

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11803

研究課題名(和文) 超選択的単離手法による歯髄由来幹細胞を用いた顎骨再生療法の開発

研究課題名(英文) Developmental research on maxillofacial bone regenerative therapy using super-selectively derived dental pulp stem cells

研究代表者

菅野 貴浩 (Kanno, Takahiro)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：60633360

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)：腫瘍や外傷等により顎骨欠損をきたす患者さんは多く、骨再生医療的手法を応用した安全効率的な顎骨再生治療開発が求められている。そこで本助成により、高純度歯髄由来幹細胞と、骨伝導性と生体吸収置換性、機械的強度を有する未焼成ハイドロキシアパタイトとポリ-DL-乳酸の3次元複合体とによる、新規顎骨再生治療法確立に向けた実験的研究に挑戦した。歯髄より、各種モノクローナル抗体処理による超選択的単離高純度ヒト歯髄由来幹細胞の誘導培養を行った。ラット下顎骨欠損モデルへの移植研究を試みた。経時的に、幹細胞移植群で、骨再生の有意な傾向は認めたが、有意差は見られなかった。移植条件と足場材料の開発が課題と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄由来幹細胞は、抜去された歯から入手されるため、容易かつ侵襲が少なく、再生医療へ有用性が高いと考えます。従来までの顎骨再生への臨床応用への問題点としては、より骨再生能の高い幹細胞群のみを選択的に単離し、細胞リソースとする点が困難でした。われわれは、選択的に骨再生能に有用な幹細胞群を誘導できる可能性を探索することが出来ました。さらに、顎骨特有な再生の足場材料として3次元多孔質u-HA/PDLLA複合体が有用である可能性を明らかとしました。今回の動物実験モデルからは、それらを組み合わせることによる有意性までは証明ができませんでしたが、今後の研究発展に向けた高い発展性を有する成果が上げられました。

研究成果の概要(英文)：The maxillofacial boney and soft-tissue defects following oral and maxillofacial tumor and trauma can cause loss of oral function and esthetics. They need oral and maxillofacial reconstructive surgery by using a tissue engineering and bioregenerative treatment approach. With this scientific grant, I tried to develop an innovative maxillofacial boney regenerative treatment using super-selectively derived dental pulp stem cells and bioactive/bioresorbable 3D-porous-uHA-poly-DL-lactide composite scaffold (3D-uHA/PDLLA). I applied these human super-selectively derived dental pulp stem cells into 3D-uHA/PDLLA scaffold and grafted them into rat mandibular critical bone defect models. The results obtained revealed that the grafted models tended to show more boney regeneration in rats' mandibular defects, but not statistically significant compared with control groups. The further research remains needed to identify feasible grafting conditions and to develop feasible bone graft scaffolds.

研究分野：顎骨再生

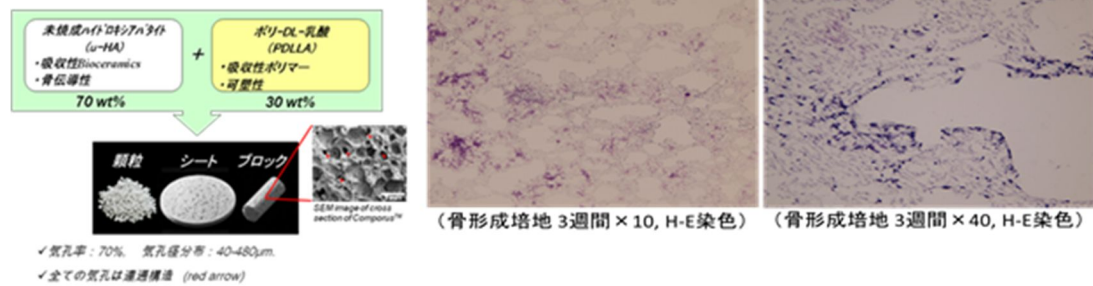
キーワード：口腔顎顔面外科 顎骨再生 幹細胞 生体材料 顎骨再建 骨芽細胞 生体吸収材料 足場材料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域において、顎口腔の腫瘍切除手術や顎顔面外傷、先天欠損、顎堤萎縮などによる比較的広範な顎骨欠損に対する再建手術を要する症例は多い。再建には、従来から血管柄付き遊離骨移植に代表される新鮮自家骨を用いた移植手術が広く行われるが、健康部位から広範な骨を採取して用いるため、外科的侵襲性と機能形態の合併症は依然として大きい。

一方、近年生体医療材料工学の進歩から人工骨による骨補填材料の開発が進み、ハイドロキシアパタイトやリン酸カルシウム、コラーゲンバイオ材料などを応用した生体親和性の比較的高い材料の研究開発が進み、臨床応用がなされている。さらに、骨延長やGBRに代表される再生治療も臨床応用が進んでいるが、広範囲な顎骨欠損では依然として困難で、通常これらの実臨床での成果は、顎顔面骨の比較的小さな歯槽骨レベルや、歯科インプラント周囲、上顎洞内等での応用に限られ、非常に小さな骨欠損での骨修復および骨再生についての有用性に関する研究が主である。



そこで本研究申請者らは、これまでに科学研究費補助金を受け、顎骨再生の足場材料に関して、当初整形外科領域での関節への応用を想定し、本邦で新たに開発された、未焼成ハイドロキシアパタイト(u-HA)とポリ-DL-乳酸 (PDLLA) の3次元複合体 (3次元多孔質 u-HA/PDLLA 複合体)に着目した。研究開発を進展させることにより、顎骨再生の足場材料としての有用性を明らかとした。これらは十分な機械的強度、熱変形性能による細工性、高い骨伝導性と、生体吸収置換性を兼ね備え、さらに骨形成細胞・骨芽細胞が理想的に3次元多孔質内で分化・増殖でき、本研究に応用することとした。

一方で、これまで多種多様な身体部位 (骨髄、骨膜、脂肪、歯髄等) から多能性幹細胞を単離し、骨再生への有用な細胞供給源となりうる可能性に関する研究がなされてきた。しかし、ヒト由来多能性幹細胞は、いずれの組織由来であっても、加齢と個体差等により著しく幹細胞数が減少し、成長増殖が非常に遅く、非常に限定的な増殖能と低い再現精度能が、研究開発および臨床応用に向けて大きな障害と課題であった。2013年に本研究の連携研究者らは、ヒト由来多能性幹細胞のブレイクスルーとして、FACSを用いヒト骨髄由来幹細胞において、LNGFR および THY-1 の両者を細胞表面に発現する細胞群のみを選別し、さらに VCAM-1 を高発現する単離細胞群は、増殖が非常に早く顕著に選択的に骨再生誘導が可能であることを明らかとし、われわれもその後の研究で、これらの顎骨再生への有用性を報告した。さらに2015年、同グループはヒト歯髄由来幹細胞においても、LNGFR および THY-1 の両者を発現する細胞から超選択的にさらに細分画した幹細胞群が、高い骨形成能を有する可能性を明らかとした。とくに、ヒト歯髄由来幹細胞は、日常診療上に抜歯される智歯 (廃棄物) からの誘導が可能で、本研究を遂行する上で、入手が容易で扱いやすく、極めて有用性の高い研究開発可能な試料である。

そこで、理想的足場材料である“3次元多孔質 u-HA/PDLLA 複合体”に、この“超選択的高純度な精製手法”による骨再生促進のための“ヒト歯髄由来幹細胞”を応用させ、顎骨欠損患者自身の歯髄由来幹細胞による自己完結型革新的顎骨再生治療法の確立に向けて本研究を行うことを本研究の開始当初の研究背景とした。

### 2. 研究の目的

現在臨床において、広範囲な顎骨欠損部の回復には、自家骨移植が最も確実な再建治療法である。しかし外科的侵襲性は高く、組織工学的手法を応用し、安全、効率的かつ効果的な顎骨再生治療の開発が強く求められている。

そこで本研究は、近年注目される超選択的に単離する高純度な精製手法による歯髄由来幹細胞を顎骨再生促進における患者自己由来の細胞リソースに用い、われわれがこれまでにその高い有用性を明らかとした、熱可塑性による加工性、高い骨伝導性、生体吸収置換性、機械的強度を有する最適な顎骨再生の足場材料と組み合わせることによる、顎骨欠損患者への革新的顎骨再生治療法確立に向けた実験的研究を目的とする。

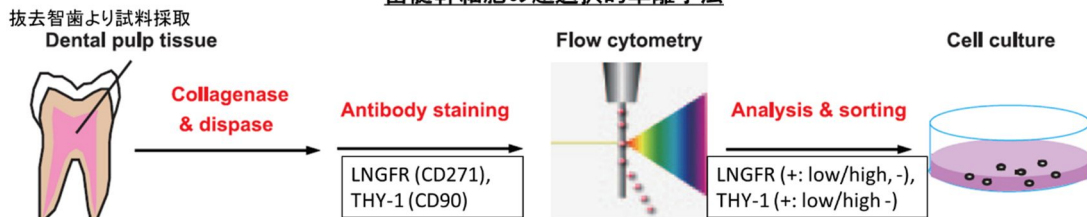
### 3. 研究の方法

“超選択的高純度な精製手法”による“ヒト歯髄由来幹細胞”の単離  
ヒト抜去智歯歯髄より歯髄由来細胞を培養誘導し、フローサイトメトリーおよび FACS を用いて各種表面マーカーから幹細胞をソーティングしヒト歯髄由来幹細胞とする。これらのうち、表面



マーカーである LNGFR (CD271) , THY-1 (CD90) の両者を効果的に発現する骨形成細胞分画群を、超選択的ヒト歯髓由来幹細胞として単離し、増殖能および骨再生能を評価する。

### 歯髓幹細胞の超選択的単離手法



“超選択的単離ヒト歯髓由来幹細胞”の顎骨再生能評価 (in vivo)

*In Vivo* 研究として、超選択的単離 hDPSCc の長期的予後と顎骨再生能評価を、われわれの動物研究モデル報告手法により、多孔質 u-HA/PDLLA 複合体への細胞移植により形態組織学的に評価検討を行う。当大学動物実験専門委員会の承認を得て研究を開始する。

超選択的単離 hDPSCc の subpopulation ごとに細胞を回収し、直径 4mm × 厚さ 1mm に形成した多孔質 u-HA/PDLLA 複合体へ、細胞数  $10^5$  個にて細胞を注入移植する。

8 週齢雄性 SD ラットを用い、ペントバルビタール腹腔内投与と全身麻酔下にて、下顎骨に自己修復困難な直径 4mm の顎骨欠損を作製し、移植を行う。

移植術後は、連日 FK506 (2mg/kg/日)、ABPC (20mg/kg/日) を投与し、免疫不全モデルとする。固形飼料と水道水にて飼育し、移植術後 1、3、10 週にて安楽死を行い、骨形成・骨再生について経時的に評価検討を行う。

組織学および免疫組織学的検索

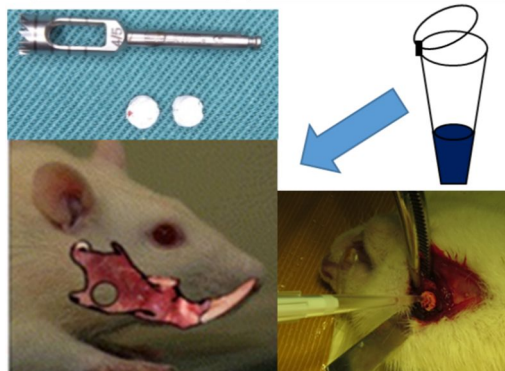
検体試料は、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、下顎骨下縁に垂直平面で分割し、試料半分は 10% EDTA にて脱灰標本とし、パラフィンブロックを作製し薄切切片とし、組織学的評価を HE 染色にて行う。残りの半分は非脱灰標本とし、エタノールにて脱水、LR-WHITE 樹脂にて包埋し、非脱灰切片を作製する。免疫組織学的に骨芽細胞転写因子 Runx2 および骨基質タンパクの発現に関して免疫組織学的に検索を行う。

骨形態学的検索

検体試料は、動物用 Micro-CT を用いて顎骨再生・骨形成の形態学的な検索を行う。

ラット免疫不全モデルへ移植

超選択的単離 hDPSCc Subpopulation 評価

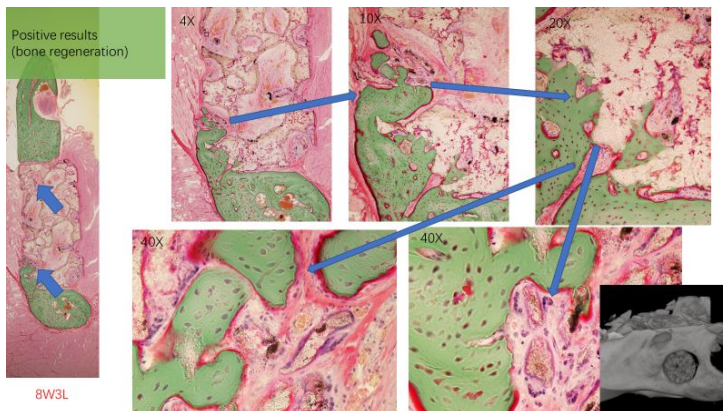


## 4. 研究成果

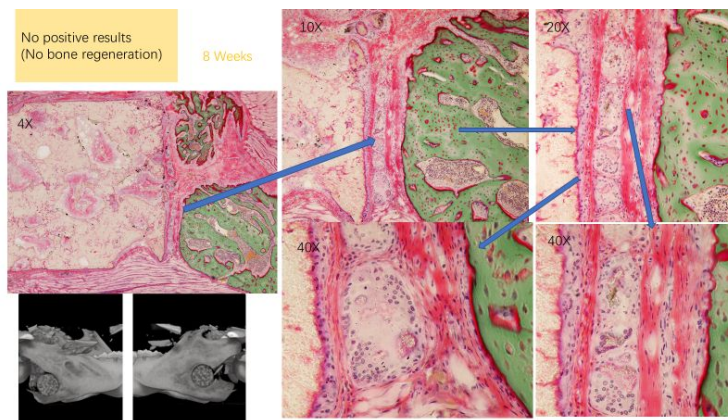
研究開始当初は、当初の研究計画通りに、*In vitro* 研究として超選択的高純度な精製手法として連携研究者と協力し、予備補助実験として抜去歯より歯髓を採取し、得られた組織を I 型コラゲナーゼとディスパーゼ処理し、フィルターを介して細胞懸濁液を得た。これらを遠心沈降してペレットとし、各種モノクローナル抗体処理を行い、フローサイトメトリーを用いて各種表面マーカーから超選択的単離ヒト歯髓由来幹細胞 (hDPSCc) の誘導単離および培養をおこなった。hDPSCs の増殖能と多分化能、骨形成能に関しては、研究計画の通りに評価し、LNGFR+/THY-1+ の両者に陽性 hDPSCs は、コロニー形成、増殖能および分化能に優れることを確認した。

(1) これらの hDPSCs を用いて、*In vivo* 研究の予備の実験として、ラット下顎骨に Critical bone defect を作成し、直径 4mm・厚さ 2mm のディスク状の多孔質 u-HA/PDLLA 複合体への hDPSCs 細胞移植を試みた。10 週齢雄性 SD ラットを用いて下顎骨に直径 4mm の顎骨欠損を作製し、hMSC 移植なし群、移植実験群、欠損のみの 3 群にて比較検討を行った。

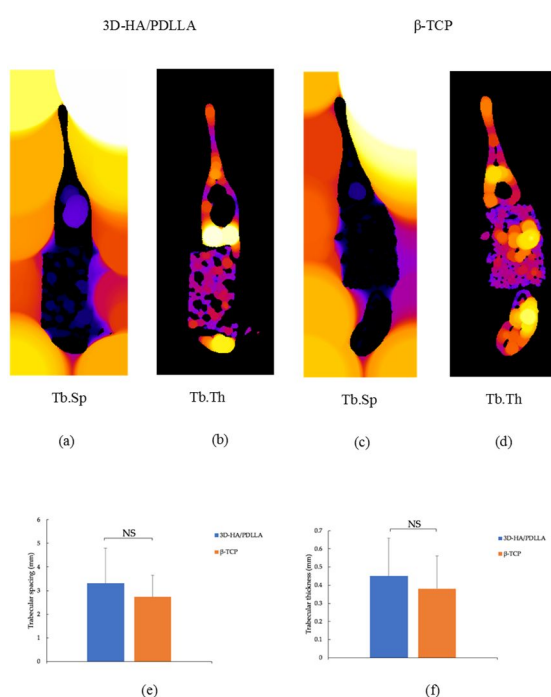
すべての実験動物は、術後免疫不全状態とするために連日 FK506 (2mg/kg/日)、ABPC (20mg/kg/日) を投与した。移植術後 1、3、8 週にて安楽死を行い、骨形成・再生について評価検討を行った。検体は非脱灰標本とし、エタノールにて脱水、LR-WHITE 樹脂にて包埋し、非脱灰切片を作製し Villanueva Goldner 染色にて評価した。



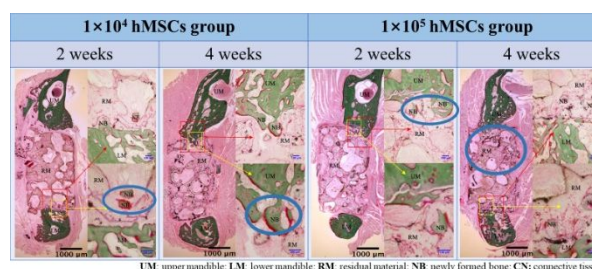
しかしながら、結果は、当初の予想に反し、細胞移植群ではいくつかの限られた個体の検体においては顎骨再生に有意な傾向は認められたが(上図)、hMSC 移植なし群と有意差が見られなかった。また、多くのラットは移植材料周囲で微小骨折を起こしており(右図)さらに加えて連日 FK506 (2mg/kg/日)による免疫不全状態による影響が大きいものと考えられ、ほとんどのラットは発育不良をきたし、体重の増加が不良である点からも明らかであった。



(2)そこで、新たな hDPSCc 移植条件を設定するには、研究条件の設定に立ち戻る必要性に直面した。そこで、hDPSCc 移植条件設定に先立ち、あらたに、本研究において足場材料として用いる 3次元多孔質 u-HA/PDLLA 複合体について、hDPSCc 移植の足場材料としての役割を担えるのかについて検索することとした。本研究に用いる 3次元多孔質 u-HA/PDLLA 複合体との比較対象として、顎骨欠損への骨補填材料として現在最も一般的に用いられる  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP)ブロックをもちいた。SD ラットを用い、同様の顎骨欠損モデルを作成し、骨形態組織学的 (MicroCT) および免疫組織化学的 (Runx2 およびオステオカルシン発現) に解析を行った。すると、3次元多孔質 u-HA/PDLLA 複合体は、経時的に顎骨欠損モデルにおいて、 $\beta$ -TCP と同様に高い骨伝導能を有し、顎骨再生に有用な骨補填材料であることを証明した。そしてさらに、hDPSCc 等の幹細胞移植における足場材料としても、有用である可能性を示すことに成功し、得られた新たな学術知見に考察を加え、学術論文に発表した。



(3)新たな hDPSCc 移植条件を設定するには、これまでの研究結果から、研究期間および研究資金面より困難と判断した。その方策として、同様の研究手法を用い、高純度なヒト骨髄由来間葉系幹細胞を幹細胞表面マーカーである CD90/CD271 (LNGFR+ THY-1+) の抗体染色を行い、セルソーターを用いて共陽性の細胞をシングルセルソーティングし、単離して拡大培養した高純度ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて研究を継続することとした。また前回の hDPSCc 移植の問題点から、幹細胞移植術後の免疫不全状態は連日 FK506 (1mg/kg/日)に改めた。前述の、われわれが今回明らかとすることが行えた、3次元多孔質 u-HA/PDLLA 複合体に高純度ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を組み合わせることにより、SD ラットを用いた顎骨欠損モデルを作成し、骨形態組織学的に解析を行った。成果は、高純度ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を 3次元多孔質 u-HA/PDLLA 複合体に移植応用することにより、母骨との癒合治癒および新生骨の移植材料への新生、また移植材料内への骨再生が明らかとする新たな知見を得た。本学術知見は、考察を加え、学術論文に成果として発表した。



#### 引用文献

- Bai YP, Kanno T, et al. Materials (Basel) 2018 Oct; 11(10): 2047.
- Sha JJ, Kanno T, et al. Materials (Basel) 2019 Mar; 12(5): 705.
- Bai YP, Sha J, Kanno T, et al. J Invest Surg. 2019 May 23:1-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Takahiro Kanno, Shintaro Sukegawa, Yoshihiko Furuki, Yoshiki Nariai, Joji Sekine	4. 巻 54
2. 論文標題 Overview of innovative advances in bioresorbable plate systems for oral and maxillofacial surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 127-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.03.003">https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.03.003</a>	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 Shintaro Sukegawa, Takahiro Kanno, Yoshihiko Furuki	4. 巻 54
2. 論文標題 Application of computer-assisted navigation systems in oral and maxillofacial surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 139-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.03.005">https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.03.005</a>	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 Yunpeng Bai, Takahiro Kanno, Hiroto Tatsumi, Kenichi Miyamoto, Jingjing Sha, Katsumi Hideshima, Yumi Matsuzaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Feasibility of a three-dimensional porous uncalcined and unsintered hydroxyapatite/poly-D/L-lactide composite for the regenerative biomaterial in maxillofacial surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 E2047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma11102047.	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 Jingjing Sha, Takahiro Kanno, Kenichi Miyamoto, Yunpeng Bai, Katsumi Hideshima, Yumi Matsuzaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Bioactive/Bioresorbable Three-Dimensional Porous Uncalcined and Unsintered Hydroxyapatite/Poly-D/L-lactide Composite with Human Mesenchymal Stem Cells for Bone Regeneration in Maxillofacial Surgery: A Pilot Animal Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 E705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma12050705.	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 Takahiro Kanno, Shintaro Sukegawa, Masanori Masui, Yuka Sukegawa-Takahashi, Tsukasa Kishimoto, Joji Sekine, Yoshihiko Furuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Retrospective clinical study of dental implants following sinus floor elevation: An up-to-10-year follow-up evaluation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bio-Integration,	6. 最初と最後の頁 83-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Takahiro Kanno, Masaaki Karino, Aya Yoshino, Takashi Koike, Hiroto Tatsumi, Koji Tsunematsu, Yoshiki Nariai, Taichi Ide, Yunpeng Bai, Ngoc Quang Dong, Joji Sekine	4. 巻 26
2. 論文標題 Computer-assisted Secondary Reconstruction of Mandibular Continuity Defects Using Non-Vascularized Iliac Crest Bone Graft Following Oral Cancer Resection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 386-392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.2485/jhtb.26.386">https://doi.org/10.2485/jhtb.26.386</a>	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10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 菅野貴浩
2. 発表標題 サイナスリフト後の長期経過 - 術式と移植材料 -
3. 学会等名 第8回日本バイオンテグレーション学会総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Kanno, Masaaki Karino, Koji Tsunematsu, Hiroto Tatsumi, Aya Yoshino, Takashi Koike, Taichi Ide, Joji Sekine
2. 発表標題 Feasibility of an Unsintered Hydroxyapatite Particles/Poly-L-Lactide Composite Sheet for Navigation-Assisted Orbital Trauma Reconstruction
3. 学会等名 第64回国際外科学会・日本支部総会・学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Kanno
2. 発表標題 Feasibility of an u-HA/PLLA composite sheet for navigation assisted orbital trauma reconstruction
3. 学会等名 The 43rd Annual Conference of Association of Oral and Maxillofacial Surgeons of India (AOMSI) (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅野貴浩
2. 発表標題 下顎骨関節突起骨折の手術治療 - その適応と限界 -
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Kanno
2. 発表標題 Functional and aesthetic oral rehabilitation using dental implant following alveolar regenerative augmentation for atrophic alveolar ridge of the anterior jaw
3. 学会等名 The 22nd Conference of Japan Academy of MaxilloFacial Implant ~Pan-Pacific Implant Society, Winter Meeting 2018 in TOKYO 2 ~ (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Kanno, Joji Sekine
2. 発表標題 The up-to-date feasibility of "Computer-Assisted Digital Orthognathic Surgery"
3. 学会等名 第58回大韓口腔顎顔面外科学会総会・学術集会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Kanno, Masaaki Karino, Aya Yoshino, Takashi Koike, Taichi Ide, Hiroto Tatsumi, Koji Tsunematsu, Hideki Yoshimatsu, Joji Sekine
2. 発表標題 Feasibility of an Unsintered Hydroxyapatite Particles/Poly-L-Lactide Composite Sheet for Navigation-Assisted Orbital Fracture Reconstruction
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菅野貴浩、狩野正明、辰巳博人、金子一朗、吉松英樹、井出太一、高橋尊史、吉野綾、関根浄治
2. 発表標題 眼窩骨折における生体活性を有するバイオセラミックス微粒子配合 ポリ-L-乳酸シートを用いた眼窩再建治療
3. 学会等名 第19回日本口腔顎顔面外傷学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Kanno, Joji Sekine
2. 発表標題 Feasibility of an Unsintered Hydroxyapatite Particles/Poly-L-Lactide Composite Sheet for Navigation-Assisted Orbital Fracture Reconstruction
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Kanno, Joji Sekine
2. 発表標題 The Current Trends of Maxillofacial Trauma Surgery: Focusing on "Orbital Fracture Reconstruction"
3. 学会等名 2nd Takao International Forum of Oral and Maxillofacial Surgery（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----