

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10186

研究課題名(和文) 乳歯歯髄幹細胞由来エクソソームの機能解析と顎裂部骨再生誘導への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of exosomes derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth and application to guiding bone regeneration in the jaw cleft

研究代表者

谷本 幸太郎 (Tanimoto, Kotato)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：20322240

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)：SHEDは表面抗原によりいくつかのタイプに分類され、中でもCD146陽性細胞は血管内皮細胞との相互作用により再生組織の血管新生を促進することが示唆され、骨再生に重要な役割を果たすと考えられた。得られたSHED由来エクソソームの粒子径は60-90 nmであり、培養液に添加することにより骨髄由来未分化間葉幹細胞(BMSC)の石灰化能が亢進することが明らかとなった。また、本作用はMAPK経路を介していることが示唆された。DPSCs由来エクソソームはSHED由来と同様にBMSCの石灰化能を亢進させる傾向が認められたが、DPSCs由来とSHED由来エクソソームの間に有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、乳歯歯髄由来未分化間葉系幹細胞(SHED)から産生されるエクソソームが分離され、骨髄由来未分化間葉幹細胞に対する骨誘導能が明らかとなった。口唇裂・口蓋裂における顎裂部の骨再生医療へのSHED由来エクソソームの臨床応用の可能性が示されたことは、骨移植などの現行治療に比較して低侵襲の治療の達成につながることから、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：SHED is classified into several types based on surface antigens, among them, CD146-positive cells are suggested to promote angiogenesis in regenerated tissue through interaction with vascular endothelial cells, and are suggested to play an important role in bone regeneration. The particle size of the obtained SHED-derived exosome was 60-90 nm, and it was revealed that adding it to the culture medium enhanced the calcification ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs). It was also suggested that this effect is mediated by the MAPK pathway. Although DPSCs-derived exosome tended to enhance the calcification ability of BMSCs as well as SHED-derived exosome, no significant difference was observed between DPSCs- and SHED- derived exosomes.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：エクソソーム 再生医療 乳歯歯髄由来幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 口唇裂・口蓋裂 (CL/P) は、胎生期における顔面突起の癒合不全に起因する顎裂を特徴とする多因子性の疾患である。顎裂部閉鎖のために二次顎裂部腸骨移植術が広く行われてきたが、腸骨採取後の疼痛や歩行障害、長期の入院など、とりわけ学童期の患者に大きな負担を伴う。そこで、移骨採取の侵襲を低減する方策として、未分化間葉系幹細胞 (MSCs) を用いた骨再生誘導が考えられる。我々は、歯槽骨再生に最適化した独自の CAP 担体を研究し、これと組み合わせる幹細胞として骨髄幹細胞 (BMSCs)、永久歯歯髄幹細胞 (DPSCs) および乳歯歯髄由来未分化間葉系幹細胞 (SHED) を比較検討し、いずれも歯槽骨再生に有効と判定された。しかし、生体内での移植細胞の動態制御は困難であり、移植細胞の多くは移植部位から早期に消失することが判明した。ビーグル犬顎骨欠損部に移植した BMSCs は移植後 15 日で約 30% にまで減少したが、半年ではほぼ完全な骨再生が確認された。再生骨の骨小窩中の骨細胞のうち、移植した BMSCs 由来細胞の割合は 5.7% に過ぎず、残りの移植細胞の骨再生への関与が不明であった。骨再生過程の幹細胞の役割としては、自ら骨芽細胞に分化して骨を形成することに加えて、生理活性物質の産生や抗免疫作用などにより、母体に存在する各種細胞の誘導、分化、増殖の活性化を促し組織再生に関与することが示唆されてきた。最近の検討では、無血清の SHED 培養上清のラット頭蓋冠骨欠損部への投与により骨再生が認められたことから、骨再生誘導には液性成分による周辺細胞へのパラクライン作用が重要な役割を果たすことが示された。直近の研究では、MSCs が産生する液性成分は、細胞由来により明確に異なることが明らかになった。しかしながら、BMSCs、DPSCs に比較して SHED は増殖能と骨誘導能が有意に高いにもかかわらず、IGF-1 や bFGF など骨形成関連液性因子の産生は、BMSCs よりも少なかった。一方、SHED は血管誘導能が高い CD146 陽性細胞が約 70% を占めるものの、VEGF 産生の優位性は見られなかった。このように、幹細胞から他の細胞への作用を生理活性物質だけで説明することは難しい。

(2) エクソソームは、細胞から分泌される直径 50~150 nm の細胞外微小胞の一種であり、蛋白質や mRNA の他、400 種類以上のマイクロ RNA (miRNA) を内包する。受容細胞にエンドサイトーシスなどで取り込まれることにより、内包成分が作用を発揮すると考えられ、新たな細胞間情報伝達機構として注目されている。エクソソームは、骨基質や体液中に広く存在し、ある細胞から分泌されると、インテグリン等を介した機構により指向性を持って受容細胞に取り込まれて機能する。その作用は内包成分に依存すると考えられ、特に miRNA が注目されている。分泌型 miRNA は、エクソソームに内包されることにより組織中の安定した移動が可能となる。その発現プロファイルは由来細胞の種類や状態により異なるが、MSCs の創傷治癒能力への関与が示唆されている。しかし、エクソソームの MSCs の骨芽細胞分化への影響や骨再生医療への適用の可能性は未解明であり、これが本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

### 2. 研究の目的

MSCs から他の細胞への情報伝達機構としてのエクソソームの果たす役割を解明することである。BMSCs、DPSCs、SHED のエクソソームの機能を骨形成関連の機能に焦点を絞って比較検討する。

### 3. 研究の方法

(1) SHED を抜去乳歯歯髄、DPSCs を矯正歯科治療に伴う便宜抜去永久歯、BMSCs を CLP 患者における腸骨移植時の余剰骨髄組織から単離・培養し、stemness を確認するとともに、細胞表面フローサイトメーターを用い、幹細胞表面マーカーを検出する。幹細胞表面マーカーによって特徴づけられた SHED および DPSCs の細胞増殖や移動、形態変化等を評価する。さらに、SHED および DPSCs それぞれを骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化誘導し、各分化マーカーの発現を解析する。

(2) 幹細胞表面マーカーによって特徴づけられた SHED および DPSCs 由来エクソソームの骨再生に関連する培養細胞に対する作用を比較検討する。SHED および DPSCs の培養上清を遠心式限界ろ過フィルターで5倍濃縮後、Total Exosome Isolation Reagent を用い、SHED および DPSCs よりエクソソームを抽出した。走査型プローブ顕微鏡を用いて、表面性状を観察した。BCA プロテインアッセイを用いてエクソソームを定量した後、SHED および DPSCs 由来エクソソームを BMSCs に添加した。BMSCs の細胞増殖能について、培養開始より4日目において BrdU を用いて比較検討を行った。また、骨分化誘導を行った BMSCs に SHED および DPSCs 由来エクソソームをそれぞれ添加し、培養開始より21日目において、アリザリンレッド染色を用いて石灰化沈着の比較検討を行った。BMSCs 培養2日目において Total RNA を抽出し、BMP2, ALP, AKT1, MAPK1 の遺伝子発現について定量リアルタイム PCR 法による比較検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) MSCs のエクソソームが内包する miRNA は、MSCs の由来組織や分化段階等により発現プロファイルが変化し、分子生物学的特性に重要な影響を及ぼすと考えられる。そこで、SHED の確実な単離、培養のための詳細な検討を行った。その結果、乳歯歯髄から単離された細胞は、表面抗原によっていくつかのタイプに分類されることが明らかとなった。フローサイトメトリーによりソートされた細胞の特徴を検討した結果、CD146 陽性細胞には、特に骨形成に有利な条件が備わっていることが、骨代謝関連の遺伝子発現の解析などにより示唆された。骨再生に影響する因子として、血管内皮細胞へのシグナル伝達の関与が示唆された。すなわち、CD146 陽性細胞は、血管内皮細胞との相互作用により再生組織の血管新生を促進することが示唆され、骨再生に重要な役割を果たすと考えられた。

(2) 特徴的な SHED の機能発現のメカニズムの一つと推察されるエクソソームの解析を行った。SHED 培養上清からの SHED 由来エクソソームの分離条件を確立するとともに、その性質について検討した。その結果、SHED から産生されるエクソソームの分離条件を確立し、その解析ができるようになった。走査型プローブ顕微鏡を用いて表面性状および大きさを観察したところ、SHED 由来エクソソームの粒子径は 60-90 nm であった。また、SHED 由来エクソソームを培養液中に添加することにより骨髄由来 MSCs の石灰化能を亢進させることが明らかとなった。また、本作用は MAPK 経路を介していることが示唆された。

(3) SHED 由来エクソソームの特異的な機能を解明するために、永久歯歯髄由来の DPSCs からエクソソームを分離し、両者の機能的な差異を明らかにすることとした。その結果、SHED 由来エクソソーム群と DPSCs 由来エクソソーム群では、それぞれコントロール群と比較して有意

に細胞増殖能の亢進が認められたが、両者間に有意な差異は認められなかった。また、骨形成関連遺伝子発現の検討では、SHED 由来エクソソーム添加群と DPSCs 由来エクソソーム添加群における BMP2 および AKT1 遺伝子発現レベルは、コントロール群と比較して有意差は認められなかったが、MAPK1 および ALP の遺伝子発現レベルはコントロール群より有意に亢進した。しかしながら、SHED 由来エクソソーム添加群と DPSCs 由来エクソソーム添加群との間に有意差は認められなかった。アリザリンレッド染色による石灰化の比較では、SHED 由来エクソソーム添加群と DPSCs 由来エクソソーム添加群ではコントロール群と比較して石灰化沈着物の亢進が認められた。以上の結果から、SHED あるいは DPSCs 由来エクソソームは、PI3K/Akt シグナルではなく MAPK シグナルを活性化させることにより、細胞の増殖および分化能を亢進させる可能性が考えられた。

今後より詳細な比較検討を進めることにより、骨再生誘導に最適な機能を有するエクソソームを特定できると考えられる。

## 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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kunimatsu Ryo, Rikitake Kodai, Yoshimi Yuki, Putranti Nurul Aisyah Rizky, Hayashi Yoko, Tanimoto Kotaro	4. 巻 24
2. 論文標題 Bone Differentiation Ability of CD146-Positive Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4048 ~ 4048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24044048	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 Odo Ayaka, Kunimatsu Ryo, Abe Takaharu, Sakata Shuzo, Nakatani Ayaka, Rikitake Kodai, Koizumi Yuma, Tanabe Izumi, Okimura Naonobu, Yoshimi Yuki, Tanimoto Kotaro	4. 巻 158
2. 論文標題 Stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth-based media in a rat root resorption model	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105854 ~ 105854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2023.105854	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 Putranti NAR., Rikitake K., Hiraki T., Nakajima K., Abe T., Tsuka Y., Sakata S., Nakatani A., Nikawa H., Tanimoto K.	4. 巻 11(12)
2. 論文標題 Combination of carbonate apatite and stem cells from human deciduous teeth promotes bone regeneration by enhancing BMP2, VEGF, and CD31 expression in immunodeficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11121914	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 Kunimatsu R., Hiraki T., Rikitake K., Nakajima K., Putranti NAR., Abe T., Ando K., Nakatani A., Sakata S., Tanimoto K.	4. 巻 11(20)
2. 論文標題 Effects of Human Deciduous Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Conditioned Medium on the Metabolism of HUVECs, Osteoblasts, and BMSCs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11203222	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 Saskianti T., Nugraha AP., Prahasanti C., Ernawati DS., Tanimoto K., Riawan W., Kanawa M., Kawamoto T., Fujimoto K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Study of Alveolar Bone Remodeling Using Deciduous Tooth Stem Cells and Hydroxyapatite by Vascular Endothelial Growth Factor Enhancement and Inhibition of Matrix Metalloproteinase-8 Expression in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Cosmet Investig Dent.	6. 最初と最後の頁 71-78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CCIDE.S354153	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 該当する

1. 著者名 Rikitake K., Kunimatsu R., Yoshimi Y., Nakajima K., Hiraki T., Putranti NA., Tsuka Y., Abe T., Ando K., Hayashi Y., Nikawa H., Tanimoto K.	4. 巻 -
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 Dis.	6. 最初と最後の頁 -
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 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 國松 亮, 力武航大, 吉見友希, 阿部崇晴, 谷本幸太郎
2. 発表標題 乳歯歯髓由来間葉系幹細胞および炭酸アパタイト担体を用いた顎裂閉鎖を目指した基礎的研究
3. 学会等名 第47回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 力武航大, 國松亮, 吉見友希, 阿部崇晴, 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の骨分化能についての検討
3. 学会等名 第47回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國松亮, 平木智香, 力武航大, 坂田修三, 阿部崇晴, 安藤和代, 中谷文香, 谷本幸太郎
2. 発表標題 ヒト乳歯由来歯髄間葉系幹細胞の培養上清が骨芽細胞および骨髄由来間葉系幹細胞の代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023年

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, 谷本幸太郎
2. 発表標題 CD146 陽性乳歯歯髄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46回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

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, 谷本幸太郎
2. 発表標題 CD146 陽性乳歯歯髄由来間葉系幹細胞の骨分化能についての評価
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会 & 第9回日韓ジョイントシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Putranti NAR., 國松 亮, 力武航大, 平木智香, 吉見友希, 中島健吾, 柄 優至, 阿部崇晴, 坂田修三, 中谷文香, 二川浩樹, 谷本幸太郎
2. 発表標題 乳歯歯髄由来間葉系幹細胞および炭酸アパタイト担体を併用した骨再生治療への応用
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会 & 第9回日韓ジョイントシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部崇晴, 國松亮, 伊藤翔太, 坂田修三, 力武航大, Putranti NAR., 柴田梨央, 谷本幸太郎
2. 発表標題 歯髓由来間葉系幹細胞のエクソソームが骨髄由来間葉系幹細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第61回広島県歯科医学会・第106回広島大学歯学会例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Putranti NAR., 國松 亮, 力武航大, 平木智香, 吉見友希, 中島健吾, 柄 優至, 阿部崇晴, 坂田修三, 中谷文香, 二川浩樹, 谷本幸太郎
2. 発表標題 乳歯歯髓由来間葉系幹細胞および炭酸アパタイト担体を併用した骨再生治療への応用
3. 学会等名 第61回広島県歯科医学会・第106回広島大学歯学会例会
4. 発表年 2022年

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

〔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	吉子 裕二  (Yoshiko Yuji)  (20263709)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授   (15401)	



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	加藤 功一  (Kato Koichi)  (50283875)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授    (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