

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10226

研究課題名(和文) 乳歯歯髄幹細胞の最適な移植条件探索とコールドレーザーによる口蓋裂再生治療法の確立

研究課題名(英文) Search for optimal transplantation conditions of primary dental pulp stem cells and establishment of regenerative treatment for cleft palate using cold laser

研究代表者

柄 優至 (Tsuka, Yuji)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：50737682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト乳歯歯髄由来のstem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)に着目し、歯髄中に含まれる幹細胞のうち、どの細胞集団が骨再生に関与しているのかを検証した。SHEDからCD146陽性細胞集団およびCD146陰性細胞集団を単離・培養した。マウスの骨欠損モデルを用い、生体内移植を行った。CD146陽性およびSHEDの不均一な集団を移植すると有意に高い骨再生が観察され、骨の再生と血管新生を促進することが明らかとなった。またcarbonate hydroxyapatiteとSHEDを併用し、より骨再生が誘導されることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いているstem cells from human exfoliated deciduous teethは、ヒト乳歯歯髄由来であり、低侵襲かつ簡便に細胞採取が可能である。これらの細胞の培養および生体内移植が可能になれば、現在行っている移植術に大きな影響を与える。例えば口蓋裂を有する患者の顎裂部に自家腸骨海綿骨移植等を行うため、ドナーサイトにおける疼痛や神経損傷による歩行障害といった問題が起こるがこれらを解消することができる。これは大きな社会的意義があると言える。また、これらを応用することにより、より高度な骨再生分野の手がかりになり得ることは学術的に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) derived from the dental pulp of human deciduous teeth and verified which cell populations among the stem cells contained in the dental pulp are involved in bone regeneration. A CD146-positive cell population and a CD146-negative cell population were isolated and cultured from SHED. In vivo transplantation was performed using a mouse bone defect model. Transplantation of CD146-positive and SHED heterogeneous populations resulted in significantly higher bone regeneration, demonstrating that it promotes bone regeneration and angiogenesis. In addition, it was clarified that bone regeneration was induced by the combined use of carbonate hydroxyapatite and SHED.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 SHED レーザー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂を有する患者の顎裂部には、自家腸骨海綿骨移植が広く行われている。しかしながら、ドナーサイトにおける疼痛や神経損傷による歩行障害は、学童期の患者にとって大きな負担となる。我々は患者の負担を低減するため、低侵襲で細胞採取が可能なヒト乳歯歯髄由来の stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) に着目し、歯髄由来の幹細胞が human BMSCs (hBMSCs) と同程度の骨再生能を有している事を解明した。しかしながら、歯髄中に含まれる幹細胞のうち、どの細胞集団が骨再生に関与しているのか、詳細な骨再生機構は未だ不明である。本研究は、SHED における骨再生に有用な細胞集団と最適な移植条件を解明することを目的とする。さらに、優れた生体活性化作用を有するコールドレーザー照射が、SHED における骨再生誘導にどのような影響を及ぼすのかを検証する。そして、得られた知見を統合し、低侵襲で更なる骨再生誘導が達成されるか否かを検証する。

2. 研究の目的

本研究では、歯髄中における骨再生に有用な細胞集団を解明するとともに、コールドレーザー照射を併用し、組織再生の亢進が達成されるか否かを検証する。未だ明らかとなっていない SHED の特性を検証し、骨再生誘導機構の解明を試みることは学術的にも独自性があると考えた。さらに、本法を臨床応用し、最終的にはこれらを口蓋裂患者の顎裂閉鎖治療に応用した、新規治療法の確立を目指すことを最終目的とする。これは患者負担を軽減することができ、広く再生医療分野の進歩への貢献を果たすと考えられる。

3. 研究の方法

(1) SHED における骨再生に有用な細胞集団の検討

抜去された乳歯から SHED を単離・培養し、セルソーターを使用し、SHED から CD146 陽性細胞集団 (CD146+) および CD146 陰性細胞集団 (CD146-) を単離・培養した。6 週齢免疫不全マウス (BALB/c-nu) の頭蓋冠に、トレフィンバーを用いて、骨欠損を作製し、アテロコラーゲンスポンジを使用して生体内移植を行った。予備実験で効果のあった CD146+ 細胞細胞細胞に焦点を当て、再生骨の評価を行う。骨欠損部に SHED の CD146+ 細胞を移植し、骨再生・修復の経日的変化について、マイクロ CT を用いて、三次元的に解析を行う。移植条件の検討として、移植細胞数の検討を行うとともに、軟骨分化および骨分化誘導された細胞を移植し、最適な細胞移植条件についても検討を行う。評価方法としては、ラットを灌流固定し、頭頂骨を摘出・脱灰した後、自動包埋システムにて組織切片を作製する。HE 染色および Masson's trichrome 染色を行うとともに、骨代謝関連マーカーの免疫組織化学染色を用いて評価した。

(2) SHED と carbonate hydroxyapatite を併用することによる骨再生の変化の検討

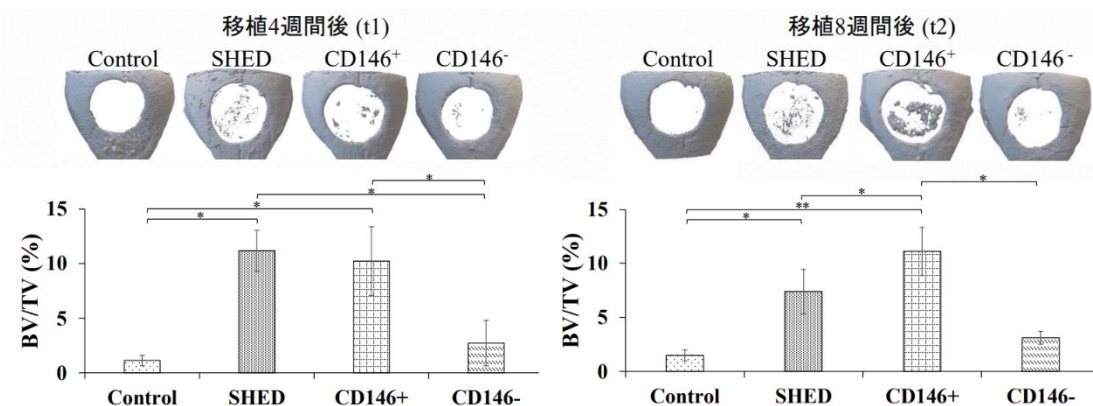
SHED と carbonate hydroxyapatite のナノ粒子に加工したものを併用して移植した群と、SHED と carbonate hydroxyapatite 単体で移植した群を設定し、(1) 同様にマイクロ CT および組織切片を用いて検討を行った。

(3) コールドレーザー照射が細胞増殖・基質産生能に及ぼす影響の検討

本研究では 910 nm が主波長であるコールドレーザー 650、810 および 910 nm の波長と複数のパルス幅が選択可能な超短パルス半導体レーザーを使用する。SHED およびマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) を用いて検討を行う。レーザー照射については我々の手技 (Gunji H et al., 2018) と Holder ら (J Dent Res, 2012) の方法に準拠する。各細胞に対し、レーザー照射を行った際の細胞増殖および骨分化能について BrdU assay および MTS assay を用いて、比較・検討する。また、骨分化誘導を行い、Alizarin Red 染色、Alkaline phosphatase (ALP) 染色、ALP 定量試験を行い、骨分化能を対照群と比較検討する。さらに、骨形成関連マーカー (ALP、OCN、BMP-2 など) の発現レベルについて、遺伝子解析および定量 Western blot 解析を行った。

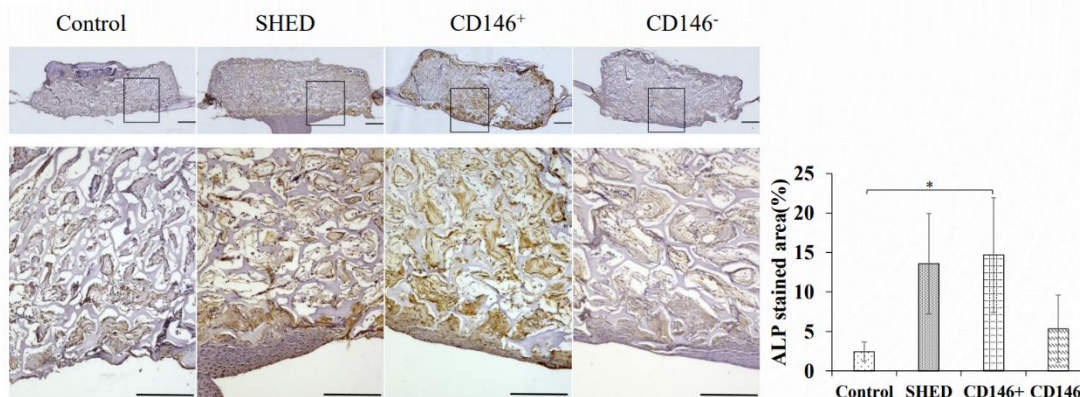
4. 研究成果

CD146⁺および SHED の不均一な集団を移植すると骨の再生が観察され、CD146⁺細胞では有意に高い骨の再生が観察された。骨の再生は、CD146⁻群の方が対照群よりも高かったが、4 週間および 8 週間で他の移植群よりも有意に低かった。組織学的および免疫組織化学的評価により、CD146⁺細胞が骨の再生と血管新生を促進することが明らかとなった。



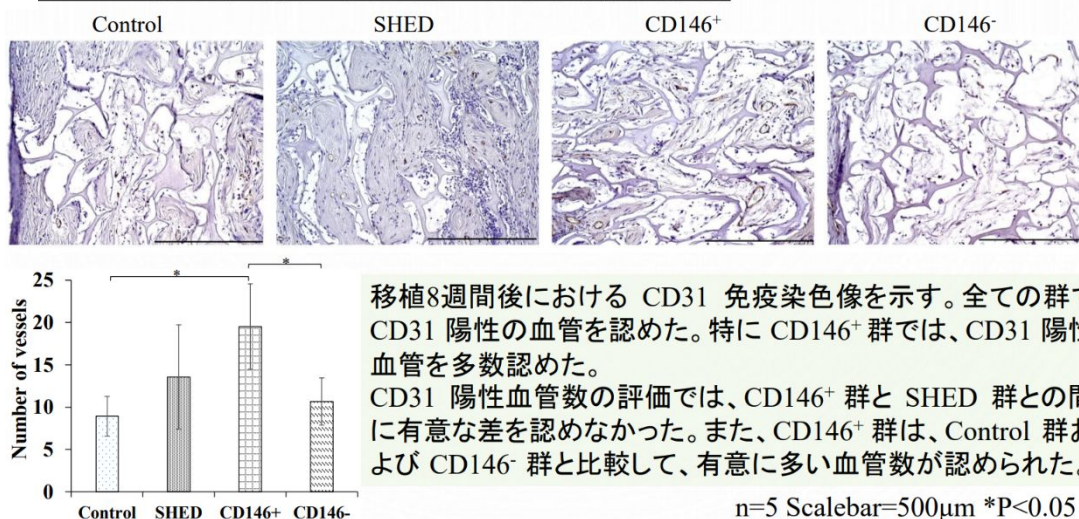
t1において、SHED 群および CD146⁺ 群の骨再生率は、Control 群 および CD146⁻ 群と比較して、有意に亢進された。また、t2 において、CD146⁺ 群は、他の群と比較して、有意に高い骨再生率を認めた。
n=5 **P<0.01 *P<0.05

ALP 免疫組織化学染色による組織学評価



移植8週間後における ALP 免疫染色像を示す。SHED 群と CD146⁺ 群において濃く染色された発現領域を認めた。移植部位のうち ALP 発現領域が占める割合は、SHED 群、CD146⁺ 群ともに Control 群と CD146⁻ 群よりも高い傾向を示した。
n=5 Scalebar=500μm *P<0.05

CD31 免疫組織化学染色による組織学評価

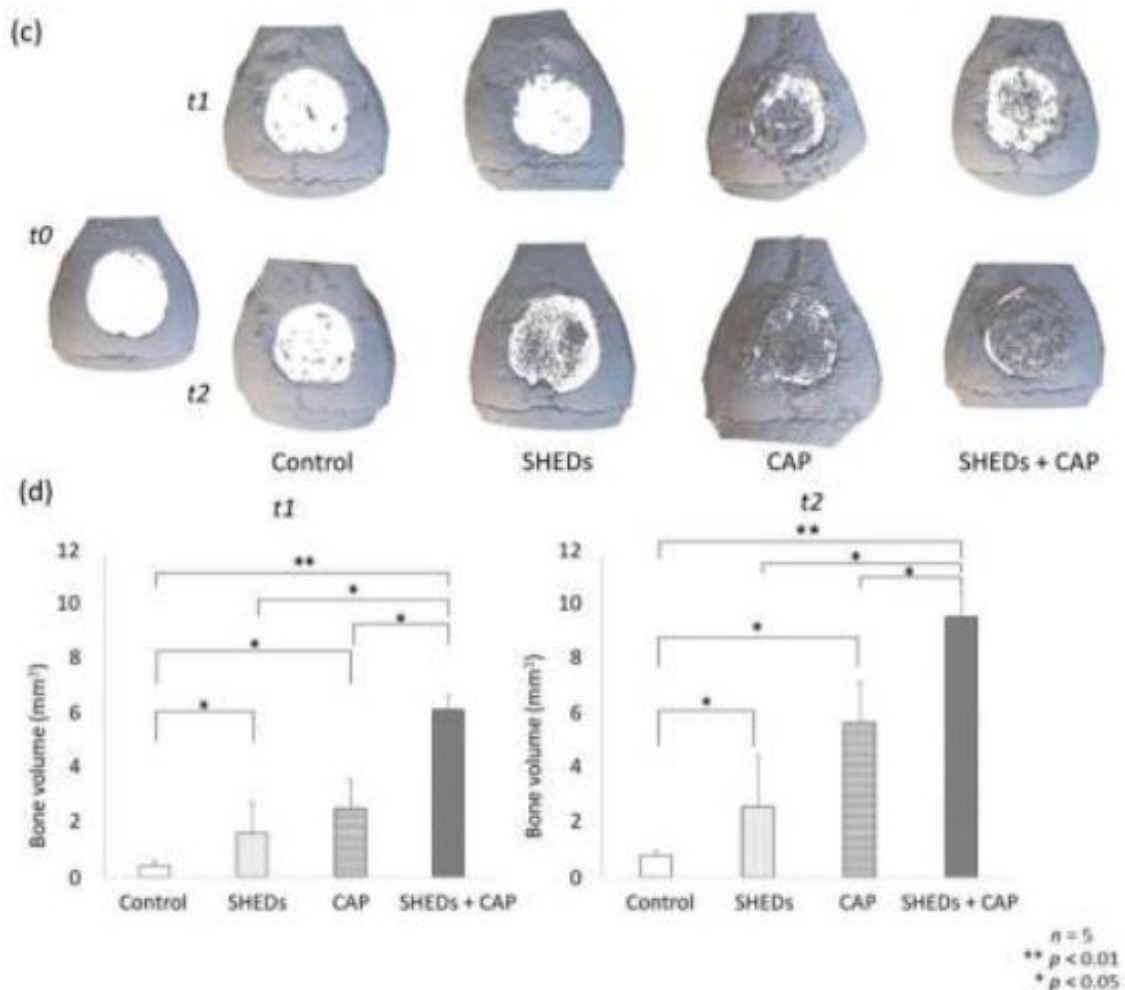


移植8週間後における CD31 免疫染色像を示す。全ての群で CD31 陽性の血管を認めた。特に CD146⁺ 群では、CD31 陽性血管を多数認めた。CD31 陽性血管数の評価では、CD146⁺ 群と SHED 群との間に有意な差を認めなかった。また、CD146⁺ 群は、Control 群および CD146⁻ 群と比較して、有意に多い血管数が認められた。

n=5 Scalebar=500μm *P<0.05

この内容は、2021 年に国際学術誌に投稿し、誌上に掲載された。

また、同様に頭蓋冠に骨欠損を作成したモデルにおいて、SHED と carbonate hydroxyapatite (CAP) を併用して移植することで、より骨再生が誘導されることを解明した。



この内容は、2022年に国際学術誌に投稿し、誌上に掲載された。

コールドレーザーを照射することで、MC3T3-E1はBrdU assayおよびMTS assayにおいて対照群と比べ有意に細胞増殖能が高いことが確認された。また遺伝子解析においてもALPの発現が有意に高いことが明らかとなり、骨形成促進の可能性が示唆された。SHEDについては、個体差が大きいことが誘因なのか、結果は多種多様であった。研究デザインを含めたより詳細な検討が必要であり、今後の検討課題である。

以上より、骨の生体移植治療に代わる方法として、CD146+およびSHEDの不均一な集団やcarbonate hydroxyapatiteを併用した骨再生の新たな治療方法が提案された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Rikitake K, Kunimatsu R, Yoshimi Y, Nakajima K, Hiraki T, Aisyah Rizky Putranti N, Tsuka Y, Abe T, Ando K, Hayashi Y, Nikawa H, Tanimoto K.	4. 巻 Sep 12
2. 論文標題 Effect of CD146+ SHED on bone regeneration in a mouse calvaria defect model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 PMID: 3451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.14020.	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 Sakata S., Kunimastu R., Tsuka Y., Nakatani S., Gunji H., Yanoshita M., Kado I., Ito S., Nurul Aisyah Rizky Putranti., Rendra Chriestedy Prasetya., Hirose N., Tanimoto K.	4. 巻 Mar;37(2)
2. 論文標題 High-frequency Near-infrared Diode Laser Irradiation Suppresses IL-1 -induced Inflammatory Cytokine Expression and NF- B Signaling Pathways in Human Primary Chondrocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lasers in Medical Science	6. 最初と最後の頁 1193-1201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10103-021-03371-5.	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 Tsuka Yuji, Kunimatsu Ryo, Gunji Hidemi, Abe Takaharu, Medina Cynthia Concepcion, Hiraki Tomoka, Nakatani Ayaka, Sakata Shuzo, Rikitake Kodai, Aisyah Purtranti Nurul, Hirose Naoto, Yanosita Makoto, Tanimoto Kotaro	4. 巻 35
2. 論文標題 Examination of the effect of combined use of Er:YAG laser irradiation and mechanical force loading on bone metabolism using primary human gingival fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lasers in Medical Science	6. 最初と最後の頁 2059 ~ 2064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10103-020-03079-y	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 力武航大, 國松亮, 吉見友希, 中島健吾, 平木智香, Putranti NAR., 柄優至, 阿部崇晴, 安藤和代, 林陽子, 二川浩樹, 谷本幸太郎
2. 発表標題 CD146 陽性乳歯歯髓由来間葉系幹細胞を用いた骨再生治療への応用
3. 学会等名 第80 回日本矯正歯科学会大会・第5 回国際会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田 修三, 國松亮, 柄優至, 中谷文香, Putranti NAR., 矢野下真, 廣瀬尚人, 谷本幸太郎
2. 発表標題 高周波近赤外半導体レーザー照射がヒト軟骨細胞の炎症サイトカインに及ぼす影響
3. 学会等名 第80 回日本矯正歯科学会大会・第5 回国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田修三, 國松 亮, 柄優至, 中谷文香, Putranti NAR., 矢野下真, 廣瀬尚人, 谷本幸太郎
2. 発表標題 ヒト初代培養軟骨細胞における炎症性サイトカインおよびマトリックスメタロプロテアーゼの IL-1 誘導性発現に対する高周波近赤外半導体レーザー照射の影響
3. 学会等名 第34 回日本顎 関節学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平木智香, 國松亮, 中島健吾, 阿部崇晴, 柄優至, 谷本幸太郎
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞の培養上清は骨再生を促進させる - 培養上清タンパク成分の 解析 -
3. 学会等名 第44 回日本口蓋裂 学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rikitake K., Kunimatsu R., Nakajima K., Ando K., Hiraki T., Tsuka Y., Abe T., N.A.R. Putranti., Tanimoto K.
2. 発表標題 Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress, The 12th Asian Pacific Orthodontic Congress
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 N.A.R. Putranti., Kunimatsu R., Nakajima K., Ando K., Hiraki T., Rikitake K., Tsuka Y., Abe T., Tanimoto K.
2. 発表標題 Success rates in isolating mesenchymal stem cells from permanent and deciduous teeth
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress, The 12th Asian Pacific Orthodontic Congress
4. 発表年 2020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	谷本 幸太郎 (Tanimoto Kotaro) (20322240)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	
研究分担者	阿部 崇晴 (Abe Takaharu) (20806682)	広島大学・病院(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	國松 亮 (Kunimatsu Ryo) (40580915)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401)	

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
---------	---------