこで、TD 添加のメリットを最大化するために、従来使用していた既知の軟骨分化誘導培地の簡略化と低価格化を行うこととした。従来法で使用していた成長因子と添加物を使用して、軟骨分化が可能となる最小の組み合わせを網羅的に検索した。

結果的に、bFGF なしでも軟骨分化が起こることを確認したが、この最小の組み合わせに 10^{-7} M の TD を添加することで軟骨分化が促進されているかの検討をおこなった。4 週の培養の後、COL2A1, COL11A2, SOX9, ACAN の発現量を qPCR で定量した。

また、過去の報告において奇形腫由来幹細胞である ATDC5 細胞株が、5%FBS 添加 F12 培地に、Insulin と Transferrin および sodium selenite を添加するのみで、成長因子を用いずに軟骨細胞へと良好に分化することに注目し、ヒト歯髄幹細胞においても 5%FBS 添加 F12 培地と市販のサプリメントである ITS-X (Gibco 社) のみを用いた、成長因子を伴わない軟骨細胞への分化誘導法について検討を行った。

4 . 研究成果

本研究では高効率な軟骨細胞の分化・培養を目的として、近年軟骨への分化誘導能が報告されている低分子化合物である Thienoindazole Derivative (TD-198946、以下 TD) に注目している。昨年度までの研究において、TD の最適な濃度を検索した結果、最適濃度は 10^{-7} M であることを確認した。

さらに TD 添加のメリット最大化するために、既知の軟骨分化誘導培地の簡素化と低価格化を目的に、検討を行った。従来添加していた bFGF を使用せずに軟骨細胞へと分化させることに成功した。しかしながら qPCR においては、COL1A1 については良好に発現するもの、COL2A1 や SOX9 に関しては、その発現が不安定であり、細胞の誘導培養期間によるものと思われた。ヒト歯髄幹細胞のその増殖能の高さから、3 週程度で細胞の剥離が起こってしまうことから、コラーゲンコーティングの細胞培養プレートを用いることにより、培養期間を延長させることにより、4 週間の培養期間を確保することに成功した。その結果、COL2A1 および ACAN の発現が安定して高値を示すことが確認された。

また、過去の報告において奇形腫由来幹細胞である ATDC5 細胞株が、5%FBS 添加 F12 培地に、Insulin と Transferrin および sodium selenite を添加するのみで、成長因子を用いずに軟骨細胞へと良好に分化することに注目し、ヒト歯髄幹細胞においても 5%FBS 添加 F12 培地と市販のサプリメントである ITS-X (Gibco 社) のみを用いた、成長因子を伴わない軟骨細胞への分化誘導法について検討を行った。その結果、一部の細胞株においては COL2A1 および SOX9 の高値を示し軟骨細胞へと分化したと考えられた。しかしながら、細胞株によっては全く発現が認められなかった。今後は成長因子や TD 添加することでさらなる検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamakawa Daiki, Kawase-Koga Yoko, Fujii Yasuyuki, Kanno Yuki, Sato Marika, Ohba Shinsuke, Kitaura Yoshiaki, Kashiwagi Miki, Chikazu Daichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of Helioxanthin Derivative-Treated Human Dental Pulp Stem Cells on Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9158 ~ 9158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 菅野勇樹、古賀陽子、浜田勇人、山川樹、安田卓史、近津大地	4. 巻 11
2. 論文標題 顎裂部骨移植術とインプラント治療により咬合機能回復を図った片側性唇顎口蓋裂の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本先進インプラント医療学会誌	6. 最初と最後の頁 5-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanno Yuki, Nagahama Kohei, Kawase-Koga Yoko	4. 巻 61
2. 論文標題 Novel periodontal tissue management technique for anterior maxillary osteotomy by extraction of premolars one month before surgery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 107 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjoms.2022.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanno Yuki, Saijo Hideto, Mori Yoshiyuki, Hoshi Kazuto, Chikazu Daichi, Kawase-Koga Yoko	4. 巻 34
2. 論文標題 A case of occlusal reconstruction using dental implants after Le Fort I osteotomy simultaneously with maxillary sinus floor augmentation: Require to preserve the maxillary sinus membrane?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 615 ~ 621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2022.03.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 内山 貴夫, 富塚 健, 田代 美子, 田村 恵, 村岡 茉耶, 江口 奈緒子, 太田 志保, 木暮 麻優, 脇元 佳子, 野田 明里, 久保田 恵吾, 菅野 勇樹, 西條 英人, 星 和人
2. 発表標題 がん研究会有明病院歯科における周術期等口腔機能管理の診療体制の現状 大学病院における診療体制との比較
3. 学会等名 第18回日本口腔ケア学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山川 樹, 古賀 陽子, 藤居 泰行, 菅野 勇樹, 佐藤 麻梨香, 近津 大地
2. 発表標題 骨折治癒におけるヘリオキサチン誘導体を用いたヒト歯髄幹細胞の効果
3. 学会等名 第75回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野 勇樹
2. 発表標題 われわれの施設におけるCOVID-19感染症に対する対策 われわれの施設におけるCOVID-19対策の要旨 医学部附属病院および同歯科口腔外科における対策
3. 学会等名 第23回日本先進インプラント医療学会 総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野並 久晃, 赤城 裕一, 福澤 智, 貝淵 信之, 菅野 勇樹, 熊坂 士, 酒向 誠, 藤井 俊治, 古賀 陽子, 岡本 俊宏
2. 発表標題 上下顎臼歯相当部欠損に埋入したインプラント体の動揺度の推移
3. 学会等名 第25回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤居 泰行, 羽鳥 綾乃, 菅野 勇樹, 濱田 勇人, 宮澤 利明, 近津 大地
2. 発表標題 1ピースインプラント破折症例の臨床的検討
3. 学会等名 第25回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野勇樹、長谷川温、河野通秀、濱田勇人、杉崎リサ、佐藤麻梨香、田村知子、近津大地
2. 発表標題 上顎歯肉に生じた悪性黒色腫に対するニボルマブ+イピリムマブ併用療法の治療経験
3. 学会等名 第65回 公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Kanno, Daiki Yamakawa, Yasuyuki Fujii, Yoko Kawase-Koga, Daichi Chikazu
2. 発表標題 Chondrogenic differrenntation by human dental pulp stem cells using a thienoindazole derivative.
3. 学会等名 The New York Stem Cell Foundation Conference. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daiki Yamakawa, Yoko Kawase-Koga, Yasuyuki Fujii, Yuki Kanno, Marika Sato, Daichi Chikazu
2. 発表標題 Human dental pulp stem cells with small-molecular compound promote highly osteogenesis in vitro
3. 学会等名 The New York Stem Cell Foundation Conference. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀陽子、本田 綾、山崎綾乃、菅野勇樹、濱田勇人、羽鳥綾乃、松村 一、河島尚志、近津大地
2. 発表標題 東京医科大学病院口唇口蓋裂センターにおける口唇口蓋裂患者の臨床統計
3. 学会等名 第43回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤麻梨香、古賀陽子、渡辺正人、濱田勇人、菅野勇樹、近津大地
2. 発表標題 顎矯正手術を施行した脊髄小脳変性症患者の1例
3. 学会等名 第29回日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野勇樹、渡辺正人、長谷川温、千喜良仁、川崎恵理子、戸口美咲、羽鳥綾乃、濱田勇人、古賀陽子、近津大地
2. 発表標題 下顎骨骨折術後変形に対して新規カスタムメイド人工骨を用いた下顎骨形成術の治療経験
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y Kanno, M Nakano, Y Matsui, T Ichikawa, D Yamakawa, Y Fujii, A Hatori, Shoji Fukuda, D. Chikazu, T Ogasawara, and Y. Kawase-Koga
2. 発表標題 Highly efficient differentiation of chondrocytes from human dental pulp stem cells using a thienindazole derivative small compound TD-198946
3. 学会等名 ASBMR 2002 ANNUAL MEETING
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野勇樹
2. 発表標題 われわれの施設における顎顔面口腔外傷に対する治療戦略
3. 学会等名 第22回日本外傷歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野勇樹 , 小林真左子 , 富樫 悠 , 藤井俊治 , 赤城裕一 , 柴山知紗 , 前田祐佳 , 貝淵信之 , 岡本俊宏 , 里見貴史 , 古賀陽子
2. 発表標題 口腔外科医療従事者における SARS-CoV-2抗体保有率の多施設疫学調査
3. 学会等名 第26回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会 総会・学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------