

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：19K19269
研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来間葉系幹細胞のエクソソームを応用した低侵襲性顎裂閉鎖治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of minimally invasive cleft palate closure treatment using mesenchymal stem cell-derived exosome from human exfoliated deciduous teeth

研究代表者
阿部 崇晴 (Abe, Takaharu)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：20806682
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)：口蓋裂患者の顎裂手術における、負担を軽減するため、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞(SHED)を用いた骨再生療法の研究を行っている。初年度においては、SHEDの培養上清(SHED-CM)を用い、マウス頭蓋骨に作製した骨欠損部に移植担体(アテロコラーゲン)を同時に移植することで、良好な骨再生を生じることを明らかとした。

また、次年度においては、その移植効率を上げるため、SHEDより細胞接着分子として知られるCD146陽性を分離し、移植に応用した。その結果、有意に良好な骨再生を生じることが明らかとなった。さらにエクソソームについては、因子中に含まれるmicroRNAに着目し、解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年乳歯歯髄由来間葉系幹細胞は着目されているものの、その詳細な性質については不明な点が多い。本研究では、SHED中に含有される液性成分について解析し、また、その成分を移植に応用することで、良好な骨再生を生じることを明らかとした。

本研究で用いたSHEDを応用し更なる骨再生機構の解明を試みることで、歯科医学にとどまらず広く再生医療分野の進歩へ貢献を果たすと考えられる。さらに、本法を臨床応用し患者の負担が軽減し、低侵襲で良好な骨再生療法を確立することは、社会的観点から重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)： In order to reduce the invasion of cleft lip and/or palate patients' secondary grafting, a study of bone regeneration therapy using deciduous pulp-derived mesenchymal stem cells (SHED) was conducted. In the first year, it was clarified that good bone regeneration can be achieved by transplanting carrier (atelocollagen) and SHED conditioned media (SHED-CM) into a bone defect prepared in a mouse skull.

In the next year, in order to improve the transplantation efficiency, CD146-positive, which is known as a cell adhesion molecule, was isolated from SHED and applied to transplantation. As a result, it was clarified that significantly good bone regeneration was produced. Furthermore, analysis of exosomes in SHED-CM is progressing, focusing on microRNAs contained in the factors.

研究分野：骨再生

キーワード：MSC SHED 骨再生 SHED-CM エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CLP は、複数の遺伝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%であり、欧米諸国と比較して高いことが知られている (宮崎 正, 他. 1985)。骨架橋の確立や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海綿骨移植が学齢期に行われる (Boyne PJ, et al. 1972)。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。

そこで、我々の研究グループでは、腸骨採取に伴う侵襲を低減しながら骨再生を達成する方法として、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) 移植に着目し、骨再生療法の検討を重ねてきた。その結果として、MSCs 移植が顎裂部の骨を再生・誘導することを解明した (Yoshioka M, et al. 2012)。しかしながら、骨髄液を採取するためには、骨髄穿刺は避けられず、患者の負担を十分に軽減したとは言えない。

近年、BM-MSCs と同様な分化能を持つ歯髄由来未分化間葉系幹細胞 (DPSC) および乳歯歯髄由来の未分化間葉系幹細胞 (SHED) が発見され、再生医療における有効性が報告されている (Chalisserry EP, et al. 2017)。そこで、我々の研究グループでは、DPSC および SHED に着目し、単離・培養の確立を試みてきた。これまでの検討より、ヒト永久歯、乳歯の歯髄組織から幹細胞を単離し、マウス頭蓋骨欠損モデルに SHED を移植したところ、骨再生が確認された (Nakajima K, et al. 2018)。

また、MSC の培養上清により骨組織再生を促進することが報告されている (Osugi M et al., 2011)。しかしながら、含有する何らかの液性因子が組織再生に深く関与することが推察されるものの、詳細な作用機序は明らかにされておらず、未だ不明な点が多い。さらに、顎裂閉鎖治療に対する影響について詳細な検討を行った報告は見られない。以上の背景より、本研究では、顎裂部骨再生に対する、培養上清およびその液性因子の影響について調べることにした。

2. 研究の目的

我々の研究グループでは、腸骨採取に伴う侵襲を低減しながら骨再生を達成する方法として、BM-MSCs、SHED および DPSC に着目し、骨再生療法の検討を重ねてきた。近年、MSCs の培養上清を用いた、再生医療に関する研究が着目されており、医科領域において、DPSC の培養上清 (DPSC-CM) を投与することで脳梗塞の改善や、皮膚の修復を促進することが報告されており、その有用性が示唆されている。以上の背景より、本研究では SHED および DPSC の液性因子のもつシグナル伝達に着目し、培養上清を用いた研究を行うことにした。SHED-CM および DPSC-CM を用いることで、骨再生および血管新生を誘導する効果が期待される。さらに、CD146 は血管内皮細胞の管腔形成を維持し、血管新生を促進することが知られている。本研究では SHED においても、CD146 陽性細胞を抽出することで、良好な骨再生を生じるか否かを検証することとした。また、乳歯歯髄由来の未分化間葉系幹細胞 (SHED) 由来の液性因子中シグナル伝達を担うエクソソームにも着目し、SHED の培養上清よりエクソソームを抽出し、エクソソームを用いた骨再生療法についても検討を行うことにした。さらに、SHED-CM、DPS-CM、CD146 陽性細胞、エクソソームの各因子をマウス頭蓋骨欠損モデルの骨欠損部に投与することにより骨再生能を検証する。これらを CLP 患者の顎裂閉鎖治療に応用し、顎裂部骨欠損に対して、DPSC-CM および SHED-CM を最適な条件で供給し、血管新生と組織再生能を高めた新規治療法の確立を目指すことを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯髄由来間葉系幹細胞の単離・培養，品質評価

ヒト乳歯および永久歯から単離・培養する。

各細胞に対し、骨分化、脂肪分化、軟骨分化し、細胞の性質の評価を行う。

(2) 歯髄由来間葉系幹細胞の培養上清の抽出

(3) 免疫不全マウスを用いた、培養上清による骨再生評価

骨欠損モデルの作製：6週齢の免疫不全マウス (BALB/c-nu) に対し、全身麻酔下(3種混合麻酔)、頭蓋冠の中央にトレフィンバーを用い、直径4mmの骨欠損を作製した。SHED(1.0×10^5 cells)、SHED-CM、 α -MEMの3種をアテロコラーゲンスポンジに浸漬させ、比較検討を行った。

マイクロCTによる三次元的解析：移植直後(T1)、4週(T2)、8週(T3)においてマイクロCT (SkyScan1176-HT)により頭蓋骨の撮影を行った。再生骨体積はT1,T2画像より、T0画像を差し引くことにより算出した。

HE染色およびMT(マッソントリクローム)染色による組織学的解析：移植後8週間において、屠殺したマウス頭蓋部をEDTAにて脱灰し、パラフィンに包埋した。HE染色およびMTを行った。

免疫組織学的解析：抗VEGF-A、抗CD31を用いた、免疫組織学的染色により評価を行った。また、VEGFについて、BZ-X800を用いて観測を行い、Keyenceソフトウェアを用い、染色領域を測定した。

(4) サイトカインアッセイ：4人の患者より収集された、SHED-CMをMagnetic Luminex Assay Human Premixed Multi-Analyte Kitを使用し、Luminex® 100/200™システムにて20種類のサイトカインについて定量を行った。

(5) SHED-CMのin-vitroにおける評価

管腔形成アッセイによる評価

HUVECに対する、細胞増殖能試験

BMSCに対する、定量PCR試験：BMSCに、SHED-CMを添加し、VEGF, Ang1, Ang2, HGF, ALP, RUNX2, OCNについてその遺伝子発現についてPCRを用いて比較検討した。

(6) CD146陽性細胞の蛍光活性セルソーティング：(1)で培養したSHEDを抗ヒトCD146抗体FICTにて、蛍光標識した。FACS Aria IIセルソーターにてセルソーティングし、SHEDにおけるCD146陽性および陰性細胞数の計測・分画を行った。

(7) 免疫不全マウスを用いた、培養上清による骨再生評価：(3)の手法により、骨欠損を作製したマウス頭蓋にCD146陽性およびCD146陰性細胞を播種したアテロコラーゲンスポンジを移植し、評価を行った。

マイクロCTによる三次元的解析：移植直後(T0)、4週(T1)、8週(T2)においてマイクロCTにより頭蓋骨の撮影を行った。

HE染色およびMT(マッソントリクローム)染色による組織学的解析：移植後8週間において、HE染色およびMTを行った。蛍光顕微鏡BZ-X800(Keyence)を用いて観測を行い、Keyenceソフトウェアを用い、染色領域を測定した。

免疫組織学的解析：抗VEGF-A、抗CD31抗体を用いた、免疫組織学的染色により評価を行った。また、VEGFについて、蛍光顕微鏡を用いて観測を行い、Keyenceソフトウェアを用い、染色領域を測定した。CD31陽性血管数について、比較した。

蛍光免疫染色：抗BMP-2抗体により蛍光免疫組織染色を行い、蛍光顕微鏡にて観測を行っ

た。

(8) エクソソームの抽出およびその評価

エクソソームの抽出: Total Exo Isolation (Invitrogen)を用い、SHED-CM、DPSC-CM、BMSC-CMについてエクソソームの抽出を行った。

miRNA についてマイクロアレイ解析: 3D-Gene miRNA Oligo chip を使用し、SHED-CM、DPSC-CM、BMSC-CM について、miRNA についてマイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯髄由来間葉系幹細胞の単離・培養, 品質評価

歯髄由来間葉系幹細胞の品質評価: SHED に対し、骨分化、脂肪分化、軟骨分化誘導し、骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化を確認した。

(3) 免疫不全マウスを用いた、培養上清による骨再生評価

マイクロ CT による三次元的解析: T1 において、SHED-CM 群の再生骨体積は、SHED 群および対照群の再生骨体積よりも有意に大きな値を示した。T2 では、SHED-CM 群の再生骨体積は、SHED 群および対照群の再生骨体積よりも有意に大きな値を示し、SHED 群の再生骨体積は、対照群の再生骨体積よりも有意に大きな値を示した(図 1-a,b)。

HE 染色および MT(マッソントリクローム)染色による組織学的解析: HE 染色において、対照群では、成熟骨は、ごく少量であり、アテロコラーゲンの多くの残存が認められた。SHED 群では、層板骨は、少ないものの、アテロコラーゲンには、細胞侵入と骨様組織が認められた。

MT 染色において、対照群では、成熟骨はごく少量であり、コラーゲン線維および類骨も少なく、SHED 群では、成熟骨は中央に多く認められ、コラーゲン線維および類骨も全体に認められた。SHED-CM 群では、対照群、SHED 群と比較して、成熟骨が多く観察され、類骨が下方に多く認められた(図 2-ab)。

免疫組織学的解析: VEGF 免疫染色において、欠損部全体の面積に対する、VEGF 発現の割合をそれぞれ算出し、その面積率とした。SHED 群、SHED-CM 群は対照群と比較して、それぞれ有意に大きな値を示しました。

CD31 について、SHED 群では、対照群と比較して多くの血管が認められ、大きな血管も観察された。SHED-CM 群では、対照群、SHED 群と比較して、多くの血管が認められ、大きな血管も多く観察された。SHED 群は、対照群と比較して、有意に大きな値を示しました。血管数として比較したところ、SHED-CM 群は、SHED 群、対照群と比較して、それぞれ有意に大きな値を示しました。

(4) サイトカインアッセイ: サイトカインアッセイにより、血管新生に影響を与える M-CSF、MCP-1、ANG、bFGF、VEGF-C、および VEGF-A が多く含まれていることが確認された。また、骨代謝関連マーカーである OPG、OPN、BMP-2、および BMP-4 が SHED-CM に豊富に含まれていることが確認された。さらに、BDNF、 β -NGF、GDNF、NT-3 などの神経栄養因子

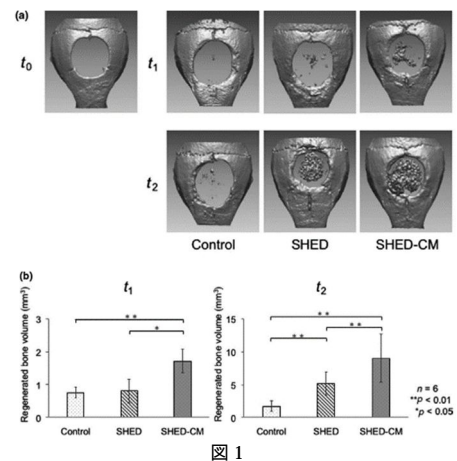


図 1

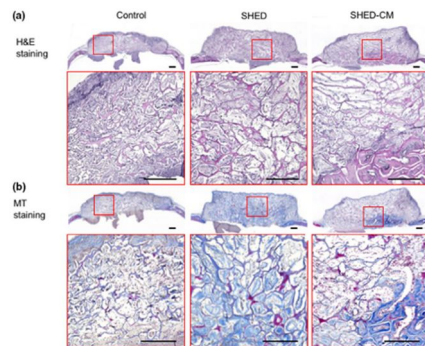


図 2

が含まれることが確認された。

(5) SHED-CM の in-vitro における評価

管腔形成アッセイによる評価：SHED-CM 添加群において血管形成が確認された。SHED-CM と anti-VEGF 添加群では、SHED-CM 添加群、VEGF 添加群より少ない血管形成であった。VEGF 添加群では、SHED-CM 添加群、SHED-CM 添加群、対照群と比較して血管形成が多く認められ、血管長も長い血管が多く観察されました。対照群では、血管の形成は他の群と比較して少量であった。

HUVEC に対する、細胞増殖能試験：SHED-CM 群では、SHED-CM と anti-VEGF 添加群、VEGF 群、対照群と比較して有意に大きな値を示した。SHED-CM と anti-VEGF 添加群では、対象群と比較して有意に大きな値を示した。

BMSC に対する、定量 PCR 試験：BMSC において、VEGF、Ang 1、Ang2、HGF、ALP、Runx2、OCN の遺伝子発現は、SHED-CM で有意に亢進された。

(7) 免疫不全マウスを用いた、培養上清による骨再生評価

マイクロ CT による三次元的解析：T1 での再生骨の体積は、SHED グループ、CD146 +群、および CD146-群は、対照群よりも有意に高い値を示しました。さらに、SHED および CD146 +群は、CD146-群よりも有意に高い値を示した。T2 での再生骨の体積は、CD146 +群は、他のすべての群よりも有意に高い値を示した。SHED および CD146-群は、対照群よりも有意に高い値を示した。

HE 染色および MT(マッソントリクローム)染色による組織学的解析：CD146 +群では、HE 染色画像により、新たに形成された骨が顕著に観察された。対照群では新たに形成された骨はほとんど観察されなかった。MT 染色では、すべての群で成熟した骨が赤く染色され、コラーゲン線維と類骨が青く染色された。いくつかの成熟した骨が対照群と CD146-群で発見されました。SHED および CD146 +群では、深紅に染色された成熟骨が広く観察された。成熟骨の面積比は、対照群で 3.065%、SHED 群で 6.654%、CD146+群で 11.759%、CD146-群で 6.098% であった。CD146 +群は、対照群、SHED 群、および CD146-群よりも有意に高い値でした

免疫組織学的解析：VEGF-A による免疫染色は、対照群および CD146-群の移植部位全体で薄茶色を示した。SHED 群と CD146 +群では、移植部位の周囲と中央に暗褐色の染色部位が観察された。VEGF-A 染色面積比では、CD146+群は、対照群、SHED 群、および CD146-群よりも有意に高い値を示した。SHED 群は対照群よりも有意に高い値を示した。CD31 による免疫染色では、CD31 で染色された多くの血管が主に SHED 群と CD146+群で観察された。CD31 で染色された血管の数を各群で比較すると、CD146+群は対照群および CD146-群よりも有意に高い値を示した(図 3)。

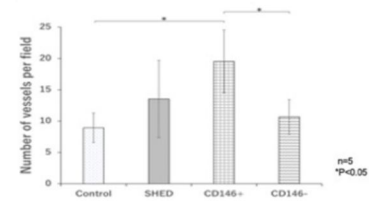


図 3

蛍光免疫染色：対照群では、移植部位の上部がわずかに赤く染まっているのに対し、SHED 群では、移植部位の下部が赤く染まっている。

CD146 +群では、移植部位全体が均一に染色されていた。CD146 -グループでは、赤く染色された部位はほとんど観察されなかった(図 4)。

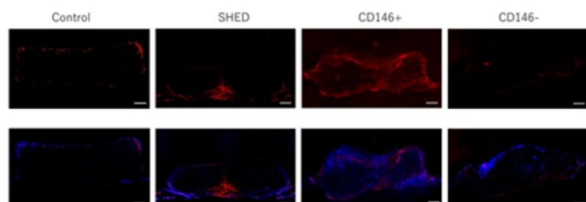


図 4

(8) エクソソームの抽出およびその評価

miRNA についてマイクロアレイ解析：SHED-CM において、骨再生に関与する miR4454、miR1260b、miR7977 などの有意な含有を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hiraki Tomoka, Kunimatsu Ryo, Nakajima Kengo, Abe Takaharu, Yamada Sakura, Rikitake Kodai, Tanimoto Kotaro	4. 巻 26
2. 論文標題 Stem cell derived conditioned media from human exfoliated deciduous teeth promote bone regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 381 ~ 390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.13244	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平木智香、國松亮、中島健吾、阿部崇晴、山田桜、力武航大、栗田哲也、吉見友希、柄優至、加来真人、谷本幸太郎
2. 発表標題 乳歯歯髓由来間葉系幹細胞の培養上清の骨再生治療への応用
3. 学会等名 日本矯正歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部崇晴、國松亮、吉見友希、柄優至、栗田哲也、中島健吾、平木智香、力武航大、鷺見圭輔、谷本幸太郎
2. 発表標題 未分化間葉系幹細胞が破骨細胞前駆細胞の走化作用へ及ぼす影響
3. 学会等名 日本矯正歯科学会
4. 発表年 2019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
---------	---------