

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32645

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21098

研究課題名（和文）ヒト歯髄幹細胞移植の骨折治癒メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of fracture healing in human dental pulp stem cell transplantation

研究代表者

山川 樹（Yamakawa, Daiki）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40911615

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、移植したヒト歯髄幹細胞の骨折治癒における生体内での作用（MOA：Mode of Action）を明らかにすることを目指した。本研究の結果で通常培地、骨分化誘導培地、ヘリオキサンチン誘導体添加の骨分化誘導培地で培養したヒト歯髄幹細胞に含有するサイトカインの β -FGF に有意差が認められなかった。骨折部にヒト歯髄幹細胞を移植し、骨折部に移植細胞を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎顔面領域の骨欠損に対して自家骨や人工材料を用いた治療の選択をされてきた。しかし、外科的侵襲性や材料の吸収など様々な問題点がある。われわれは不要な親知らずから採取でき、高い増殖率と多分化能のあるヒト歯髄幹細胞を用いて骨治癒を促進したことを明らかにした。

しかし、移植した歯髄幹細胞の生体内でのメカニズムは明らかになっていない。

そこで、本研究では、移植したヒト歯髄幹細胞の生体内のメカニズムを解明することで、新たな細胞治療における知見を有することができると考えられる。ヒト歯髄幹細胞の臨床応用に向けて、さらなる発展させることが可能となるだけでなく、再生医学、歯科医学や基礎医学等に影響する研究となる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the in vivo mode of action (MOA) of transplanted human dental pulp stem cells in fracture healing.

In this study showed no significant difference in β -FGF contained in human dental pulp stem cells cultured in normal medium, osteogenic medium, and osteogenic medium with helioxanthin derivative. Human dental pulp stem cells were transplanted into the fracture site, and the transplanted cells were observed in the fracture healing area.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯髄幹細胞 骨治癒 骨再生医療 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域では、唇顎口蓋裂腫瘍、慢性歯周炎、外傷などの骨欠損疾患があり、患者にとって機能的、整容的、精神的苦痛を与え、その治療は焦眉の課題である。従来、骨欠損に対して、自家骨や人工材料などの治療法が選択されてきたが、採取による外科的侵襲、倫理的観点など多くの課題を抱えているのが現状である。これらの顎骨欠損に対して、幹細胞を用いた研究が行われており、応募者はヒト歯髄幹細胞と骨形成生理活性物質のヘリオキサンチン誘導体(TH)を用いて高効率な骨分化誘導法を確立し、さらにマウス頭蓋骨欠損モデルや脛骨欠損モデルに足場を必要としないヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞シートを作製し、移植を行い、新生骨誘導能を導き出したことを報告した(Stem Cell Res Ther, 2018)。しかし、ヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞の生体内での評価、すなわち移植したヒト歯髄幹細胞の識別に難渋した。そこで、応募者はその課題を解決すべく生細胞蛍光ラベルである PKH26 を用いてヒト歯髄幹細胞の識別を試みた。そして、マウス脛骨骨折モデルにおいて移植したヒト歯髄幹細胞が骨折治癒を促進したことを見いだした(Int J Mol Sci, 2020)。それでもなお、次の課題が残された。それはヒト歯髄幹細胞が生体内で骨分化したのか、またはヒト歯髄幹細胞が生体内でサイトカインを放出し、宿主側の細胞に働きかけ骨分化誘導を促進したのか、歯髄幹細胞の生体内での作用機序は不明であった。これまでに移植細胞の生体内での作用 MOA:(Mode of Action)を明らかにした報告はない。そこで、本研究では移植した歯髄幹細胞の生体内における MOA を解明することとした。

2. 研究の目的

マウス脛骨骨折モデルにおいて移植したヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞が骨折治癒を促進したことを報告したが、移植した細胞が宿主での MOA は不明である。そこで、移植細胞が生体内でどのように骨再生を促進するのか、マウス脛骨骨折モデルを用いて移植したヒト歯髄幹細胞の骨折治癒のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒト歯髄幹細胞のサイトカインの検出

東京医科大学病院歯科口腔外科・矯正において 16-29 歳の抜去歯よりヒト歯髄幹細胞採取(東京医科大学医学倫理審査承認 No. T2019-0142)し、通常培地、骨分化誘導培地および TH 添加骨分化誘導培地の 3 群で培養し、ヒト歯髄幹細胞の培養上清に放出されているサイトカインを網羅的抗体アレイを用いて解析し、検出された骨分化誘導能の高いサイトカインを検出し ELISA にて定量化する予定であったが、コロナ禍の影響および物品の価格高騰のため、今回はサイトカインを β -FGF に厳選し、定量化を行なった。

(2)ヒト歯髄幹細胞移植による放出サイトカインの生体内での解析

ヒト歯髄幹細胞を温度応答性培養皿(Up Cell®)にてシート培養を行い、生後 8 週齢の NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD-SCID)雄マウスを用い、脛骨骨折モデルを作成し、歯髄幹細胞移植を行った。

形態学的評価には、マイクロ CT による三次元レベルでの微細形態学検討を行った。組織学的評価には、H-E 染色、Alcian blue 染色、Masson trichome 染色、von Kossa 染色、SP7 の発現の有無を免疫染色にて行った。また、採取された組織を顕微鏡下で組織切片を観察しながら、組織上の標的とする細胞塊をレーザーで採取する Laser Microdissection 法とリアルタイム PCR 法と複合することで、移植したヒト歯髄幹細胞のサイトカインの発現を検討予定だったが、サイトカインの発現には至らず、今後検討予定である。

4. 研究成果

本研究ではヒト歯髄幹細胞の移植部での骨治癒メカニズムの解明を目的として研究を行った。in vitro ではヒト歯髄幹細胞の培養中のサイトカインの定量化を行なった。通常培地、骨分化誘導培地、高効率に骨分化誘導する低分子化合物である TH を添加した骨分化誘導培地の 3 群において培養液中に放出される骨形成に関与するサイトカインである β -FGF を ELISA にて定量化を行なった。その結果、3 群間で明らかな有意差を認められなかった(図 1)。

in vivo では、ヒト歯髄幹細胞を上記の 3 群で培養を行い、マウス脛骨の骨折部に移植した結果、骨折部に移植したヒト歯髄幹細胞を認め骨折治癒した。ヘリオキサンチン誘導体添加骨分化誘導培地の群が骨折治癒の

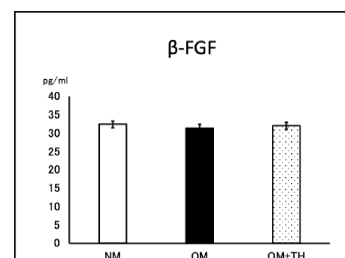


図1 Release cytokine by DPSCs

促進を認めたが、骨折部のサイトカインの検出に難渋し、明らかな MOA の解明には至らなかった。さらなるヒト歯髄幹細胞から放出される骨折治癒に関連するサイトカインの検証と移植細胞の骨折治癒でのメカニズムの解明が必要と考えられた。

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 Hatori Ayano, Fujii Yasuyuki, Kawase-Koga Yoko, Ogasawara Toru, Chikira Jin, Minami Sakura, Yamakawa Daiki, Chikazu Daichi	4. 巻 166
2. 論文標題 VCAM-1 and GFPT-2: Predictive markers of osteoblast differentiation in human dental pulp stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116575 ~ 116575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2022.116575	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 Hatori Ayano, Yamakawa Daiki, Al-Maawi Sarah, Dohle Eva, Chikira Jin, Fujii Yasuyuki, Miki Megumu, Sader Robert, Chikazu Daichi, Ghanaati Shahram, Kawase-Koga Yoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Platelet-Rich Fibrin-Conditioned Medium as an Alternative to Fetal Bovine Serum Promotes Osteogenesis of Human Dental Pulp Stem Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1196 ~ 1196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bioengineering10101196	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daiki Yamakawa, Yoko Kawase-Koga, Yasuyuki. Fujii, Marika Sato, Yuki Kanno, Ayano Hatori, Daichi Chikazu
2. 発表標題 Effects of bone healing by human dental pulp stem cells: using cell-sheet technology
3. 学会等名 Goethe Symposium 2nd Joint Japanese-German CMF Convention（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------