

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17168

研究課題名（和文）顎顔面領域に存在する神経堤由来幹細胞による顎裂部骨移植術の開発

研究課題名（英文）Development of bone grafting using neural crest-derived stem cells in the maxillofacial region

研究代表者

吉田 寛 (Yoshida, Hiroshi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20823074

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）：本研究では、マウス頭蓋骨へ人工的に骨欠損を作成し、欠損部へ神経堤由来細胞を含んだ担体を埋入し、12週間の経過観察を行った。神経堤由来細胞を含んだ担体をマウス頭蓋骨へ移植することによって、神経堤由来細胞を含まない担体をマウス頭蓋骨へ移植するよりも修復された骨が既存の骨と類似した性質を持つことを明らかにした。新たな条件設定を検討すべく、臨床的知見から手術法による顎骨への影響を検討したところ、ヒトが対象ではあるものの手術法によって顎骨への影響はほとんど認められないことを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、頭蓋顎顔面に多量に存在する神経堤由来細胞を用いた骨誘導法を確立することで、唇顎口蓋裂患者への顎裂部骨移植術の開発を行うことを目的としている。本研究に用いる神経堤由来細胞の採取組織は、口唇口蓋裂治療の一連の流れの中で破棄される下鼻甲介から採取することができ、また細胞の十分な量の増殖も期待できる。

頭蓋顎顔面由来の神経堤由来細胞は、低侵襲かつ安全、豊富に採取でき、顎顔面の大半を構成する組織幹細胞群であり、患者自身から採取するため倫理的問題や免疫拒絶反応を回避できる点から、実現可能かつ理想的な細胞ソースと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Bone defects were artificially created in mouse skulls, and carriers containing neural crest-derived cells were implanted in the defects and followed for 12 weeks. The results showed that the repaired bone had more similar characteristics to the existing bone when the neural crest-derived cell carriers were implanted into mouse skulls than when the carriers without neural crest-derived cells were implanted into the skulls of mice. For the purpose of reexamining the experimental technique, we examined the effect of the surgical method on the jawbone and reported that the surgical method had little effect on the jawbone, though this is a clinical finding in human subjects.

研究分野：矯正歯科

キーワード：神経堤由来細胞 骨移植 骨再生 顎顔面発育 バイオリサイクル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂によって分断された歯列の連続性を獲得するため、就学前後に顎裂部への自家骨移植術が実施される。申請者らのグループは今までに、マウスの神経堤由来細胞が成体の体内各所に未分化な状態で潜伏し頭蓋顎顔面で高密度に局在すること、成体から採取した神経堤由来細胞は骨芽細胞様細胞に誘導できることを報告した。一方で唇顎口蓋裂患者において、肥大や下垂した鼻甲介は鼻閉の原因でしばしば切除されている。本研究課題は、顎裂部骨移植術の新たな基盤技術を作り出すため、唇顎口蓋裂患者の鼻甲介を含む頭蓋顎顔面領域に存在する神経堤由来細胞を利用した、自家骨移植術の代替となり得る骨組織誘導法に着目した。

2. 研究の目的

本研究の学術的独自性は、「頭蓋顎顔面の神経堤由来細胞による骨芽細胞誘導」、「頭蓋顎顔面の神経堤由来細胞による誘導骨組織形成」、「誘導骨組織の物理化学的特性(骨質)の解析」、「口蓋裂モデル動物への神経堤由来細胞移植」の4つが挙げられる。顎裂部骨移植術に頭蓋顎顔面領域の神経堤由来細胞を想定した骨誘導研究はこれまでに報告が無く、本研究に用いる神経堤由来細胞の採取組織は、口唇口蓋裂治療の一連の流れの中で破棄される下鼻甲介から採取することができる。顎裂部骨移植に用いられるドナーは腸骨が主流であるが、幼児期もしくは学童期の患者負担を考慮すると、より低侵襲かつ十分量の骨組織を確保する新規移植技術の開発が求められており、本研究はその一端を担う研究になり得ると考えられる。本研究の目的は、神経堤由来細胞を用いた骨再生を確立することで、唇顎口蓋裂患者への顎裂部骨移植術の開発を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

1) 鼻甲介神経堤由来細胞の骨芽細胞分化誘導の最適条件を見出す: 神経堤由来細胞で緑色蛍光タンパク質(GFP)が恒常的に発現する P0-Cre/CAG-CAT-EGFP マウス(8週齢以降:成体)の鼻甲介から細胞を採取・単離する。DMEM/F-12 に bFGF と EGF 含有幹細胞培地(無血清培地)で細胞を増殖させた後に、骨芽細胞分化誘導培地で誘導した。細胞分化はアルカリホスファターゼ活性染色、アリザリンレッド染色と、Runx2、Osterix などの遺伝子発現から評価した。

2) 種々のスキャフォールド(担体)を用いて高効率な誘導骨組織の形成条件を決定した: 先行研究で、アテロコラーゲンスポンジ(以下担体)に増殖した神経堤由来細胞を注入した担体を、骨欠損モデルマウスに移植して骨組織を観察すると、移植した神経堤由来細胞が修復骨中に定着することを見出した。

3) 神経堤由来細胞を含む誘導骨組織において特異的に発現する遺伝子を検索する: 神経堤由来細胞を含む誘導骨は、担体のみ比べて既存の骨に近いリン酸基のピーク比が認められた。この結果から、神経堤由来細胞を移植することによって、ハイドロキシアパタイトが既存の骨に近い比率で存在している可能性を示唆した。この原因を解明するため、神経堤由来細胞存在下、非存在下でそれぞれの誘導骨組織から RNA を抽出し、Runx2 や Osterix などの代表的な骨芽細胞関連遺伝子の発現量の比較を検討した。さらに神経堤由来細胞存在下、非存在下で誘導された骨組織を採取し、DNA マイクロアレイ法で比較することを検討した。

4) DNA マイクロアレイ法で抽出した遺伝子を解析する: 神経堤由来細胞が存在することでリン酸基のピークが既存の骨に近似する現象を遺伝学的、分子生物学的に解析可能となり、抽出した候補遺伝子の役割を解析するため、マイクロアレイ法を用いて、siRNA などの遺伝子発現制御実験を1)の神経堤由来細胞の培養系に応用し、分化に及ぼす影響を予定した。

5) 口蓋裂モデルマウスへ鼻甲介の神経堤由来細胞を移植した後の骨誘導能を評価する: 研究の最終目標である顎裂骨移植を想定した、神経堤由来細胞混入のアテロコラーゲンスポンジを口蓋裂モデル動物に移植しその有用性を計画した。口蓋裂モデル動物は口蓋への人為的骨欠損作成を計画する。正中口蓋縫合を跨ぐように自然治癒しない円形の骨欠損を口蓋に作り、神経堤由来細胞混入のアテロコラーゲンスポンジ、あるいはスポンジのみを移植することを予定した。

4. 研究成果

術後 12 週間で、頭蓋骨欠損部で骨様組織の誘導に成功し、その化学的性質と物理学的性質について着目し既存の骨と比較した。CT 所見では、頭蓋骨欠損部にはわずかな不透過像がみられ、欠損部が部分的に修復された(図1)。

A

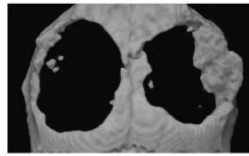


図 1

B

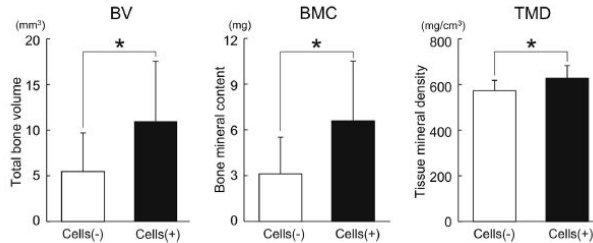


図 1 CT による Volume 解析

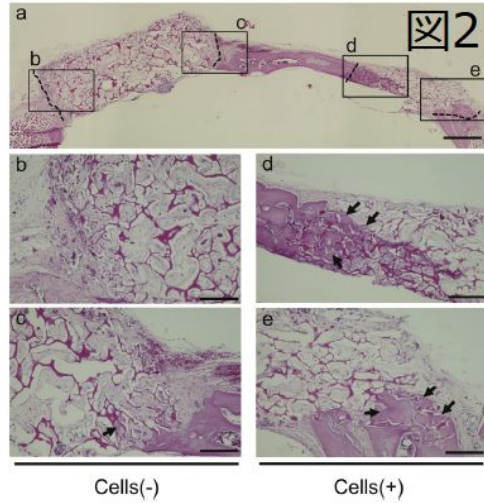


図 2

図 2 組織学的所見

組織学的所見として、神経堤由来細胞が埋め込まれたマウスでは、欠損端から再生している断片的な骨組織が検出され、神経堤由来細胞のないグループの欠損領域では、大量のアテロコラーゲン足場を伴う線維組織のみが残っていた（図 2）。部分的に再生された骨様硬組織をラマン分光法で解析すると、神経堤由来細胞を含むグループでは、既存の骨に近いスペクトル特性を示した。加えて、アミド III 基とリン酸基の割合で示すことで、神経堤由来細胞を含む担体グループで再生した頭蓋骨は、神経堤由来細胞を含まない担体グループで再生した頭蓋骨よりも有意に成熟度が高いことが示唆された（図 3）。

以上のことから、神経堤由来細胞を含んだ担体をマウス頭蓋骨へ移植することによって、神経堤由来細胞を含まない担体をマウス頭蓋骨へ移植するよりも修復された骨が既存の骨と類似した性質を持つことを明らかにした。本研究において、頭蓋皮膚の縫合は極めて重要であり、癒痕の形態によって影響を受ける可能性について予備実験を行った。結果的に、ヒトが対象ではあったものの、手術の切開状態によって顎骨の成長に影響がないことが示唆され、個々のポテンシャルや口腔内の環境が大きく影響する可能性があることを報告した。

図 3

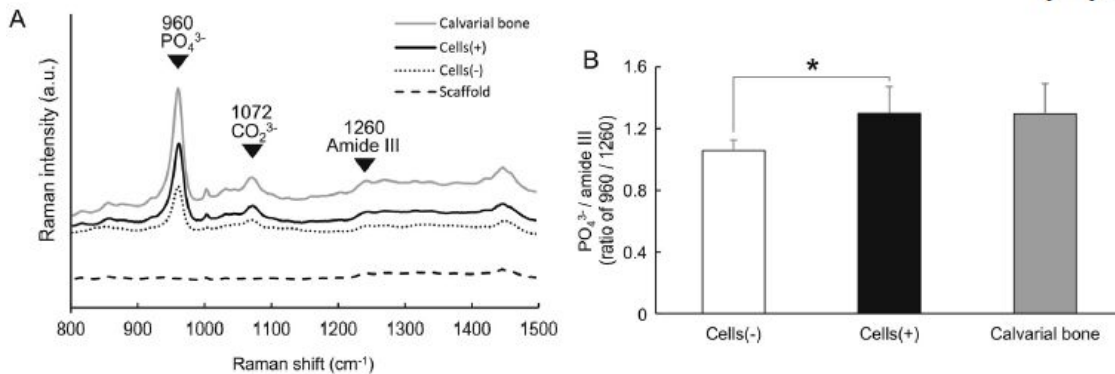


図 3 ラマン分光法解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida Hiroshi, Suzawa Tetsuo, Shibata Yo, Takahashi Masahiro, Kawai Ryota, Takami Masamichi, Maki Koutaro, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 554
2. 論文標題 Neural crest-derived cells in nasal conchae of adult mice contribute to bone regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 173 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.079	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Yoshida Hiroshi, Takahashi Masahiro, Yamaguchi Tetsutaro, Takizawa Hideomi, Takakaze Momoko, Maki Koutaro	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Comparison of Maxillofacial Morphology Between Modified Furlow's and Modified two-Flap Palatoplasty in Orofacial Clefts During the Primary Dentition Period	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Cleft Palate-Craniofacial Journal	6. 最初と最後の頁 1.05567E+14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/10556656221104374	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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
---------	---------