

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09997

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞由来オルガノイドによる顎骨壊死予防法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to prevent osteonecrosis of the jaw using organoids derived from dental pulp stem cells

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：純化ヒト歯髄幹細胞から3次元培養し作製した細胞塊(3D hDPSCs)を、免疫不全マウスの抜歯窩に移植し、顎骨壊死予防への有用性を評価した。2次元培養したヒト歯髄幹細胞(2D hDPSCs)の移植では顎骨壊死を予防することができなかったが、3D hDPSCsの移植では抜歯窩が上皮で被覆され骨露出を認めなかった。3D hDPSCsを移植した群では2D hDPSCsを移植した群と比較し、骨形成を認め、empty lacunaeの割合が有意に低かった。また、3D hDPSCsはFGF2の発現が高いことが確認された。3D hDPSCsに発現するFGF2が、顎骨壊死予防に寄与してい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

薬剤関連顎骨壊死(MRONJ)は、ゾレドロン酸やデノスマブといった骨吸収抑制薬等により生じる顎骨壊死である。MRONJは一般に保存療法では治癒までに期間を要することが多く、外科療法では手術侵襲を伴う。そのため予防が重要となるが、抜歯により発症するリスクが高いため、抜歯時の予防手段を構築する必要がある。本研究では、抜歯時のMRONJ予防における3次元培養した歯髄幹細胞移植の有効性を示す社会的意義のある研究であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the usefulness of 3D cultured human dental pulp stem cells (3D hDPSCs) in preventing osteonecrosis of the jaw by transplanting them into the tooth extraction sockets of immunodeficient mice. Transplantation of 2D cultured human dental pulp stem cells (2D hDPSCs) was unable to prevent osteonecrosis of the jaw, but transplantation of 3D hDPSCs covered the tooth extraction socket with epithelium and no bone exposure was observed. Compared to the group transplanted with 2D hDPSCs, the group transplanted with 3D hDPSCs showed bone formation and the rate of empty lacunae was significantly lower. In addition, it was confirmed that 3D hDPSCs expressed high levels of FGF2. These results suggest that FGF2 expressed in 3D hDPSCs contributes to the prevention of osteonecrosis of the jaw.

研究分野：再生医学

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 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) はゾレドロン酸 (ZA) やデノスマブといった骨吸収抑制薬 (ARA) 等により生じる顎骨壊死である。MRONJ は骨硬化から腐骨形成へと経時的に変化していくため初診時の状態により違いはあるが (Yasui et al. Dentomaxillofac Radiol. 2023)、一般に保存療法では治癒までに期間を要することが多く、外科療法では手術侵襲を伴う。そのために予防が重要となるが、抜歯により発症するリスクが高いため抜歯時の予防手段を構築する必要がある (Yasui et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2021)。

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」を得ることが困難である。そこで、われわれはヒト歯髄幹細胞 (hDPSC) 分離マーカーを同定し、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)。また、フローサイトメトリーにより純化した hDPSCs (LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup> hDPSCs) が高い増殖能および骨形成能を示すことを報告した。3次元培養した細胞凝集塊は Cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions により細胞間の相互作用を効果的に高め、細胞機能の向上に寄与すると考えられる。

本研究では、3次元培養した純化 hDPSCs を ARA 投与マウスの抜歯時に移植することにより、顎骨壊死予防の効果を評価する研究を行った。

### 2. 研究の目的

MRONJ は ARA 投与後の抜歯を契機に発症することが多い。そこで、ARA 投与後の免疫不全マウスの抜歯窩にフローサイトメトリーにより純化した LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup> hDPSCs を 3次元培養して移植し、顎骨壊死予防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) 免疫不全マウスを用いた顎骨壊死モデルの作製

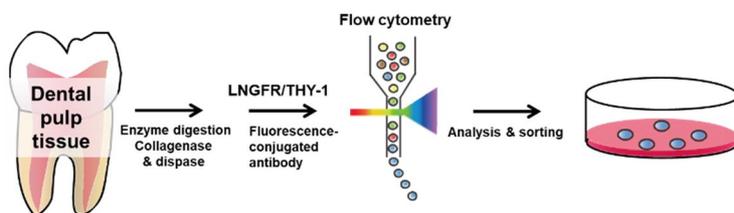
C57BL/6J マウスでの Kuroshima ら (J Bone Miner Res 2018) の MRONJ モデル作製方法を参考にして、hDPSCs 移植後の拒絶反応を避けるため NOD/SCID マウス (NOD/ShiJic-scidJcl immunodeficient mice, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) にて MRONJ モデルを作製した。ZA (Zometa; Novartis, Stein, Switzerland) 250 μg/kg およびシクロホスファミド (CY, C7397; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100mg/kg を 2回/週、3週間腹腔投与した後に右側上顎第一臼歯の抜歯を行い、MRONJ モデルマウスを作製した。

#### (2) 3次元培養した LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup> hDPSCs の顎骨壊死予防への有用性の評価

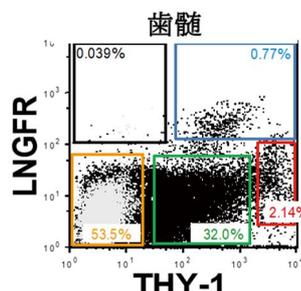
##### ヒト歯髄幹細胞の分離および培養

抜去智歯より歯髄を採取し、2 mg/mL collagenase と 4 mg/mL dispase (Wako, Osaka, Japan) for 1 h at 37 °C 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、フローサイトメトリーにて歯髄幹細胞の分離を行った (Yasui et al. Journal of Dental Research. 2016) (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



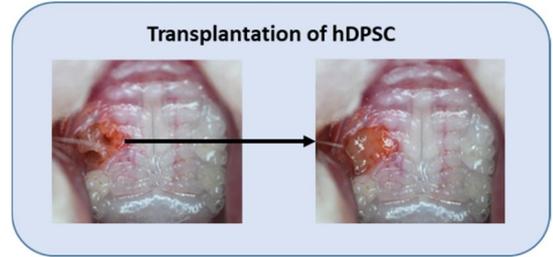
### 細胞の調整

フローサイトメトリーによる細胞分取後に、LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+hDPSCs を 20%FBS 添加 DMEM にて 10 cm dish 上で培養した。2-3 継代した  $3 \times 10^5$  個の歯髄幹細胞を U 底プレート (Ultra-Low Attachment Plates, Corning) にて 3 次元培養し細胞塊を作製した。これを 3D hDPSCs とした。一方、10cm dish で培養した細胞を 2D hDPSCs とした。

### 細胞移植

右側上顎第一臼歯の抜歯時に、LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+hDPSCs の 2D 細胞 (2D hDPSCs) および 3 次元培養した 3D 細胞塊 (3D hDPSCs) を、ZA と CY 投与後の NOD/SCID マウス抜歯窩に移植した (図 3)。

(図 3) hDPSC 3D 細胞塊の抜歯窩への移植



### 組織学的評価

移植 4 週後にマウスを屠殺し、上顎骨を 4% PFA で固定した。10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) にて脱灰後、パラフィン包埋し矢状断に切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、抜歯窩の Empty osteocytic lacunae の割合を算出した。

### マイクロ CT による骨の解析

移植 4 週間後に、Cosmo Scan FX (Rigaku Corp., Tokyo, Japan) を用いて、マイクロ CT による右側上顎抜歯窩の撮影を行った。撮影条件は field of view = 10 mm, 90kV/88mA とした。新生骨の解析および骨の構造解析を TRI/3D-Bon を用いて行い、Trabecular parameters including bone fill, trabecular number (Tn.N), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp), bone mineral density (BMD) について解析した。

### ( 3 ) LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+hDPSCs の 2D 細胞と 3D 細胞塊の遺伝子発現の比較

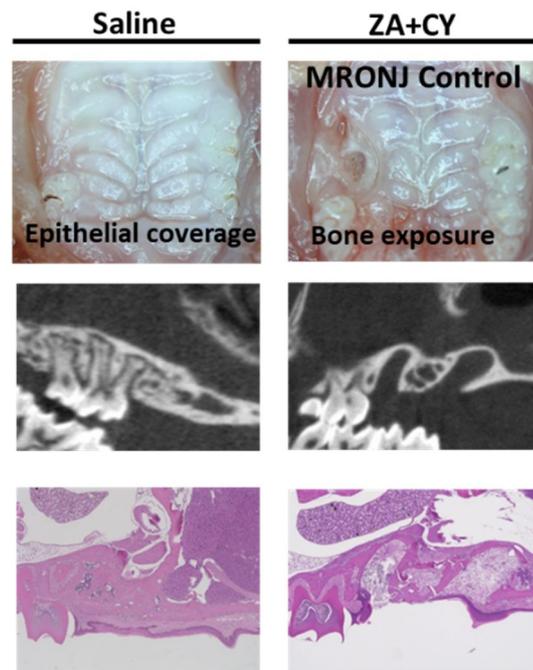
リアルタイム PCR にて 2D hDPSCs と 3D hDPSCs が発現する遺伝子 (FGF2, TGF- $\beta$ , Pdgfb, EGF2, CTGF) を比較した。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) 免疫不全マウスを用いて MRONJ モデルを作製

NOD/SCID マウスに ZA 250  $\mu$ g/kg および CY 100  $\mu$ g/kg を 3 週間投与した後に抜歯を行い、マウス MRONJ モデルを作製した。抜歯 4 週間後の口腔内所見で、抜歯窩は粘膜上皮に被覆されず骨露出を認めた (図 4) 。ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的評価では、骨梁内に empty lacunae を多数認め、広範囲の壊死骨と、上皮欠損が確認された。empty lacunae の割合は生理食塩水投与群と比較し有意に高かった (  $P < 0.001$  ) 。マイクロ CT による評価では、抜歯窩内の新生骨の割合が生理食塩水投与群と比較し、MRONJ 群では有意に少なかった。また、骨の構造解析では、BV/TV、Tb.Th、BMD において、MRONJ 群は生理食塩水投与群と比較し有意に低い値を示し (  $P = 0.001$ ,  $P = 0.004$ ,  $P = 0.007$  ) 、Tb.Sp は高い値を示した (  $P < 0.001$  ) 。

( 図 4 ) 生理食塩水投与群と MRONJ 群



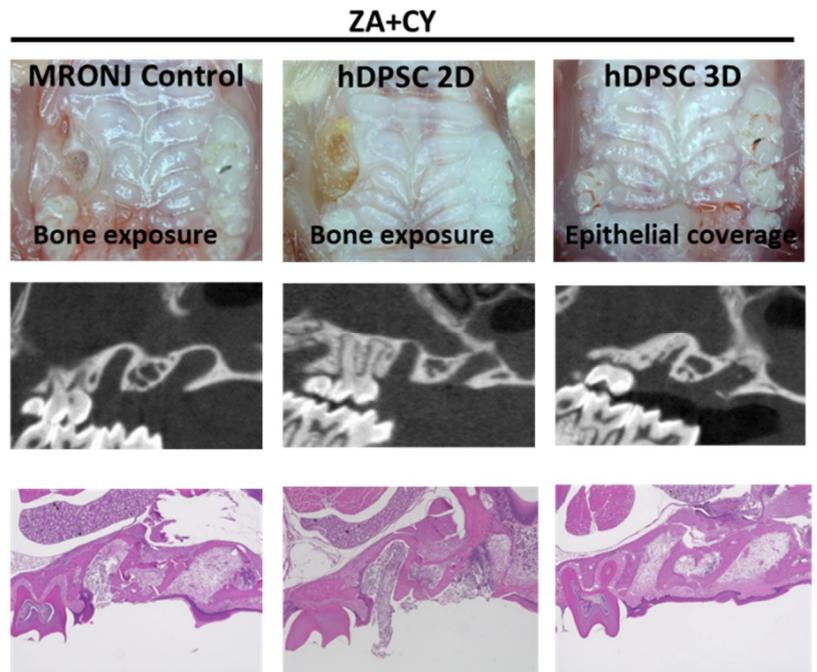
( 2 ) 抜歯窩への LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup> hDPSC 移植による MRONJ 予防

NOD/SCID マウスに ZA250  $\mu$ g/kg および CY100  $\mu$ g/kg を 3 週間投与した後に抜歯を行い、2D hDPSCs および 3D hDPSCs を抜歯窩に移植した。

抜歯 4 週間後の口腔内所見で、2D hDPSCs 移植群では、抜歯窩は粘膜上皮

( 図 5 ) 抜歯および hDPSCs 移植 4 週間後

に被覆されず、骨露出を認めた。ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的評価では、骨梁内に empty lacunae を多数認め、広範囲の壊死骨と、上皮欠損が確認された。一方、3D hDPSCs を移植した群では、抜歯窩は粘膜上皮で被覆され骨露出を認めなかった ( 図 5 )。3D hDPSCs を移植した群では、MRONJ Control 群および 2D hDPSCs 移植群と比較し、empty lacunae の数は有意に少なかった (  $P = 0.002$ ,  $P = 0.038$  )。マイクロ CT による抜歯窩内の骨形成について評価を行った。3D hDPSCs 移植群では 2D hDPSCs 移植群と異なり、コントロール群と比較して骨形成が認められた。3D hDPSCs 移植群では、MRONJ control 群および 2D hDPSCs 移植群と比較し有意に高い BV/TV と (  $P = 0.003$ ,  $P = 0.004$  )、低い Tb.Sp を示した (  $P = 0.004$ ,  $P = 0.002$  )。LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup> hDPSCs の 3D 細胞塊の移植は顎骨壊死予防に有用であることが示唆された。



( 3 ) リアルタイム PCR による LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup> hDPSCs の遺伝子発現の評価

3D hDPSCs では 2D hDPSCs と比較し FGF2 の高発現を認め (  $P = 0.038$  )、3D hDPSCs の顎骨壊死予防や骨再生に寄与している可能性が示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Yasui Takazumi, Nagamine Hiroki, Tanaka Kenta, Kimura Moemi, Karube Takeshi, Kawana Hiromasa, Onizawa Katsuhiro	4. 巻 52
2. 論文標題 Treatment outcomes and time to healing of medication-related osteonecrosis of the jaw based on image findings	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dentomaxillofacial Radiology	6. 最初と最後の頁 3203-3211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1259/dmfr.20220352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takazumi Yasui, Moemi Kimura, Hiroki Nagamine, Shosuke Yajima, Takeshi Karube, Hitoshi Sato, Seiji Asoda, Satoshi Hara, Katsuhiro Onizawa	4. 巻 131
2. 論文標題 Influence of prostate cancer status on the prevalence of medication-related osteonecrosis of the jaw	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 312-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oooo.2020.12.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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)	
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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	馬淵 洋  (Mabuchi Yo)  (50424172)	藤田医科大学・医学部・准教授    (33916)	

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