

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18563

研究課題名（和文）歯髄由来幹細胞新規分離膜による歯髄組織由来膜分取幹細胞の分取法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a method for sorting stem cells derived from dental pulp tissue using a novel separation membrane for stem cells derived from dental pulp

研究代表者

山本 耕平（YAMAMOTO, KOHEI）

長崎大学・病院（歯学系）・助教

研究者番号：20756407

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：今回、新規分離膜による歯髄由来幹細胞膜分取法と摘出したヒト歯髄組織片の Explant Cultureを組み合わせ、歯髄幹細胞を分取・培養し細胞表面マーカーにて高品質な幹細胞であることを確認後、増殖能、遊走能、多分化能、RT-PCR法やWestern blot法といった分子生物学的手法によりMDPSCs（歯髄膜分取幹細胞）、DPSCs、Explant Cultureと比較検討した。tissue derived-MDPSCsはMDPSCsと比較して増殖能、遊走能、RT-PCR、神経・血管誘導において有意差のない結果となりDPSCs、Explant Cultureと比較して良好な結果を得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、歯髄除去後の歯髄を再生する、真に細胞生物学的な歯髄治療法（歯髄幹細胞による歯髄と象牙質の再生）の実用化へ向けて歯髄由来幹細胞新規分離膜による歯髄組織由来膜分取幹細胞（tissue derived-MDPSCs）の分取法の確立を目的とする。

国立長寿医療研究センターにて2013年4月から、不可逆性歯髄炎に罹患し、健全な歯髄を有する不用歯を提供できる患者を対象に5症例の歯髄再生の臨床研究が実施された。その結果、安全性・有効性に問題ないことが確認された。今回の研究にて実用化に向け、より高機能・高品質なヒト歯髄幹細胞を簡便、安価、高効率に分取可能な方法が確立された。

研究成果の概要（英文）：This time, by combining the dental pulp-derived stem cell membrane fractionation method using a new separation membrane and Explant Culture of excised human dental pulp tissue pieces, dental pulp stem cells are sorted and cultured, and after confirming that they are high-quality stem cells by cell surface markers, they proliferate. MDPSCs, DPSCs and explant culture were compared with molecular biological methods such as the ability, migratory ability, pluripotency, RT-PCR method and Western blot method. Tissue-derived-MDPSCs showed no significant difference in proliferative ability, migratory ability, RT-PCR, and nerve/vascular induction compared with MDPSCs, and obtained better results than DPSCs and Explant Culture.

研究分野：再生療法

キーワード：歯髄再生 新規分離膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国立長寿医療研究センターにて 2013 年 4 月から、不可逆性歯髄炎に罹患し、健全な歯髄を有する不用歯を提供できる患者を対象に 5 症例の歯髄再生の臨床研究が実施された。その結果、安全性・有効性に問題ないことが確認された。実用化に向け、より高機能・高品質なヒト歯髄幹細胞を簡便、安価、高効率に分取可能な方法が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、歯髄除去後の歯髄を再生する、真に細胞生物学的な歯髄治療法（歯髄幹細胞による歯髄と象牙質の再生）の実用化へ向けて歯髄由来幹細胞新規分離膜による歯髄組織由来膜分取幹細胞（tissue derived-MDPSCs）の分取法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

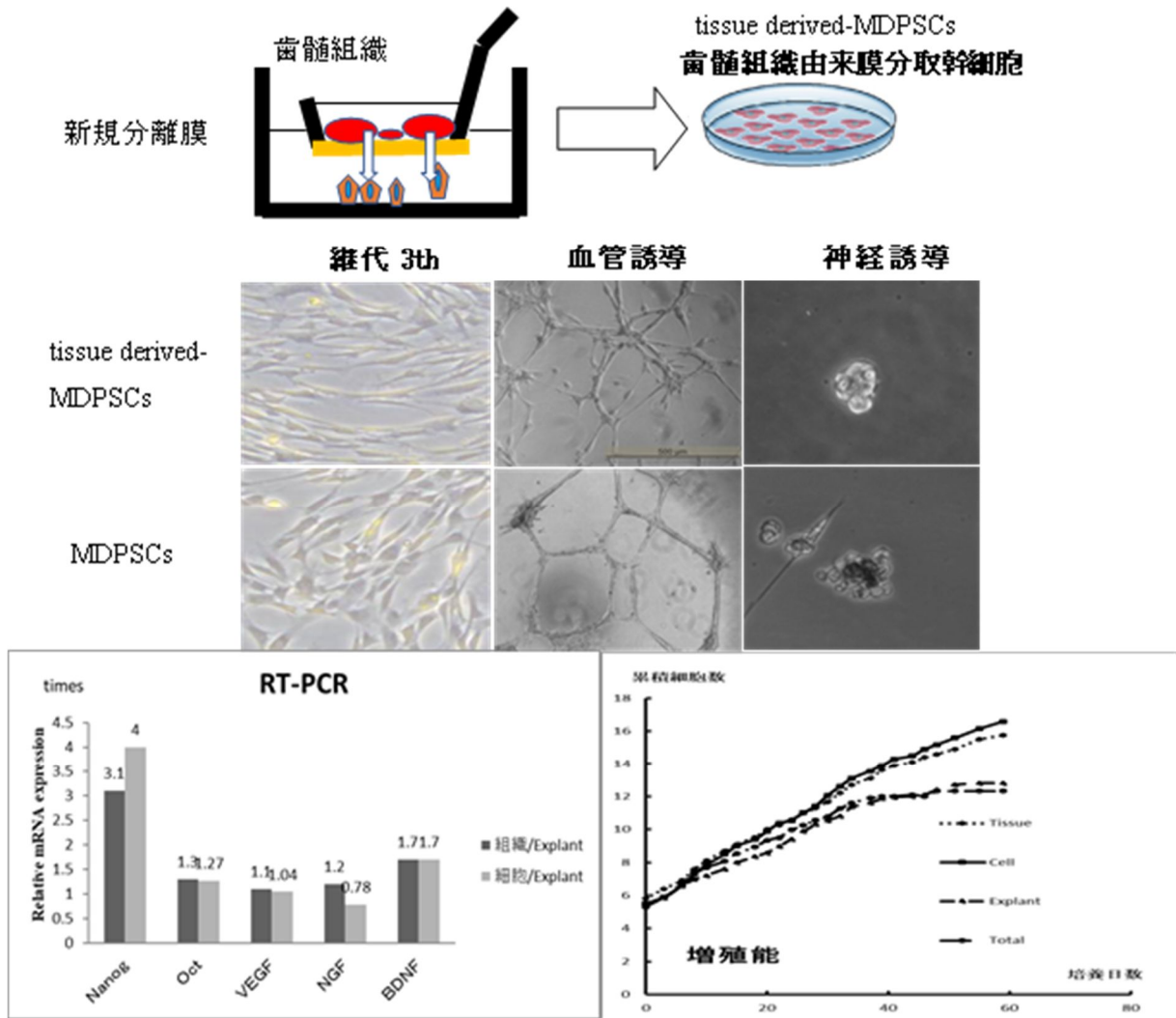
今回、新規分離膜(ネッパジーン)による歯髄由来幹細胞膜分取法(中島、2013 年)と摘出したヒト歯髄組織片の Explant Culture(L. Spath, 2010) を組み合わせ、歯髄幹細胞を分取・培養し細胞表面マーカーにて高品質な幹細胞であることを確認後、増殖能、遊走能、多分化能、RT PCR 法や Western blot 法といった分子生物学的手法により MDPSCs(歯髄膜分取幹細胞)、DPSCs、Explant Culture と比較検討した。

4. 研究成果

コロナ渦による新規分離膜の開発は遅れていたが、新規分離膜の入手後は順調に進行した。tissue derived-MDPSCs、は MDPSCs と比較して増殖能、遊走能、RT PCR、神経・血管誘導において有意差のない結果となり DPSCs、Explant Culture と比較して有意差のある良好な結果を得られた。(2 枚目参照)

令和 2 年歯科保存学会春季学術大会(第 153 回)にて架橋形抑制コラーゲンにおける魚由来コラーゲンペプチドの in vitro 石灰化に及ぼす影響を共同研究発表した。現在データの整理を行っており令和 5 年秋季歯科保存学会春季学術大会(第 159 回)にて発表予定である。その後論文執筆する。

模式図



細胞表面マーカー(フローサイトメトリー)

	tissue derived-MDPSCs	MDPSCs	Explant culture	DPSCs
CD97	94.8 % (±3.5)	97.0 % (±0.1)	88.0 % (±5.8)	83.7 % (±2.3)
CD105	96.9 % (±1.3)	97.2 % (±1.7)	97.7 % (±1.6)	98.7 % (±1.0)
CD325	88.8 % (±8.9)	94.1 % (±6.4)	81.7 % (±8.4)	67.8 % (±5.4)
CXCR4	18.0 % (±1.3)	14.0 % (±0.8)	13.2 % (±2.0)	6.0 % (±1.8)
GCSFR	31.6 % (±3.1)	35.1 % (±6.1)	19.3 % (±6.7)	14.4 % (±3.2)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shizuka Yamada , Kohei Yamamoto , Ayako Nakazono , Takashi Matsuura , Atsutoshi Yoshimura	4. 巻 1;40(6)
2. 論文標題 Functional roles of fish collagen peptides on bone regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dent Mater J . 2021 Dec : Epub 2021 Jul 31.	6. 最初と最後の頁 1295-1302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2020-446	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 山田志津香、山本耕平
2. 発表標題 架橋形抑制コラーゲンにおける魚由来コラーゲンペプチドのin vitro石灰化に及ぼす影響
3. 学会等名 令和2年歯科保存学会春季学術大会（第153回）
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
---------------------------	-----------------------	----

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