

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10017

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞を応用した顎骨再生医療技術確立を目指した大動物前臨床試験

研究課題名(英文) Preclinical study of regenerative therapy for bone defects using dental pulp stem cells

研究代表者

古賀 陽子 (Kawase-Koga, Yoko)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：10392408

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)：われわれは、ヒト歯髄幹細胞と生理活性物質を組み合わせることによりこれまでにならぬ短期間かつ高効率な骨芽細胞誘導法を開発し、マウス頭頂骨臨海骨欠損モデルにてその有効性を報告した。しかし、移植細胞の生体内での作用機序および大動物における歯髄幹細胞由来骨芽細胞の骨分化誘導能は不明であった。本研究では、GFPミニブタ歯髄幹細胞由来骨芽細胞をGFP(-)ミニブタの顎骨欠損モデルに移植し、生体内での作用(Mode of Action)を明らかにすべく、大動物実験を試みた。そして、ミニブタからの歯髄幹細胞の単離、培養、さらに3次元培養に成功し、TH添加群において有意な骨形成能を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト歯髄幹細胞は、2000年にGronthosらがヒト歯髄に分化能の高い間葉系幹細胞が存在することを報告し(Proc Natl Acad Sci U S A, 2000)、新たな再生医療の細胞源として着目されている。前臨床試験として大動物の顎骨欠損モデルにおけるヒト歯髄幹細胞の有効性の検討という課題が残されており本研究を遂行した。本研究の成果は、われわれがこれまで行ってきたヒト歯髄幹細胞の高効率な骨分化誘導法の確立をさらに発展させるのみならず、再生工学、口腔外科学等、広い領域に波及効果をもたらすものであると確信している。そして後の臨床試験に必ずや繋がる研究である。

研究成果の概要(英文)：We have developed an efficient osteoblast induction method using human dental pulp stem cells in combination with biological active substances, and reported its efficacy in a mouse model of parietal bone defect. However, the in vivo mechanism of action of transplanted cells and the ability of pulp stem cell-derived osteoblasts to induce bone differentiation in large animals were unknown. In this study, we transplanted GFP minipig dental pulp stem cell-derived osteoblasts into a GFP(-) minipig jaw bone defect model and performed large animal experiments to clarify their mode of action in vivo. We succeeded in isolating and culturing the dental pulp stem cells from the minipigs and culturing them in three-dimensional culture, and confirmed significant osteogenic potential in the TH-added group.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 ミニブタ 三次元顎骨再生 GFP

1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラントを要する歯牙欠損、歯周病、外傷、腫瘍切除後などの後天性骨欠損、また、口唇口蓋裂を始めとする先天性顎裂欠損や骨形成不全症などの不可逆性の骨欠損に対する治療は機能的にも審美的にも焦眉の課題であり、その治療法として骨再生療法が注目を浴びて久しい。従来、骨欠損部位に対する自家骨や人工材料を用いた治療法が選択されてきたが、採骨部の外科的侵襲や治療成績など多くの課題が残されている。また、これらの問題を解決するべくヒト ES 細胞を始めとした幹細胞を用いた再生医療の研究が盛んに行われているが臨床応用にまでは至っていない。そのような中、2000 年に Gronthos らがヒト歯髄に分化能の高い間葉系幹細胞が存在することを報告し (Proc Natl Acad Sci U S A, 2000) ヒト歯髄幹細胞が再生医療の新たな細胞源として注目を浴びている。このヒト歯髄幹細胞は、骨芽細胞誘導能を有することは報告されているが、高効率な誘導法は確立されていなく顎骨再建の応用までには至っていない。われわれは、ヒト歯髄幹細胞と生理活性物質を組み合わせることによりこれまでにない短期間かつ高効率な骨芽細胞誘導法を開発し、マウス頭頂骨臨海骨欠損モデルにてその有効性を報告した。しかし、移植細胞の生体内での作用機序および大動物におけるヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞の骨分化誘導能は不明である。

2. 研究の目的

これまでに応募者らはマウス頭蓋骨欠損モデルにおいてヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞による骨再生療法を確立した。しかし、移植細胞がどのように宿主で作用したのかの Mode of Action (MOA) は分かっていない。そこで、ドナー細胞が生体内でどのように宿主の骨再生を促すのかを GFP ミニプタから歯髄幹細胞を採取し、骨芽細胞誘導後に同胞の GFP(-)ミニプタに移植を行い移植した GFP 細胞の MOA を検討する。

3. 研究の方法

ヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞による in vivo での新生骨形成は確認できたが、移植細胞の生体内での作用、Mode of Action (MOA) の検討に難渋した。そのため、ヒトに近い大動物の中でもミニプタに着目し、移植した際に識別が容易な GFP ミニプタを用いて以下の検討を行った。

(1) GFP ミニプタの歯髄幹細胞単離・培養および同定

静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターと MTA を締結し GFP ミニプタを作製した。ヒト歯髄幹細胞で確立した手法を用いて GFP ミニプタの歯髄細胞を採取・培養し、歯髄幹細胞の単離に成功した。得られた幹細胞を歯髄幹細胞マーカーである CD29, CD44, CD90, CD14, CD34 の発現を FACS にて解析し、既存のヒト歯髄幹細胞と比較検討した。

(2) GFP ミニプタの歯髄幹細胞の自己複製能および多分化能の検討

自己複製能の検討；

得られた歯髄幹細胞を継代培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖能を評価した。

多分化能の検討；

神経細胞 (マーカー: Tuj1, NFM など)、骨細胞 (ALP 活性染色法、Alizarin Red 染色法、骨マーカー遺伝子である ALP, Col1, Osteopontin) 軟骨細胞 (マーカー: コラーゲン Type II, IX, XI プロテオグリカンなど)、脂肪細胞 (Oil Red O の脂肪滴染色など) への分化能をそれぞれリアルタイム PCR、免疫染色にて検討した。

(3) 生理活性物質を用いた GFP ミニプタの歯髄幹細胞の高効率な骨芽細胞誘導法の確立

われわれはこれまでに生理活性物質であるヘリオキサンチン誘導体 (TH) をヒト歯髄幹細胞培養液中に添加することで高効率な骨芽細胞誘導法に成功した。GFP ミニプタの歯髄幹細胞においても TH により短期間かつ高効率に骨芽細胞誘導が可能か否かを検証した。検証方法は、細胞増殖試験による細胞毒性の評価、ALP 染色、von Kossa 染色及び、リアルタイム PCR による ALP や Osteocalcin などの発現を評価した。

(4) GFP ミニプタ歯髄幹細胞由来骨芽細胞の三次元培養法の確立

TH 添加/非添加 GFP ミニプタ歯髄幹細胞由来骨芽細胞の三次元培養を行った。スキャフォールドには、コラーゲンスポンジ (コラテープ®) を用いた。

(5) 動物実験による三次元骨移植片の骨誘導能に関する検証

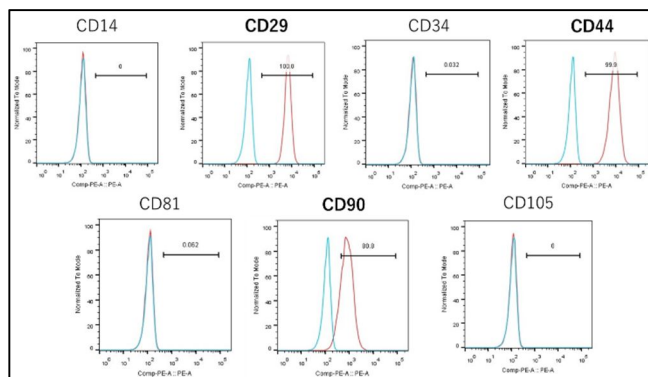
顎骨欠損モデルは、同胞の GFP(-)ミニプタの顎骨に直径 10mm、深さ 3mm の円柱の欠損をエンジンバーにて作製した。TH 添加 GFP ミニプタ歯髄幹細胞由来骨芽細胞を三次元培養へと導き、スキャフォールドには、コラーゲンスポンジ (コラテープ®) を用いた。コラテープに細胞を播種後 2 週間培養し、3 次元移植片とした。サンプルは以下の通りである。①GFP 歯髄幹細胞、②GFP 歯髄幹細胞由来骨芽細胞、③GFP 歯髄幹細胞由来骨芽細胞+TH 添加、④コントロール。移植 1 カ月後、2 カ月後にマイクロ CT にて顎骨を撮影し、各条件での骨再生能を検討した。

4. 研究成果

(1) GFP ミニプタの歯髄幹細胞単離・培養および同定

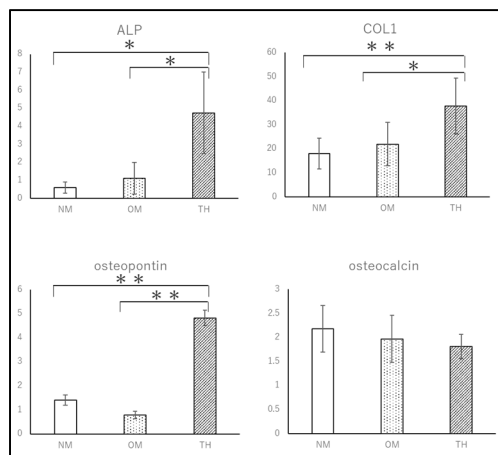
静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターと MTA を締結し GFP ミニプタを作製した。

GFP ミニプタの歯髄細胞を採取・培養し歯髄幹細胞の単離に成功した。歯髄幹細胞マーカーの発現を FACS にて解析し、CD29, CD44, CD90 の陽性、CD14, CD34 の陰性を確認した (右図)。本結果はヒト歯髄幹細胞の細胞特性と類似していた。



(2) GFP ミニプタの歯髄幹細胞の自己複製能および多分化能の検討

GFP ミニプタの歯髄幹細胞においても神経細胞マーカーである Nestin, Tuj1, NF-M の発現を確認できた。また、ALP 活性染色法、Alizarin Red 染色法、骨マーカー遺伝子である ALP, BSP, Osteopontin の発現を認め、骨芽細胞誘導能を有することを確認できた。さらに、確脂肪細胞への分化誘導も Oil red O 染色にて確認できた。

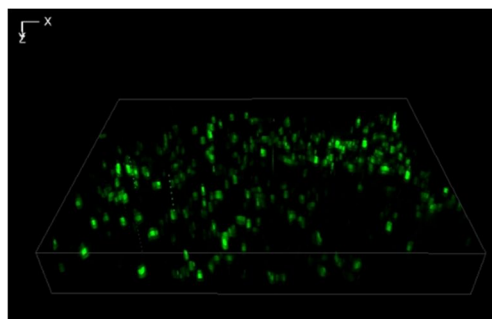


(3) 生理活性物質を用いた GFP ミニプタの歯髄幹細胞の高效率な骨芽細胞誘導法の確立

細胞増殖試験 (CCK-8)、ALP 染色、von Kossa 染色、リアルタイム PCR による ALP や Osteopontin の発現を確認し TH 添加群にて非添加群と比較して優位に促進していることを確認した (右図)。

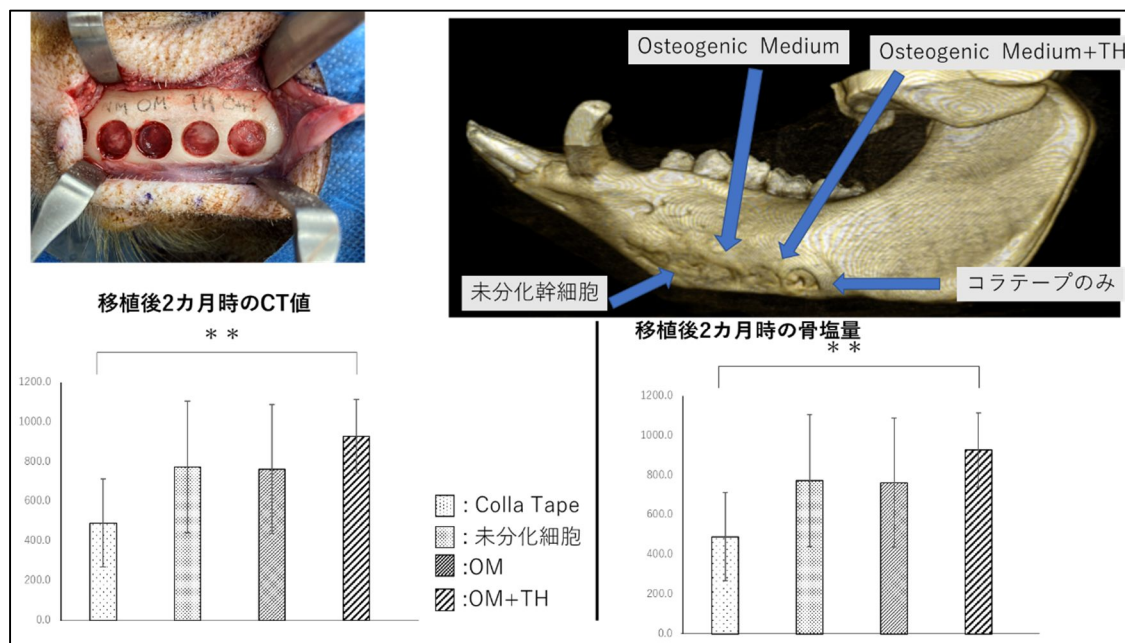
(4) GFP ミニプタ歯髄幹細胞由来骨芽細胞の三次元培養法の確立

スキャフォールドに、コラーゲンスポンジ (コラテープ®) を用いて TH 添加/非添加 GFP ミニプタ歯髄幹細胞由来骨芽細胞の三次元培養を行い、コラテープ内で細胞が培養可能であることが確認できた (右図)。



(5) 動物実験による三次元骨移植片の骨誘導能に関する検証

同胞の GFP(-)ミニプタの顎骨に(4)で作製した GFP ミニプタ由来 3 次元移植片を移植した。1 カ月後、2 カ月後の CT 値および骨塩量より TH 添加群にて優位な骨形成能を確認できた (下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uehara S, Honda A, Kawase-Koga Y, Chikazu D.	4. 巻 32
2. 論文標題 Evaluation of Facial Soft Tissue in Patients With Cleft Lip and Palate Corrected Using Maxillary Protraction Appliances	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Craniofac Surg.	6. 最初と最後の頁 1480-1482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SCS.0000000000007406.	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 Kaibuchi N, Iwata T, Okamoto T, Kawase-Koga Y, Yamato M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Cell therapy for medication-related osteonecrosis of the jaw: update on treatment strategies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur Cell Mater.	6. 最初と最後の頁 31-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22203/eCM.v041a03.	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 Yamakawa D, Kawase-Koga Y, Fujii Y, Kanno Y, Sato M, Ohba S, Kitaura Y, Kashiwagi M, Chikazu D.	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of Helioxanthin Derivative-Treated Human Dental Pulp Stem Cells on Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 9158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21239158.	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 Sato M, Kawase-Koga Y, Yamakawa D, Fujii Y, Chikazu D.	4. 巻 21
2. 論文標題 Bone Regeneration Potential of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Elderly Patients and Osteo-Induced by a Helioxanthin Derivative	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 7731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207731.	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 Kono M, Watanabe M, Hasegawa O, Kawase-Koga Y, Chikazu D.	4. 巻 58
2. 論文標題 Less invasive approach for bone reconstruction using three-dimensional formable titanium mesh after removal of osseous lesions in the mandibular angle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Oral Maxillofac Surg.	6. 最初と最後の頁 e127-e129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjoms.2020.06.028.	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 Watanabe M, Yoneyama Y, Hamada H, Kohno M, Hasegawa O, Takahashi H, Kawase-Koga Y, Matsuo A, Chikazu D, Kawata S, Itoh M.	4. 巻 13
2. 論文標題 The Usefulness of Saturated Salt Solution Embalming Method for Oral Surgical Skills Training: A New Cadaveric Training Model for Bone Harvesting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anat Sci Educ.	6. 最初と最後の頁 628-635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ase.1925.	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山川樹、古賀陽子、藤居泰行、菅野勇樹、佐藤麻梨香、近津大地
2. 発表標題 骨折治癒におけるヘリオキサチン誘導体を用いたヒト歯髄幹細胞の効果
3. 学会等名 第75回NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021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	飛田 護邦 (Tobita Morikuni) (10599038)	順天堂大学・革新的医療技術開発研究センター・先任准教授 (32620)	

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	近津 大地 (Chikazu Daichi) (30343122)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

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