

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20494

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞を用いた骨組織および神経組織再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative therapy on bone and nerve tissue using dental pulp stem cell

研究代表者

秦 正樹 (HATA, MASAKI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：20632871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋骨欠損ラットに歯髄幹細胞を移植し、骨欠損に対する効果を検討した。また、STZ誘導糖尿病マウスの後肢骨格筋に歯髄幹細胞を移植し糖尿病性神経障害に対する効果を検討した。ラット歯髄幹細胞とコラーゲンを共に移植した群において欠損の辺縁部と中心部に骨の新生が確認された。ヒト歯髄幹細胞移植は糖尿病で低下した坐骨神経伝導速度、坐骨神経内血流量、感覚閾値を改善した。以上より、歯髄幹細胞は骨組織および神経組織再生治療法として有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether transplanted-DPSCs produce new bone and improve diabetic polyneuropathy. Rat-derived DPSCs were injected into a critical-sized bone on carpal bone. The transplantation of DPSCs with Collagen showed bone formation starting from the edges as well as from the center of the defect. Human-derived DPSCs were injected into unilateral hindlimb skeletal muscles of streptozotocin-induced diabetic mouse. The transplantation of DPSCs improved the impaired sciatic nerve conduction velocity, sciatic nerve blood flow and sensation. These results revealed that DPSCs may be an effective regenerative therapy on bone and nerve tissue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯髄幹細胞 細胞移植 顎骨欠損 糖尿病性神経障害

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯髄幹細胞は 2000 年に Gronthos らによって同定された歯髄組織に存在する未分化間葉系幹細胞である。その特性として、多分化能を有し、骨芽細胞、脂肪細胞、筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞などに分化誘導可能であり、免疫抑制作用を持つといった報告が、T 細胞の増殖活性の抑制や IL-17 の発現量を抑制するという結果から示されている。その他にも、細胞移植治療にとって重要と考えられる、凍結保存を行ってもその性質、細胞表面抗原、増殖能、分化能などを維持すると報告されている。

(2) 口腔顎顔面領域において、悪性腫瘍、口唇口蓋裂、外傷によって、広範囲の顎骨欠損を伴うことが多い。現在その治療法として、チタンプレートや自家骨による再建手術、補綴物による欠損部の閉鎖が行われているが、完全な機能回復は難しいと考えられる。

(3) 糖尿病は、国民栄養調査の推移より年々増加傾向にあり、2012 年の調査では、糖尿病患者は 950 万人、予備群は 1100 万人存在し、合わせると 2050 万人におよんでいる。糖尿病性神経障害は糖尿病患者の 30 ~ 50% が罹患しており、最も発症頻度が高く、しびれや痛みなどの異常感覚、あるいは感覚低下や自律神経障害を引き起こし、患者の QOL を低下させる。その治療法として血糖コントロールや代謝異常の改善、対症療法が用いられるが、病態が進行し血管や神経が変性した状態では不十分と考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) ラットの歯髄組織より分離・培養した歯髄幹細胞と、同意の得られた患者より入手した、抜去歯の歯髄組織より分離・培養した歯髄幹細胞の臨床応用を目指している。疾患モデル動物を用いて細胞移植効果の評価を行う。

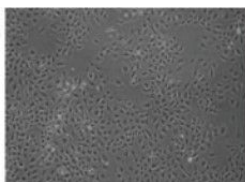
(2) 頭蓋骨欠損モデルラットを用いて歯髄幹細胞の骨組織再生治療の有効性を証明する。

(3) 糖尿病モデルマウスを用いて歯髄幹細胞の神経組織再生治療の有効性を証明する。

### 3. 研究の方法

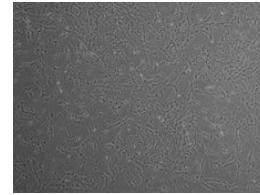
(1) ラット由来歯髄幹細胞の分離・培養  
6 週齢雄性 SD ラットの歯牙より歯髄組織を採取後、トリプシンコラゲナーゼにて DPSCs の分離を行い、 $\alpha$ -MEM を用いて細胞培養を行った(図 1)。

図 1.



(2) ヒト由来歯髄幹細胞の分離・培養  
同意の得られた抜去歯より歯髄組織を採取し、トリプシンコラゲナーゼにて DPSCs の分離を行い、 $\alpha$ -MEM を用いて細胞培養を行った(図 2)。

図 2.



(3) 歯髄幹細胞の同定  
CD29, CD34, CD45, CD49d, CD90 抗体を用いて、フローサイトメトリーを使用し表面抗原の解析を行った。

(4) 分化能の評価  
脂肪、骨分化誘導キットを用いて分化誘導を行い、Oil-red-O, FABP-4, ALP, Osteocalcin を用いて染色を行った。

(5) 移植材料上での歯髄幹細胞の活性  
 $\alpha$ -TCP, HA, Collagen 上でラット歯髄幹細胞を培養し、CCK-8 を用いて培養 2, 4, 5 日後の細胞増殖活性を評価した。また、LabAssay™ ALP を用いて培養 7, 14 日後の ALP 活性を評価した。

(6) 細胞形態観察  
SEM (走査型電子顕微鏡) を用いて培養 7 日後の  $\alpha$ -TCP と HA 上でのラット歯髄幹細胞を観察した。

(7) 頭蓋骨欠損ラットへの細胞-足場材料の移植  
ラット歯髄幹細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を頭蓋骨欠損モデルラット(直径 4.6mm)に移植材料と共に移植した。4 週間後に骨形成状態の観察を行った。

(8)  $\mu$ CT による細胞移植部の観察  
移植 4 週間後に、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT により骨形成状態の観察を行った。

(9) 糖尿病の誘導  
6 週齢雄性ヌードマウスに対し streptozotocin (STZ) を腹腔内投与した。

(10) 糖尿病マウスへの歯髄幹細胞移植  
STZ 投与 8 週間後に、片側後肢骨格筋にヒト歯髄幹細胞 ( $1 \times 10^5$  個) を 10 か所に分けて移植した。非移植側には 1% アルブミン含有生理食塩水を注入した。

(11) 糖尿病性神経障害に対する移植効果の

## 評価

移植後 4, 16 週にヒト歯髄幹細胞の移植効果を以下の項目について検査した。

### 坐骨神経伝導速度

Neuropack MEB-9400 を用いて坐骨神経運動神経伝導速度(MNCV)および感覚神経伝導速度(SNCV)の測定を施行した。

### 坐骨神経内血流量

Omegaf flow レーザ血流量計を用いて測定した。

### 電流知覚閾値

Neurometer を用いて足底における 5Hz, 250Hz, 2000Hz の閾値を測定した。

### 免疫組織染色

後肢骨格筋を摘出, 切片を作成し, anti-human nuclei 抗体, Osteocalcin 抗体, FABP-4 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

### 遺伝子発現解析

後肢骨格筋における移植細胞由来の血管新生因子, 神経栄養因子の発現を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 歯髄幹細胞の培養・同定

フローサイトメトリーを用いてラット由来歯髄幹細胞, ヒト由来歯髄幹細胞の表面抗原解析を行った。各々 CD29, CD49d, CD90 陽性, CD34, CD45 陰性を示した(図 3)。その後, 骨および脂肪分化誘導を行い, Oil red O 染色, FABP-4 免疫染色, ALP 染色, Osteocalcin 免疫染色により, 脂肪細胞と骨芽細胞への分化が確認された(図 4)。

図 3.

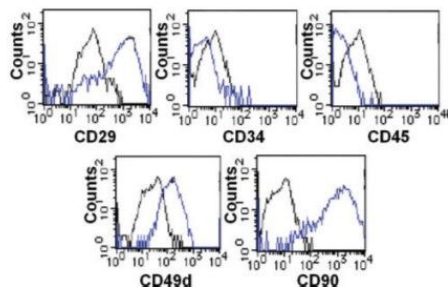
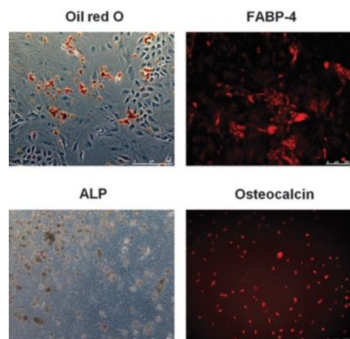


図 4.



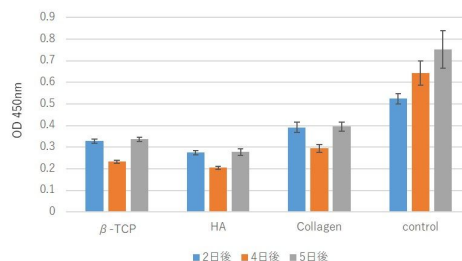
(2) ラット歯髄幹細胞移植の頭蓋骨欠損に対

## する効果

### 細胞増殖活性

培養 2, 4, 5 日後において増殖活性を維持した(図 5)。

図 5.



### ALP 活性

培養 7 日後で活性を維持, 14 日後で低下を確認した。

### SEM による細胞形態観察

培養 7 日後に  $\beta$ -TCP, HA 上に歯髄幹細胞の存在を確認した。

### $\mu$ CT による骨欠損部の観察

DPSCs/ $\beta$ -TCP 顆粒移植群では, 欠損部周囲より骨新生が確認された。DPSCs/HA 顆粒移植群では, 辺縁部の骨新生と顆粒が確認された。DPSCs と Collagen を共に移植した群においては, 欠損の辺縁部と中心部に骨の新生が確認された。

### (3) ヒト歯髄幹細胞移植の糖尿病性神経障害に対する効果

#### 体重・血糖

STZ 投与 8 週後のヌードマウスの片側後肢骨格筋にヒト由来歯髄幹細胞を移植( $1 \times 10^5$  個)し, 4 週間後の体重と血糖を計測した。正常群: 体重  $26.9 \pm 1.1$ g, 血糖値  $107.0 \pm 12.0$ mg/dL 糖尿病群: 体重  $26.0 \pm 0.7$ g, 血糖値  $327.0 \pm 50.0$ mg/dL

### 坐骨神経伝導速度

ヒト由来歯髄幹細胞移植後 4 週の坐骨神経における運動神経伝導速度および感覚神経伝導速度を測定した。糖尿病群非移植側では, 正常群と比較し有意な低下を確認したが, 歯髄幹細胞の移植により有意な上昇を確認した。また, 移植後 16 週においても同様の傾向を示した。(運動神経伝導速度改善率: 移植後 4 週 125%, 移植後 16 週 146% 感覚神経伝導速度改善率: 移植後 4 週 159%, 移植後 16 週 174%)

### 坐骨神経内血流量

坐骨神経内血流量は, 糖尿病群非移植側において正常群と比較し有意な低下を確認したが, 歯髄幹細胞の移植により有意な増加を確認した。また, 移植後 16 週においても同様の傾向を示した。(坐骨神経内血流量改善率: 移植後 4 週 140%, 移植後 16 週 147%)

#### 電流知覚閾値

5Hz, 250Hz, 2000Hz の電流刺激における電流知覚閾値を測定した。糖尿病非移植側において電流知覚閾値の増加が確認された。ヒト歯髄幹細胞の移植により知覚閾値の有意な改善が確認された。

#### ヒト由来歯髄幹細胞の移植後の動態

Anti-human nuclei 抗体, Osteocalcin 抗体, FABP-4 抗体により, 陽性細胞の重なりを確認されなかったことより, 移植した細胞が骨分化, 脂肪分化することなく, 主に筋束間隙に存在していることが確認された。

#### ヒト由来歯髄幹細胞の移植効果

ヒト由来歯髄幹細胞移植側の後肢骨格筋より human VEGF, human NGF の発現が確認され, 非移植側では確認されなかった。

以上より, 歯髄幹細胞はラットやヒトの歯髄組織より分離培養することが可能であり, 組織再生治療の細胞供給源として有用であると確認された。頭蓋骨欠損に対する歯髄幹細胞移植は, 移植材料と併用することにより骨の新生を認めた。糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植の効果として, 坐骨神経伝導速度, 坐骨神経内血流量, 電流知覚閾値の改善が認められた。また, 移植した細胞は, 分化することなく筋束間隙にとどまり, サイトカインを分泌していることが確認された。今後は, 新たな治療法として臨床応用にむけた検討が必要と考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計1件)

Hata M, Omi M, Kobayashi Y, Nakamura N, Tosaki T, Miyabe M, Kojima N, Kubo K, Ozawa S, Maeda H, Tanaka Y, Matsubara T, Naruse K. Transplantation of cultured dental pulp stem cells into the skeletal muscles ameliorated diabetic polyneuropathy: therapeutic plausibility of freshly isolated and cryopreserved dental pulp stem cells. Stem Cell Research and Therapy, 査読有, 2015, 6:162 doi: 10.1186/s13287-015-0156-4

##### [学会発表](計7件)

Hata M, Matsukawa R, Aoyagi A, Omi M, Matsuoka A, Ozawa S, Naruse K, Matsubara T, Takebe J. EFFECTS OF DENTAL PULP STEM CELLS ON MAXILLOFACIAL BONE REGENERATION 4th Joint meeting of the ISMR-AAMP CONFERENCE 2017

秦 正樹, 大見真衣子, 小林泰子, 中村信久, 宮部 愛, 姫野龍仁, 神谷英紀, 尾澤昌悟, 中村

二郎, 武部 純, 松原達昭, 成瀬桂子. ヒト歯髄幹細胞移植による糖尿病性神経障害に対する治療効果発現メカニズムの検討. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017

秦 正樹, 大見真衣子, 小林泰子, 中村信久, 姫野龍仁, 神谷英紀, 尾澤昌悟, 中村二郎, 武部 純, 松原達昭, 成瀬桂子. 糖尿病性神経障害に対するヒト歯髄幹細胞移植の有効性の検討. 第 16 回日本再生医療学会総会 2017

秦 正樹, 大見真衣子, 福澤 蘭, 小島規永, 成瀬桂子, 尾澤昌悟, 松原達昭, 武部 純. 磁場刺激を用いた歯髄幹細胞の骨組織再生治療への検討. 日本補綴歯科学会第 125 回学術大会 2016

秦 正樹, 成瀬桂子, 松原達昭. 糖尿病性神経障害に対する歯髄細胞移植の応用. 第 15 回日本再生医療学会総会 2016

秦 正樹. 歯髄幹細胞の機能解析と組織再生治療への有効性の検討. 第 57 回歯科基礎医学会 2015

秦 正樹, 大見真衣子, 成瀬桂子, 尾澤昌悟, 松原達昭, 田中貴信. 骨補填材が歯髄幹細胞の増殖および骨分化に与える影響. 第 36 回日本炎症・再生医学会 2015

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

秦 正樹 (HATA MASAKI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号: 20632871