

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11656

研究課題名(和文)高純度歯髄幹細胞の顎骨壊死治療への応用

研究課題名(英文) Application of purified dental pulp stem cells for treatment of osteonecrosis of the jaw

研究代表者

安居 孝純 (YASUI, Takazumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：80348771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難治性疾患であるビスフォスフォネート関連顎骨壊死予防および治療のための歯髄幹細胞移植の有効性を検討することを目的として研究を行った。これまでにヒト歯髄幹細胞分離マーカーを同定し、フローサイトメトリーにより純化した歯髄幹細胞が高い増殖能および骨形成能を示すことを報告した。本研究では、ビスフォスフォネート投与後に抜歯を行った免疫不全マウスに純化歯髄幹細胞を移植することで、顎骨壊死を予防する能力があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビスフォスフォネート製剤等の骨吸収抑制薬により顎骨壊死を生じることが報告されている。抜歯が発症リスク因子とされ、骨吸収抑制薬投与前の抜歯と口腔ケアが重要と考えられているが、実際には投与後に抜歯を必要とする機会は少なく、顎骨壊死予防の有効な手段の確立が望まれる。また、顎骨壊死を生じた際には外科的に顎骨切除を行うことがあり、切除部の再生療法の開発が望まれる。本研究では、予期的に分離したLNGFR(Low+)THY-1(High+)DPSCをビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)モデルマウスに移植し、抜歯後の顎骨壊死予防への有効性を評価した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the efficacy of dental pulp stem cell transplantation for the prevention and treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. We previously identified isolation markers of human dental pulp stem cells and reported that purified dental pulp stem cells by flow cytometry show high proliferation and osteogenic potential. In the present study, it was suggested that transplantation of purified dental pulp stem cells into immunodeficient mice after taking bisphosphonate and tooth extraction has the ability to prevent osteonecrosis of the jaw.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 顎骨壊死 フローサイトメトリー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯髄には、骨髄と同様に骨・軟骨・脂肪等への多分化能を有する幹細胞の存在が知られている。これらの歯髄幹細胞(DPSC)は、増殖能が高く、比較的採取しやすいため、組織再生のための細胞ソースとして盛んに研究が行われている。しかしながら、従来行われている接着培養法で DPSC を分離すると、異なるフェノタイプを有する細胞(前駆細胞や他の細胞)が混入し、雑多な細胞集団となる可能性が否定できない。そのため、分離培養した細胞間で増殖能や骨形成能に差が生じ、目的通りの移植効果を担保する「質」を得ることが非常に困難である。そこで、予期的に高純度の DPSC を分離する手法の確立を目指し、フローサイトメーターを用いてヒト歯髄幹細胞特異的なマーカーの同定を行い、LNGFR(CD271)および Thy-1(CD90)が有効なマーカーであると報告した(Yasui et al. Journal of Dental Research. 2016)。このマーカーを用いて、歯髄組織より培養を経ることなく直接的に分離した LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup> DPSC は、高いコロニー形成能および間葉系幹細胞マーカーの発現を認めた。また、マウス頭蓋骨欠損モデルに移植したところ、高い増殖能および骨形成能が認められた。予期的に分離した高純度のヒト歯髄幹細胞は、高い増殖能および骨形成能を示すことから、移植ソースとして再生医療への応用に有用であると考えられた。ビスフォスフォネート製剤や抗 RANKL 抗体デノスマブ等の骨吸収抑制薬により、顎骨壊死を生じることが報告されている。これらの顎骨壊死は投与量の増加に伴い発症頻度が上昇し、抜歯を契機に発症することが多い。骨吸収抑制薬の投与に際し、投与前の抜歯と口腔ケアの重要性が叫ばれているが、実際には投与後に抜歯を必要とする機会は少なくなく、顎骨壊死予防の有効な手段の確立が望まれる。また、顎骨壊死を生じた際には外科的に顎骨切除を行うことがあり、切除部の再生療法の開発が望まれる。本研究では、予期的に分離した LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>DPSC をビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)モデルマウスに移植し、顎骨壊死予防および治療に有効か評価を行った。

### 2. 研究の目的

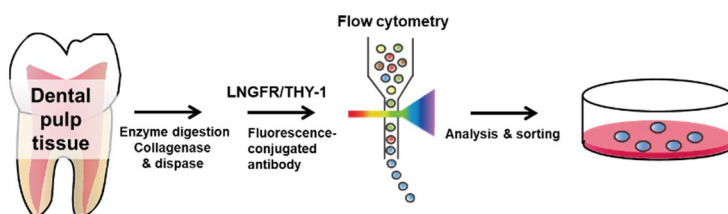
骨吸収抑制薬関連顎骨壊死は BP 投与後の抜歯を契機に発症することが多い。そこで、BP 投与後の免疫不全マウスの抜歯窩に予期的に分離した LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>DPSC を移植し、顎骨壊死予防および治療への有用性について評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

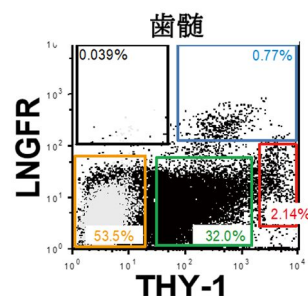
#### (1) 予期的分離および培養

抜去歯より歯髄を採取し、2 mg/mL collagenase と 4 mg/mL dispase により処理を行った後、歯髄幹細胞に特異的なマーカーである LNGFR および THY-1 を用いて、フローサイトメーターにて歯髄幹細胞の分離を行った(図1)。LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>の分画より分離した細胞の増殖能、骨形成能が高いという結果が得られていることから、この分画の細胞を用いて実験を行った(図2)。

(図1) 歯髄幹細胞の分離方法



(図2) 歯髄幹細胞の FACS プロファイル



## (2) 免疫不全マウスを用いた顎骨壊死モデルの作製

C57BL/6J マウスでの Kuroshima ら (JBMR 2018)の方法を参考にして、NOD/SCID マウスにて BRONJ モデルを作製した。ゾレドロン酸およびシクロホスファミド 150 $\mu$ /kg を 3 週間投与後に抜歯を行い作製したところ、免疫不全マウスである NOD/SCID マウスでは顎骨壊死範囲が広く、2 週間程度で死亡するマウスが多くみられた。そこで、シクロホスファミドの投与量を減量し、BRONJ モデルマウスを作製した。ゾレドロン酸 250 $\mu$ g/kg およびシクロホスファミド 125mg/kg を 2 回/週、3 週間投与した後に抜歯を行い作製した。

## (3) 細胞の調整、移植

3 $\times$ 10<sup>5</sup> 個の歯髄幹細胞を U 底プレートにて 3 次元培養し、この細胞をゾレドロン酸およびシクロホスファミドを 3 週間投与後のマウスの抜歯窩に移植した。

壊死骨の露出範囲、組織学的評価、破骨細胞数、マイクロ CT による骨形成の評価を行った。

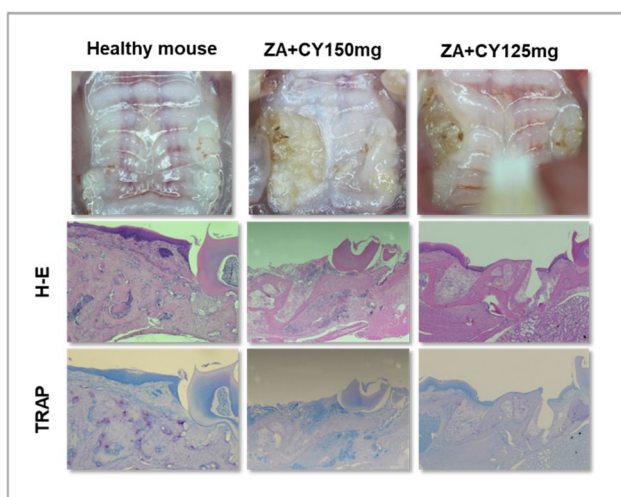
## 4. 研究成果

### (1) 免疫不全マウスを用いて ONJ モデルを作製

ゾレドロン酸 250 $\mu$ g/kg およびシクロホスファミド 150 $\mu$ /kg を 3 週間投与後に抜歯を行い作製したところ、免疫不全マウスである NOD/SCID マウスでは顎骨壊死範囲が広く、2 週間程度で死亡するマウスが多くみられた(図 3)。シクロホスファミドの投与量を減量し、ゾレドロン酸 250 $\mu$ g/kg およびシクロホスファミド 125mg/kg を 3 週間投与した後に抜歯を行ったモデルでは抜歯 4 週間まで生存し、壊死骨の露出範囲は減少していた。150mg/kg シクロホスファミド投与群では、ヘマトキシリン エオジン染色(H-E 染色)で広範囲に骨破壊が認められ、周囲骨に骨小腔内の骨細胞が消失した empty lacunae を確認でき骨壊死を呈していた。シクロホスファミド 125mg/kg 投与群では、限局した範囲に骨梁内の empty lacunae を認め、上皮の欠損している部分が確認された。

破骨細胞のマーカである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(Tartrate-resistant acid phosphatase)の染色(TRAP 染色)を行ったところ、ONJ 群では TRAP 陽性細胞の減少が認められた。

(図 3) 免疫不全マウスを用いた顎骨壊死モデル



### (2) 抜歯窩への DPSC 移植による ONJ 予防

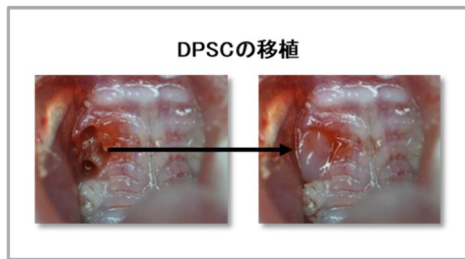
LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup> hDPSC を ZA および CY125mg/kg 投与マウスの抜歯窩に移植し、軟組織形成を促すことを確認した(図 4)。移植 4 週間後、抜歯窩は上皮で完全に被覆され、骨露出は認められ

なかった(図 5)。一方、DPSC を移植しなかった群では上皮が欠損し、壊死骨の露出が認められた。また、empty lacunae の割合が、DPSC 移植群では Control 群と比較して少なかった。TRAP 陽性細胞の割合は、両群に差がみられなかった。

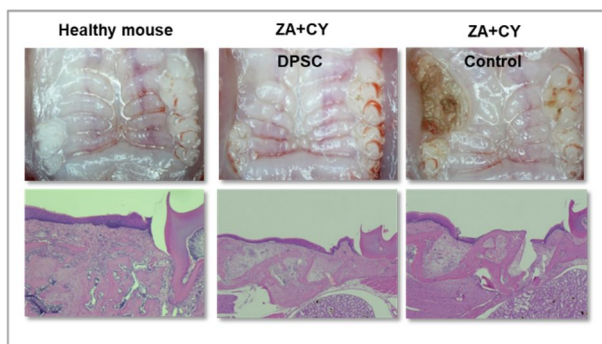
抜歯窩内の骨形成についてマイクロ CT による評価を行ったが、DPSC 移植群はコントロール群と比較して有意な骨形成は認められなかった。H-E 染色でも同様に、DPSC 移植群はコントロール群と比較し有意な骨形成は認められなかった。

今後の課題として骨形成を促進する移植方法の開発が望まれ、骨分化誘導を行った細胞や内皮細胞と組み合わせることで、効果的な骨再生のための移植ソースの作製を検討している。

(図 4)DPSC の抜歯窩への移植



(図 5)抜歯および DPSC 移植 4 週間後



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 Yasui Takazumi, Mabuchi Yo, Morikawa Satoru, Onizawa Katsuhiko, Akazawa Chihiro, Nakagawa Taneaki, Okano Hideyuki, Matsuzaki Yumi	4. 巻 37
2. 論文標題 Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-017-0039-4	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安居孝純
2. 発表標題 高い治療効果を有する歯髄幹細胞の分離をめざして
3. 学会等名 第38回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安居孝純, 馬淵 洋, 森川 暁, 鬼澤勝弘, 赤澤智宏, 中川種昭, 岡野栄之, 松崎有未
2. 発表標題 純化歯髄幹細胞は高い骨形成能を有する
3. 学会等名 第37回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2016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
研究分担者	中川 種昭  (NAKAGAWA Taneaki)  (00227745)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授    (32612)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	森川 暁  (MORIKAWA Satoru)  (00424169)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師    (32612)	
研究 分 担 者	馬淵 洋  (MABUCHI Yo)  (50424172)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教    (12602)	