

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23055

研究課題名（和文）乳歯歯髄由来幹細胞培養上清の骨再生機構の解明と口蓋裂顎裂部骨再生治療への臨床応用

研究課題名（英文）Elucidation of bone regeneration mechanism of SHED-CM on bone regeneration and clinical application for cleft palate bone regeneration treatment

研究代表者

平木 智香（HIRAKI, TOMOKA）

広島大学・医系科学研究科（歯）・研究員

研究者番号：70881275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、顎裂部骨再生治療を確立するため、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞（SHED）とSHEDの培養上清（SHED-CM）に着目し、SHED-CM中の骨再生に有用な液性因子を解明することを目的とすることとした。初年度には、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）を用いて移植することで、骨再生が促進されることを明らかにした。次年度以降は、ヒト由来血管内皮細胞株、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞株、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に、各MSCs-CMおよびSHED-CMを添加し、細胞増殖能、骨代謝因子・血管新生マーカーの発現レベルについて検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、間葉系幹細胞の培養上清について着目されているものの、その作用機序については不明な点が多い。本研究では、SHED-CMに含有される液性成分について解析し、移植を行うことで良好な骨再生を生じることを明らかにした。

低侵襲で良好な骨再生療法を確立することで、患者の負担を軽減できることは、社会的観点から重要な意義がある。さらに、SHED-CMの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。

研究成果の概要（英文）：We focused on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) and condition media of SHED (SHED-CM). The purpose of this study is to elucidate the useful humoral factors for bone regeneration in SHED-CM for the treatment of jaw cleft bone regeneration. In the first year, we clarified that bone regeneration was promoted by transplanting SHED-CM into a bone defect created in the mouse skull using a transplant carrier (atelocollagen). From the next year, MSCs-CM and SHED-CM were added to HUVEC, MC3T3-E1, and hBMSCs. We examined the expression levels of cell proliferation, bone morphogenetic factors and angiogenesis markers.

研究分野：骨再生

キーワード：SHED 間葉系幹細胞 骨再生 培養上清

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂 (cleft lip and palate ; CLP) は、胎生期における顔面の癒合不全に起因する顎裂を特徴とする、複数の遺伝子要因と環境因子から発症する多因子疾患である。日本人における発症率は、0.19% であり、頭頸部に生じる先天性疾患では最も多い。CLP を有する患者の顎裂部に対して、自家腸骨海綿骨移植が広く行われている。しかしながら、ドナーサイトにおける疼痛や神経損傷による歩行障害は、学童期の患者にとって大きな負担となる。

我々の研究グループでは、これまでにビーグル犬顎裂モデルで骨髄由来 MSCs (BMSCs) による顎裂部の骨再生を確立し、再生骨への歯の移動が可能であることを明らかにした。しかしながら、骨髄液の採取には骨髄穿刺が必要であるため、患者の負担を十分に低減できたとは、言い難い。

そこで、乳歯歯髄由来 MSCs (stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED) に着目した。SHED は、2003 年に Miura らによって単離・培養された。human BMSCs (hBMSCs) と比較して高い増殖能を有し、骨再生治療に有効であることが示唆されている。さらに、SHED は通常は廃棄する脱落乳歯を用いることにより、hBMSCs と比較して容易に入手できるため、有用性が高い。我々の研究班では、SHED に着目し検討を重ねてきた。頭蓋骨欠損免疫不全マウスを用いて、SHED、ヒト歯髄由来 MSCs (hDPSCs) および hBMSCs の骨再生能を検討し、SHED と hDPSCs は、hBMSCs と同程度の骨再生能を有していることが示された。このことから、SHED は顎裂部骨再生治療に有用となり得ることが示された。

近年、再生医療分野において、間葉系幹細胞が分泌するサイトカインのパラクライン作用が注目され、幹細胞培養上清を用いた組織再生が報告されている。我々は、患者の負担を軽減するため、SHED と SHED の培養上清 (SHED-CM) に着目し、SHED および SHED-CM が骨再生能を有している事を解明した。しかしながら、幹細胞の培養上清に含まれる液性因子が、どの様に骨再生に関与しているのか、詳細な骨再生機構は未だ不明である。

以上の背景より、本研究では、SHED-CM を応用した新規の顎裂部骨再生治療法の確立を目指すことを研究の全体的な構想とし、研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

CLP を有する患者の顎裂部に対して、自家腸骨海綿骨移植が広く行われている。しかしながら、ドナーサイトにおける疼痛や神経損傷による歩行障害は、学童期の患者にとって大きな負担となる。近年、間葉系幹細胞が分泌するサイトカインのパラクライン作用が注目され、幹細胞培養上清を用いた組織再生が報告されており、組織再生に寄与する可能性が推察された。そこで、我々の研究グループでは、患者の負担を軽減するため、SHED と SHED-CM に着目した。

SHED および SHED-CM が骨再生治療に有効であることが示唆されたものの、培養上清中には様々な物質が含まれており骨再生に有効な成分の詳細については未だ不明である。以上の背景より、本研究では、SHED-CM を応用した新規の顎裂部骨再生治療法の確立を目指すことを研究の全体的な構想として、SHED-CM 中の骨再生に有用な液性因子を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 研究項目 1

各 MSCs-CM 中の液性因子の解析と SHED-CM 有効成分抽出の探索

- ① ヒト乳歯およびヒト永久歯から SHED および DPSCs を単離・培養した。  
ヒト由来 BMSCs は、購入した細胞株 (Lonza 社) を用いた。
- ② 各 MSCs を培養した後、各 MSCs-CM を精製した。
- ③ Magneric Luminex assay を用いて、上清中に含有するタンパク質について網羅的定量解析を行った。そして、SHED-CM の骨再生有効成分の探索と特定を行った。

#### 研究項目 2

各 MSCs-CM および SHED-CM 抽出成分が細胞増殖・基質代謝能に及ぼす影響

- ① ヒト由来血管内皮細胞株 (HUVEC)、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 (MT3T3-E1) を用いた。  
各細胞を培養し、各 MSCs-CM および SHED-CM 抽出成分を添加し、細胞増殖能について、MTS assay および BrdU assay を用いて検討を行った。
- ② 各細胞を培養し、SHED-CM を添加した後、骨代謝因子および血管新生マーカーの発現レベルについて、定量 PCR を用いた遺伝子解析および Odyssey<sup>®</sup>を用いた定量 western blot 解析を行った。
- ③ 実験 1 で解明された液性因子について、抗中和抗体を添加し、細胞増殖能および骨形成能を検証することで、有効な上清成分の液性因子を確定させるため検証を行なった。

#### 実験項目 3

各 MSCs-CM および SHED-CM 抽出成分が生体内における骨再生に及ぼす影響

- ① 免疫不全マウス (BALB/c-nu) に対して、全身麻酔下 (三種混合麻酔) でトレフィンバーを用いて、頭蓋冠に骨欠損を作製し、これを骨欠損モデルとした。骨欠損部に、SHED、SHED-CM、 $\alpha$ -MEM を浸潤させたアテロコラーゲン担体を骨欠損部に移植した。
- ② 骨再生・修復の経日的変化について、マイクロ CT を用いて、三次元的に解析を行った。
- ③ 組織学的解析として、組織切片を作製し、HE 染色・Masson's trichrome (MT) 染色にて、新生骨を評価した。骨代謝関連因子、および血管新生関連因子 (VEGF、CD31 など) の免疫組織化学染色法を用いて評価した。

### 4. 研究成果

(1) 各 MSCs-CM 中の液性因子の解析と SHED-CM 有効成分抽出の探索

ヒト乳歯およびヒト永久歯から SHED および DPSCs を単離・培養し、各 MSCs-CM を精製した。その後、Magneric Luminex assay を用いて、上清中に含有するタンパク質について網羅的

定量解析を得た。その結果、SHED-CM には、血管新生に影響を与える M-CSF、MCP-1、ANG、bFGF、HGF、VEGF-C、および VEGF-A、骨代謝関連マーカーである OPG、OPN、BMP-2、および BMP-4 が両培養上清中に多く含まれていた。また、SHED-CM には、BDNF、 $\beta$ -NGF、GDNF、NT-3 などの神経栄養因子が含まれていることが確認された。

### (2) 各 MSCs-CM および SHED-CM 抽出成分が細胞増殖・基質代謝能に及ぼす影響

① HUVEC および MT3T3-E1 を培養し、SHED-CM を添加し、細胞増殖能について、MTS assay および BrdU assay を用いて検討を行った。その結果、SHED-CM 群は非添加群と比較して、有意な細胞増殖能の亢進が認められた。

② 各細胞の骨代謝因子および血管新生マーカーの発現レベルについて、定量 PCR を用いた遺伝子解析および Odyssey<sup>®</sup>を用いた定量 western blot 解析を行った。hBMSCs に SHED-CM を添加した結果、VEGF、Ang 1、Ang2、HGF、ALP、Runx2、OCN の遺伝子発現は有意に亢進された。MC3T3-E1 においても同様に、ALP、Runx2、OCN の遺伝子発現に有意な亢進が認められた。

### (3) 各 MSCs-CM および SHED-CM 抽出成分が生体内における骨再生に及ぼす影響

① 骨再生・骨修復の経日的変化について、マイクロ CT を用いて、三次元的に解析を行った。

骨欠損を形成しアテロコラーゲンを移植した直後のマイクロ CT 画像では、各群で欠損部の大きさに差異は認められなかった。移植 4 週間および 8 週間において、SHED 群、SHED-CM 群では、明らかな骨欠損部の縮小と、骨欠損中心部に再生骨が認められた。一方、対照群では、骨欠損部のわずかな縮小と、少量の再生骨が認められた。再生骨体積は、移植 4 週間では、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た。移植 8 週間では、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く、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。

② 組織学的解析として、組織切片を作製し、HE 染色・MT 染色にて、新生骨を評価した。

HE 染色により、SHED-CM 群および SHED 群で、再生骨が観察された。MT 染色では、成熟骨の面積率では、SHED-CM 群は、SHED 群、対照群と比較して有意に大きな値を示した。SHED 群は対照群と比較して有意に大きな値を示した。コラーゲン線維および類骨の面積率では、SHED 群は、SHED-CM 群、対照群と比較して有意に大きく、SHED-CM 群は対照群と比較して、有意に大きな値を示した。

③ VEGF-A 免疫組織化学染色

血管、再生骨付近に多く染色が観察された。SHED-CM 群および SHED 群は、対照群より有意に高い VEGF-A 染色が認められた。

#### CD31 免疫組織化学染色

CD31 染色により血管数を計測した結果、SHED-CM 群および SHED 群は、対照群と比較して有意に多く血管が存在することが示された。

以上の結果より、SHED-CM の生体への移植により骨再生が促進されることが明らかとなった。また、骨芽細胞および臍帯静脈内皮細胞等の細胞増殖能や基質形成能に大きな影響を及ぼすことが示された。以上より、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞の培養上清を応用した骨再生治療への有効性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiraki T, Kunimatsu R, Nakajima K, Abe T, Yamada S, Rikitake K, Tanimoto K.	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 -

1. 著者名 Kunimatsu R, Hiraki T, Rikitake K, Nakajima K, Putranti NAR, Abe T, Ando K, Nakatani A, Sakata S, Tanimoto K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of Human Deciduous Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Conditioned Medium on the Metabolism of HUVECs, Osteoblasts, and BMSCs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11203222	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0件

〔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
---------	---------