

令和元年6月26日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11788

研究課題名(和文) 微小環境構築による乳歯歯髄幹細胞(SHED)の動態制御と口蓋裂骨再生治療への応用

研究課題名(英文) Modulation of stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) activity by construction of microenvironment and its application to bone regeneration of jaw cleft

研究代表者

谷本 幸太郎 (Tanimoto, Kotaro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号：20322240

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)：乳歯歯髄幹細胞由来間葉系幹細胞(SHED)、骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)、歯髄由来間葉系幹細胞(DPSCs)の比較検討の結果、いずれも同等の骨分化能を有していることが明らかとなった。BALB/c-nuマウス骨欠損部へのSHED/炭酸アパタイト(CAP)担体移植を行った。μCTによる評価では、SHED移植群では対照群と比較して有意な骨再生が認められ、BMSCs群、DPSCs群と比較してより高い骨再生傾向が認められた。

SHEDはhDPSCsおよびhBMSCsに対して同等以上の骨再生能を有していることが明らかとなり、骨再生治療における有用な細胞源となり得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

乳歯歯髄幹細胞由来間葉系幹細胞(SHED)は、歯科治療において非侵襲的かつ比較的容易に入手可能である利点を有している。さらに本研究により、SHEDは高い増殖能および骨分化能を有しており、動物実験において有効な骨再生が示された。乳歯由来であるために適用が小児に限定されるものの、乳歯から永久歯への交換期に骨移植治療が行われる口蓋裂患者においては最適な幹細胞供給源となり得ることが示唆された。以上のことから、低侵襲で有効な再生医療が口蓋裂治療の選択肢に加わる可能性が示されたことは社会的意義が認められる。

研究成果の概要(英文)：The differentiation in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and dental pulp stem cells (hDPSCs) was evaluated, and they had equal ability of osteogenic differentiation. SHED and carbonated hydroxyapatite (CAP) were transplanted into bone defect in BALB/c-nu mice. μCT revealed that significantly higher bone regeneration was shown in SHED group than that of control group, and relatively higher than that of BMSCs and DPSCs.

In conclusion, SHED has equal or more bone regeneration ability to BMSCs and DPSCs, and it might become a powerful candidate of stem cell source in regeneration medicine.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：乳歯歯髄幹細胞由来間葉系幹細胞 口蓋裂

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂 (CL/P) は、胎生期における顔面突起の癒合不全に起因する顎裂を特徴とする、多因子性の疾患である。病態として、構音障害や顔面の変形を呈し、また、上顎歯列弓の狭窄、歯の先天欠如や位置異常による不正咬合を発症する。顎裂部の骨架橋の確立や歯槽堤の形成、鼻口腔瘻の完全閉鎖などを目的として、腸骨移植が広く行われる。しかし、腸骨移植には、長期の入院や腸骨採取後の疼痛、これに伴う歩行障害など、とりわけ学童期の患者にとって大きな負担が伴うのも現実である。さらに、近年、低年齢時の腸骨移植も検討されているが、腸骨の大きさに応じた移植骨量で行わなければならない制約がある。

そこで、申請者らは、腸骨採取に伴う侵襲を低減しながら移植体の必要量を確保し、確実な骨再生を達成する方法として、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) を用いた骨再生誘導法の検討を重ねてきた。腸骨や顎骨骨髄由来の BMSCs を用いることにより良好な骨再生が認められたが、骨髄は穿刺により得られることから、従来法である自家腸骨移植に比較して、移植体の採取に伴う外科的侵襲は少ないものの、健常組織を損傷することには変わりがない。さらに、顎裂部の形状は複雑であり、口腔機能時の外圧を受けやすいため、再生部の形状回復が困難であること、再生骨に歯の移動や移植を行えなければならないことなど、顎裂部特有の問題が存在する。そこで、他の部位の骨再生術式を流用するのではなく、細胞と担体の適性を根本から見直し、顎裂閉鎖治療に最適な術式を検証することが重要と考えられた。

2. 研究の目的

脱落乳歯の歯髄由来幹細胞 (stem cells from exfoliated deciduous teeth; SHED) による骨再生誘導機能を検証し、新規の未焼結炭酸アパタイト (CAP) 担体と組み合わせて移植体とすることにより、再生部位に細胞の増殖や分化に必要な微小環境を構築し、矯正的な歯の移動が可能で、顎裂閉鎖に最適化した骨再生誘導法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

研究期間中において SHED の特性を検討し、骨再生に関連した機能について BMSCs や DPSCs との比較検討を行う。さらに、SHED の担体として、CAP の有効性を検証し、これらを骨欠損部に移植する場合の至適条件を確立する。再生初期の血管新生や担体の吸収、これに続く新生骨の形成を評価することにより、再生組織の微小環境の変化を明らかにする。さらに、SHED、BMSCs、DPSCs を用いて再生した歯槽骨への実験的な歯の移動様相を比較検討する。そのために、以下の検討を行った。

1) SHED の増殖能、血管誘導能および骨分化能についての検討

ヒト抜去乳歯歯髄から SHED を単離した。歯冠部の歯髄組織を細切後酵素処理し、播種、培養した。単離した SHED 様細胞および hDPSCs 様細胞の表面抗原 CD29、CD34、CD44、CD73、CD105、CD146、CD271、STRO-1 をフローサイトメーターを用いて解析し、幹細胞である事を確認した。その上で、増殖能、血管誘導能および骨分化能について DPSCs および BMSCs との比較検討を行った。

2) BALB/c-nu マウス骨欠損部への SHED/p-CAP 担体移植による血管新生と骨再生の検討

直径 4.0 mm 骨欠損を有する BALB/c-nu マウス実験モデルを作製し、欠損部に SHED および CAP 担体を移植した。移植 1 週間前より D10001 餌を与え、移植前日には単離した SHED、hDPSCs および hBMSCs を各 1.0×10^4 個 PLGA バリアメンブレンに播種し、一晚培養した。 μ CT を用いた検討では、骨再生を三次元的に評価するために、三次元骨欠損部補完モデルを作製し、オリジナル三次元モデルとブーリアン演算により差し引くことにより、骨欠損部三次元モデルの体積を算出した。また、細胞移植 12 週後に屠殺を行い、頭頂骨を摘出した。再生部位の組織切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色および Masson's trichrome (MT) 染色による組織学的評価を行った。

3) 蛍光標識 MSCs の生体内での挙動の検討

BALB/c-nu マウス骨欠損部への SHED/CAP 担体移植後、蛍光標識した MSCs をラット血管へ投与した。細胞動態を IVIS Spectrum CT にて経日的に観察した。

4. 研究成果

平成 28 年度においては、SHED の特性を検討した。蛍光免疫染色法により、オステオカルシン、アグリカンおよび FABP4 の発色が観察され、骨分化、軟骨分化および脂肪分化が確認できた。また、SHED の骨芽細胞分化能について、骨分化マーカー発現の経時的変化を調べた結果、高い分化能を有していることが明らかとなった。また、アルカリフォスファターゼ活性の変化においても、同様の結果が示された。しかし、BMSCs および DPSCs と比較して有意差は認められなかった。以上の検討により、SHED は BMSCs や DPSCs などと比較して高い増殖能を有している一方、分化能についてはほぼ同等の能力であるという特性が明らかになったことは、再生医療への応用を

目指した今後の研究計画のために極めて有意義な成果であると考えられた。また、炭酸アパタイト未焼結担体(CAP)を免疫不全マウス(BALB/c-nu マウス)頭頂骨に作製した骨欠損部に移植し、幹細胞の動態を検討するための条件検討を行うための動物実験モデルを確立した。

平成 29 年度では、再生初期の担体の吸収と、これに続く新生骨の形成を評価することにより、再生組織の微小環境の変化を明らかにするため、BALB/c-nu マウスを用いた骨再生実験を行った。マウス骨欠損部への SHED/CAP 担体移植による骨再生を検討した結果、 μ CT による評価では、SHED 移植群において対照群と比較して有意な骨再生が観察され、BMSCs 群、DPSCs 群と比較して高い骨再生傾向が確認されたものの、有意差は認められなかった。HE 染色結果においても、SHED 群では骨細胞の封入を伴う成熟した層板骨が髄膜に沿って認められた。一方、MT 染色では髄膜側に沿ってコラーゲン線維の分布が認められ、骨組織の形成が明らかとなった。コラーゲン線維および類骨の面積率の検討では、SHED 群、BMSCs 群、DPSCs 群、対照群の順に大きい値を示した。

平成 30 年度では、動物実験による検討を継続して行った。BALB/c-nu マウス骨欠損部への SHED/CAP 担体移植後、蛍光標識した MSCs をラット血管へ投与したところ、MSCs の移植部への集積が明らかとなった。さらに、経時的検討を行ったところ、蛍光標識 MSCs は、移植後 15 日で移植直後に比較して約 30% にまで減少することが明らかとなった。また、再生骨体積率は、SHED 群、hDPSCs 群、hBMSCs 群、対照群の順に大きな値を示した。細胞を移植した 3 群と対照群との間にはそれぞれ有意差は認められたが、3 群間には有意差は認められなかった。

以上の結果から、SHED は高い増殖能を有しており、hDPSCs および hBMSCs に対して同等の骨再生能を有していることが明らかとなり、細胞の採取の容易さと生体侵襲を回避できることを考慮すると、骨再生治療における有用な細胞源となり得ることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1 . Abdullah AN, Miyauchi S, Onishi A, Tanimoto K, Kato K. Differentiation of mouse-induced pluripotent stem cells into dental epithelial-like cells in the absence of added serum. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 55(2): 130-137, 2019.

歯科領域の再生医療への iPS 細胞の応用に関する基礎検討を行った。口腔領域における移植細胞の安定的な供給の可能性を示唆するものであり、口蓋裂治療への適用が期待される。

2 . Abe T, Sumi K, Kunimatsu R, Oki N, Tsuka Y, Nakajima K, Ando K, Tanimoto K. The effect of mesenchymal stem cells on osteoclast precursor cell differentiation. *J Oral Sci.* 61(1): 30-35, 2019.

破骨細胞前駆細胞への分化における間葉系幹細胞の影響の検討を行い、間葉系幹細胞から産生される液性成分が破骨細胞分化を促進する可能性が示唆された。口蓋裂治療時の顎裂部の骨再生における間葉系幹細胞移植の有効性が確認された。

3 . Abe T, Sumi K, Kunimatsu R, Oki N, Tsuka Y, Nakajima K, Tanimoto K. Dynamic imaging of the effect of mesenchymal stem cells on osteoclast precursor cell chemotaxis for bone defects in the mouse skull. *J Dent Sci.* 13(4): 354-359, 2018.

間葉系幹細胞の頭蓋骨欠損部へのケモタキシス作用について、ダイナミックイメージングを用いた検討を行った。骨欠損部への間葉系幹細胞の集積が明らかになり、口蓋裂治療時の顎裂部の骨再生における間葉系幹細胞移植の有効性が示唆された。

4 . Ando K, Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Tsuka Y, Sumi K, Horie K, Abe T, Nakajima K, Tanimoto K. Effects of Human Full-length Amelogenin and C-terminal Amelogenin Peptide on the Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue. *Curr Pharm Des.* 24(25): 2993-3001, 2018.

間葉系幹細胞へのエナメル蛋白の影響を検討した結果、増殖能の亢進作用が明らかとなった。口蓋裂治療時の顎裂部の間葉系幹細胞移植への応用の可能性が示唆された。

5 . Kunimatsu R, Nakajima K, Awada T, Tsuka Y, Abe T, Ando K, Hiraki T, Kimura A, Tanimoto K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and

bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 501(1): 193-198, 2018.

乳歯歯髓由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の性質の違いを検討した結果、乳歯歯髓由来間葉系幹細胞の増殖能が高いことが明らかとなった。口蓋裂治療時の顎裂部の間葉系幹細胞移植への有効な細胞源となる可能性が示唆された。

6 . Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Ando K, Hirose N, Tanne Y, Sumi K, Tanimoto K. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. J Periodontol. 89(4): 496-505, 2018.

エナメル蛋白由来合成ペプチドの骨髄由来間葉系幹細胞への影響を検討し、増殖能への影響が明らかになった。口蓋裂治療時の顎裂部の骨再生における間葉系幹細胞移植の有効性が確認された。

7 . Kunimatsu R, Nakajima K, Awada T, Tsuka Y, Abe T, Ando K, Hiraki T, Kimura A, Tanimoto K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 501(1): 193-198, 2018.

ヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞、永久歯歯髓由来間葉系幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞の性質についての比較を行い、移植用細胞としての可能性を検討した。その結果、いずれの細胞も口蓋裂治療時の顎裂部の骨再生において有効であることが示唆された。

8 . Sumi K, Abe T, Kunimatsu R, Oki N, Tsuka Y, Awada T, Nakajima K, Ando K, Tanimoto K. The effect of mesenchymal stem cells on chemotaxis of osteoclast precursor cells. J Oral Sci. 60(2): 221-225, 2018.

破骨細胞前駆細胞のケモタキシスに関する間葉系幹細胞の影響が明らかとなった。口蓋裂治療時の顎裂部の骨再生における間葉系幹細胞移植の有効性が確認された。

9. Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, Ando T, Hayashi Y, Kihara T, Hiraki T, Tsuka Y, Abe T, Kaku M, Nikawa H, Takata T, Tanne K, Tanimoto K. Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 497(3): 876-882, 2018.

ヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞、永久歯歯髓由来間葉系幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞の動物実験モデルを用いた骨再生についての比較を行い、移植用細胞としての可能性を検討した。その結果、いずれの細胞も口蓋裂治療時の顎裂部の骨再生において有効であることが示唆された。

〔学会発表〕(計 3件)

1 . Awada T., Kunimatsu R, Tsuka Y., Tanimoto K. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. 2018 Taiwan International Orthodontic Forum (国際学会)

エナメル蛋白由来ペプチドのヒト骨髄由来間葉系幹細胞への特に骨再生に関する影響に関する研究成果について、2018 Taiwan International Orthodontic Forum にて発表した。

2 . 山内優佳, 平田伊佐雄, 谷本幸太郎, 加藤功一. 人工多能性幹細胞から誘導される神経前駆細胞を効率よく増幅するための培養基材の設計 . 第 40 回バイオマテリアル学会

iPS 細胞を口腔領域の再生治療に応用するための培養条件に関する基礎検討の研究成果を第 40 回バイオマテリアル学会にて発表した。

3. 大西梓, Aimi Naim Abudullah, 谷本幸太郎, 加藤功一. 上皮成長因子がマウス人工多能性細胞から口腔上皮細胞様細胞への分化に及ぼす影響. 第5回 国際組織工学・再生医療学会世界会議(国際学会)

口腔領域の再生治療に応用するためのiPS細胞の口腔上皮細胞分化誘導に関する基礎的研究結果を第5回 国際組織工学・再生医療学会世界会議において発表した。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：杉山 勝

ローマ字氏名：Masaru Sugiyama

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：教授

研究者番号(8桁): 70187681

研究分担者氏名：加藤 功一

ローマ字氏名：Koichi Kato

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 50283875

研究分担者氏名 : 國松 亮

ローマ字氏名 : Ryo Kunimatsu

所属研究機関名 : 広島大学

部局名 : 病院(歯)

職名 : 講師

研究者番号 (8 桁): 40580915

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。