

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18720

研究課題名（和文）歯髄幹細胞由来因子と半導体レーザーを用いた皮弁再建後の治癒促進法の開発

研究課題名（英文）A method to promote healing after free flap reconstruction using dental pulp stem cell-derived factors and a semiconductor laser

研究代表者

山口 聡 (Yamaguchi, Satoshi)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70778670

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）：マウス背部の皮弁虚血再灌流傷害モデルを用いて、歯髄幹細胞培養上清が皮弁の血流を増加させ、壊死領域を縮小させる効果を明らかにした。またin vitro系では細胞生存率の上昇させる効果や、細胞死を抑制する効果を示した。歯髄幹細胞培養上清は皮弁血流を改善し、治癒を促進する可能性があると考えられた。このような治療メカニズムとして、歯髄幹細胞培養上清の細胞保護、抗アポトーシス、抗炎症、抗酸化ストレスといった多面的な作用が奏効したものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では歯髄幹細胞由来因子による皮弁再建後の治癒促進法の可能性を提示した。新たな治療法が確立されることで、大掛かりな設備を必要とせず、費用のかからない新たな組織再生・修復が可能になる。この方法は皮弁生着を改善させるという目的に使用できるだけでなく、組織の再生・修復過程にあるあらゆる病態において応用でき、さまざまな創傷治癒、再生医療における普遍的な治療法を提供するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using a mouse dorsal flap ischemia-reperfusion injury model, we demonstrated the effect of dental pulp stem cell conditioned medium on increasing the blood flow to the flap and reducing the necrotic area. The therapeutic mechanism was thought to be the multifaceted effects of dental pulp stem cell conditioned medium, including cytoprotection, anti-apoptosis, anti-inflammation, and anti-oxidative stress.

研究分野：oral and maxillofacial surgery

キーワード：歯髄幹細胞 組織修復 組織再生 虚血再灌流傷害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 1) 再建手術での問題点

口腔癌に対しては集学的治療が行われている。免疫チェックポイント阻害剤などの新たな治療が開発、普及しつつあるが、現在でも治療の主体は手術である。口腔癌の手術では解剖学的な複雑さと機能の重要性から血管柄付き遊離皮弁を用いた再建がされることが多い。血行動態の改善に焦点をおいた工夫がなされ、再手術を必要とする失敗例は 5%以下といわれている。しかしながら、再手術とはならないまでも皮弁の部分壊死や創の離開、術後感染などのトラブルをしばしば経験する。その原因は欠損形態の複雑さのために皮弁が部分的に血流不良に陥ることや、虚血再灌流障害を生じるためと考えられる。このようなトラブルのためにリハビリテーションの開始が遅れたり、入院期間が延長したりするということは口腔癌治療に携わる臨床医であれば必ず経験することである。組織の生着をより早期に、確実にする治療法の開発が望まれている。

#### 2) 歯髄幹細胞由来因子の多面的な効果

申請者は過去の研究でマウス虚血再灌流モデルを用いて歯髄幹細胞無血清培養上清が血再灌流傷害を軽減することを報告した。その治療メカニズムとして、歯髄幹細胞が放出するパラクライン因子群が炎症反応と細胞死を抑制する効果をもつことを明らかにした。また、われわれの研究グループでは肺・腎・肝・骨・関節・脳・脊髄といった全身の器官・組織において、歯髄幹細胞由来因子が抗炎症・細胞死抑制・線維化抑制・血管新生などの多面的な機能により組織再生・修復を促進することを明らかにした。さらに歯髄幹細胞が放出する因子は培養の条件により量、質ともに変化することが分かっており、無血清、低酸素、伸展刺激などの過酷な環境への暴露で組織再生・修復に有用な因子が放出されることが明らかになってきている。

### 2. 研究の目的

動物モデルを用いて、歯髄幹細胞由来因子が皮弁の生着に与える効果を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 歯髄幹細胞培養上清の調整：歯髄幹細胞を異なる酸素濃度(21%および1%)で培養し、培養上清を回収した。

以下の実験において、実験群はコントロール群(細胞培養培地 DMEM)、N-CM 群(21%酸素濃度で培養した歯髄幹細胞の培養上清)、H-CM 群(1%酸素濃度で培養した歯髄幹細胞の培養上清)を設定した。

#### 2) マウス皮弁虚血再灌流傷害モデルに対する歯髄幹細胞培養上清の効果の検討(in vivo 実験)：

マウスの背部に3×1.5cmの皮弁を挙上し栄養動脈をクランプ・解除することで虚血再灌流モデルを作製した。モデルの再灌流時に、歯髄幹細胞培養上清(N-CM および H-CM) 500 μL を尾静脈より投与した。7日後に背部皮弁の壊死・生存領域を観察し、画像解析により定量的に評価した。またレーザースペックルイメージングで皮弁の血流を観察し、画像解析により定量的に評価した。皮弁における細胞のアポトーシスを TUNEL 染色法で観察し定量的に評価した。皮弁辺縁部の組織を採取、RNA を抽出し、炎症性サイトカイン遺伝子の発現をリアルタイム定量 RT-PCR 法で評価した。

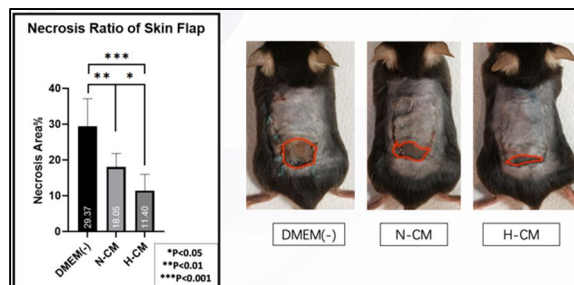
#### 3) ヒト表皮細胞に対する歯髄幹細胞培養上清の効果の検討(in vitro 実験)

ヒト皮膚ケラチノサイト株(NHEK)を低酸素培養し、歯髄幹細胞培養上清が細胞生存、細胞死に与える影響を TUNEL 染色法、WST-8 法で評価した。また低酸素培養により酸化ストレスを惹起し、歯髄幹細胞培養上清がスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)産生に与える影響を評価した。

### 4. 研究成果

#### 1) In vivo 系

マウス皮弁虚血再灌流傷害モデルにおいて、N-CM 群、H-CM 群の皮弁壊死領域はコントロール群に比べて有意に小さく(右図)レーザースペックルイメージングによる血流評価では N-CM 群、H-CM 群はコントロール群よりも血流が豊富であることが明らかになった。TUNEL 染色では N-CM 群、H-CM 群の TUNEL 陽性細胞が有意に少なく、細胞のアポトーシスが抑制されていることが明らかになった。さらに、炎症性サイトカイン(TNF-

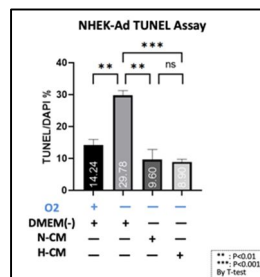


、IL-1、IL-6)の遺伝子発現は N-CM 群、H-CM

群で有意に低下しており、炎症が減弱していることが示された。

2) In vitro系

NHEKを用いた実験では低酸素培養後の細胞生存率がN-CM群、H-CM群で有意に上昇しており、また、NHEKのTUNEL陽性率がN-CM群、H-CM群で有意に低下していた(右図)。SODアッセイではN-CM群、H-CM群においてSOD活性が上昇しており、抗酸化ストレス作用が惹起されていることが示唆された。



3) 結果のまとめ

マウス背部の皮弁虚血再灌流傷害モデルを用いて、歯髄幹細胞培養上清が皮弁の血流を増加させ、壊死領域を縮小させる効果を明らかにした。その治療メカニズムとして、歯髄幹細胞の細胞保護、抗アポトーシス、抗炎症、抗酸化ストレスといった多面的な作用が奏効したものと考えられた。

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 1件）

|   |                  |
|---|------------------|
| 1. 著者名<br>Chen H, Yamaguchi S, Wang Y, Kaminogo K, Sakai K, Hibi H  | 4. 巻<br>15       |
| 2. 論文標題<br>Cytoprotective role of human dental pulp stem cell-conditioned medium in chemotherapy-induced alopecia | 5. 発行年<br>2024年  |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research & Therapy  | 6. 最初と最後の頁<br>84 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13287-024-03695-3   | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>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<br>-        |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>陳暉，山口聡，王芸霖，上之郷健人，酒井陽，日比英晴              |
| 2. 発表標題<br>ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清がパクリタキセルによる脱毛症に与える効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第21回日本再生医療学会                           |
| 4. 発表年<br>2022年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>陳暉，山口聡，王芸霖，上之郷健人，酒井陽，日比英晴                 |
| 2. 発表標題<br>ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清がシクロフォスファミドによる脱毛症に与える効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第22回日本再生医療学会                              |
| 4. 発表年<br>2023年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>王芸霖，山口聡，陳暉，渡邊純奈，酒井陽，日比英晴       |
| 2. 発表標題<br>ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清が皮弁の生着に与える効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第21回日本再生医療学会                   |
| 4. 発表年<br>2022年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>王芸霖, 山口聡, 陳暉, 渡邊純奈, 酒井陽, 日比英晴  |
| 2. 発表標題<br>ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清が皮弁の生着に与える効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第20回日本再生医療学会総                  |
| 4. 発表年<br>2021年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>陳暉, 山口聡, 王芸霖, 上之郷健人, 酒井陽, 日比英晴       |
| 2. 発表標題<br>ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清が化学療法による脱毛症に与える細胞保護効果 |
| 3. 学会等名<br>第23回日本再生医療学会                         |
| 4. 発表年<br>2024年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>上之郷健人, 山口聡, 外山直人, 日比英晴         |
| 2. 発表標題<br>抗RANKL抗体関連顎骨壊死に対する歯髄幹細胞培養上清の効果 |
| 3. 学会等名<br>第68回日本口腔外科学会                   |
| 4. 発表年<br>2023年                           |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|