

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17099

研究課題名（和文）中高年者由来ヒト歯髄幹細胞を用いた新規歯槽骨再生療法の前臨床研究

研究課題名（英文）Preclinical study of a novel alveolar bone regeneration therapy using human dental pulp stem cells derived from elderly patients

研究代表者

佐藤 麻梨香（Sato, Marika）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：20814560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト歯髄幹細胞（DPSCs）の骨分化能に関するこれまでの報告は、若年者の抜去歯より得られたDPSCsに関するものが多く、中高年者由来のDPSCsによる報告は殆どない。我々はこれまでに、低分子化合物であるヘリオキサンチン誘導体（TH）を添加し骨芽細胞分化誘導した若年者由来DPSCsが高い骨分化能を有することを報告した。しかし、中高年者由来DPSCsに対するTHの効果は不明である。本研究では、特に骨再生療法の需要の高い中高年者のDPSCsを用いた歯槽骨再生法の確立・実用化を目指し、TH添加骨芽細胞分化誘導した中高年者由来DPSCsの骨分化能を若年者と比較検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が成功することで、少子高齢化に伴いこれまで以上に中高年層の歯槽骨欠損症例に対する骨造成法の需要が高まることが予想されるなか、より低侵襲で高効率な骨再生戦略の臨床応用が可能となることが予想される。

研究成果の概要（英文）：Human dental pulp stem cells (DPSCs) have high clonogenic and proliferative potential. We previously reported that a helioxanthin derivative (TH) enhances osteogenic differentiation of DPSCs derived from young patients. However, in the clinical field, elderly patients more frequently require bone regenerative therapy than young patients. In this study, we examined and compared the osteogenic differentiation potential of TH-induced DPSCs from elderly patients and young patients to explore the potential clinical use of DPSCs for elderly patients.

研究分野：再生療法

キーワード：歯髄幹細胞 骨分化

1. 研究開始当初の背景

慢性歯周炎や腫瘍切除後など、様々な原因で生ずる歯槽骨欠損症例(右図)に対して骨再生療法が注目を浴びている。これまでその治療法として骨髄間葉系幹細胞や人工多能性細胞であるヒトES細胞、iPS細胞の研究が進められてきたが、未だその安全性や分化効率の低さが問題点であるのが現状である。また、臨床においては若年者よりも中高年において高い確率で慢性歯周炎により歯槽骨欠損を障子、特に40代以降における中高年での歯槽骨再生療法の需要が高い。日常の臨床現場において破棄されることの多い抜去歯に着目し、簡便かつ低侵襲で高効率な骨再生療法の確立が可能となれば、骨再生法の新たな選択肢が拡がると考えた。この歯髄幹細胞については、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ている(Proc Natl Acad Sci USA.97:13625-1363,2000)。2003年に Miura ら、2014年に Patil らによって歯髄幹細胞が多分化能を有していることが示唆されている(Proc Natl Acad Sci USA.97:13625-1363,2000; Proc Natl Acad Sci USA 100:5807-5812, 2003; Exp Cell Res 320: 92-107 2014)。これまでに、若年者(～29歳)における骨分化誘導に関する報告はあるものの、中高年における骨分化能についての研究は無いのが現状である。そこで応募者は、中高年由来歯髄幹細胞を用いて、生理活性物質であるヘリオキサンチン誘導体 (TH) を添加し骨分化誘導することで高効率な骨分化誘導法の確立に成功した(Int J Mol Sci, 2020, in press)。

2. 研究の目的

これまでに応募者はマウス頭蓋骨欠損モデルにおいて中高年者由来ヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞による高効率な骨再生療法を確立した(Int J Mol Sci, 2020, in press)。しかし、移植細胞がどのように宿主側で作用したのかのMOAは分かっていない。さらには、大動物におけるヒト歯髄幹細胞の顎骨再生療法に向けた有効性の評価が不明である。そこで、大動物(免疫不全ミニブタ)における歯槽骨欠損モデルを作製し、中高年者由来歯髄幹細胞を骨芽細胞に分化誘導後(シート培養)に下記を検討する。

PKH26(生細胞トラッキング蛍光色素)を用いて歯槽骨欠損部に移植し、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検討する。

新生骨の有効性を若年者と比較して評価を行う。

3. 研究の方法

(1)中高年者由来ヒト歯髄幹細胞を用いたPKH26 蛍光染色の検討

in vivoでの移植実験向けに、in vitroにて中高年者由来ヒト歯髄幹細胞でのPKH26 蛍光染色の蛍光強度の維持能の検討を行う。応募者が確立した手法を用いて単離・培養し、TH添加骨芽細胞分化誘導培地にて骨芽細胞分化誘導した中高年由来ヒト歯髄幹細胞をPKH26 蛍光染色し、2週間の分化誘導後においても蛍光度が維持されていることを確認する。以上を検討することにより、2週間骨分化誘導した中高年由来ヒト歯髄幹細胞の移植時の生体内での細胞の局在・遊走性のモニタリングが可能とする。

(2)PKH26 蛍光染色を用いた中高年者ヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞シートの作製

本研究の目的でもある中高年由来歯髄幹細胞が宿主でどのように骨形成に作用したのかのMode of Action (MOA)を解明するための移植実験に向け、骨芽細胞シートを作製する。応募者の確立した方法にて、THを添加し、高効率に骨芽細胞分化誘導した中高年者由来ヒト歯髄幹細胞を温度応答性培養皿(Up Cell®)でシート状に培養する。この手法では室温への低温処理という細胞へのダメージが極めて少ない方法により細胞の接着分子や細胞外基質を保持したまま骨芽細胞をシート状に回収することが可能である。I.にて検証したPKH26の蛍光度が、2週間の骨芽細胞分化誘導した中高年者由来ヒト歯髄幹細胞シートでも維持されていることを確認する。

(3)免疫不全ミニブタの広範囲顎骨欠損モデルを用いた中高年者ヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞シートの新骨の形成能および生体内での評価

中高年者ヒト歯髄幹細胞由来骨芽細胞シートを免疫不全ミニブタの歯槽骨欠損モデルに移植し、新生骨の形成を確認・評価する。まず超音波切削器具(PIEZOSURGERY®)を用いてブタの臼歯部に歯槽骨欠損モデルを作製する。PKH26 蛍光染色にてマーキングした(A)若年者由来 TH添加骨芽細胞分化誘導骨芽細胞群、(B)中高年者由来 TH添加骨芽細胞分化誘導骨芽細胞群、それぞれの細胞シートを移植し、移植後2,4,6,8週にて次の項目を両群にて比較・評価する。画像評価としてμ-CTによる3次元画像解析を行う。移植細胞の遊走能について、組織切片にてPKH26の発現を評価し後の組織学的評価へと繋げる。組織学的評価として、H-EとAlcian blueの二重染色、Masson Trichrome、ALP染色を行う。I型コラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチンなどの骨基質タンパク質とRunx2、Osterixなどの転写因子の免疫染色、骨形成サイトカインおよびRunx2、SP7などの転写因子の発現をin situ hybridizationにて確認する。

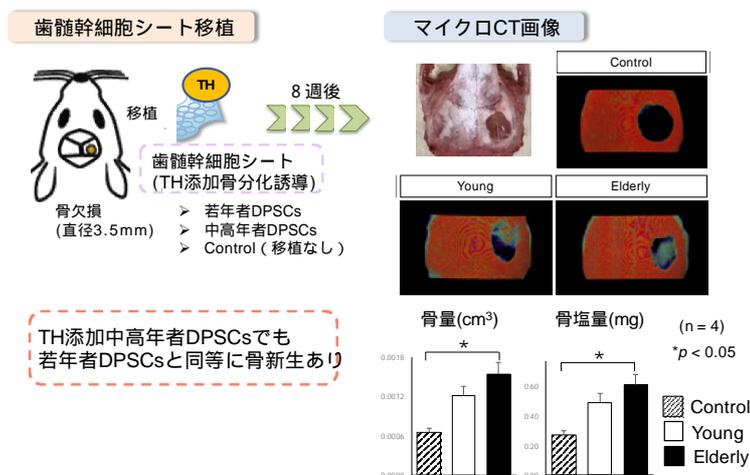
4. 研究成果

若年者群、中高年者群での P1, P2, P3 での細胞数の平均を比較したところ、P1 では中高年者群の増殖能が有意に低かったものの、P2 以降では若年者群と中高年者群での増殖能に差は認めなかった。P2 における 24、48、72 時間毎の細胞増殖試験でも両群での増殖率の差は認めなかった。このことから、一度パッセージし幹細胞性を有した歯髄幹細胞の増殖能は中高年者群でも若年者同等に高く、その増殖能は P3 でも維持されることが示唆された。また、幹細胞の性質が継代により影響を受けるか否かを評価するために、各年齢群の P1, P3 の歯髄幹細胞を用いて、幹細胞マーカーである NANOG の発現、細胞老化の指標であるテロメア長を評価したところ、両群で NANOG 発現を確認し、それらに有意差は認めなかった。また、テロメア長でも差を認めなかった。

各年齢群での TH による歯髄幹細胞の骨分化能を評価したところ、骨分化誘導 14 日でのアリザリンレッド染色では中高年者群でも若年者群同様に TH による石灰化能が亢進している傾向を確認した。ALP 染色でも両群共に TH による ALP 活性の上昇を認め、骨分化マーカーのコラーゲンタイプ 1、ALP、オステオカルシン、runx2 の骨分化マーカーの発現は若年者、中高年者群共に TH 添加群での発現上昇の傾向を認めた。

骨芽細胞の分化に特に重要な転写因子である Runx2 の発現の有無を蛍光抗体法にて評価したところ、両年齢群において Runx2 陽性細胞の増加を確認した。蛍光強度解析においても両年齢群で TH 添加群での有意な上昇を認めた。以上より、TH は若年者のみならず中高年者由来ヒト歯髄幹細胞でも高効率な骨分化を誘導することが示唆された。

歯髄幹細胞を TH 添加骨分化誘導培地にて 2 週間培養し細胞シートを作成後、6 週～8 週齢のマウス頭蓋骨に作成した 3.5 mm 径の骨欠損部に移植し、移植後 8 週での骨形成能を評価した。μCT 画像にて、両年齢群共に、コントロールと比較して骨欠損部位に明らかな不透過像の形成を認めた。組織形態測定評価では、中高年由来歯髄幹細胞でも若年者と同等な骨量、骨塩量の上昇を認めた。以上より、TH 添加ヒト歯髄幹細胞シート移植は、年齢に関係なく生体内で骨新生を可能とすることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------