

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17186

研究課題名（和文）乳歯歯髄由来間葉系幹細胞エクソソームを応用した低侵襲性顎裂部閉鎖治療の確立

研究課題名（英文）Establishment of minimally invasive bone regeneration for cleft lip and palate using mesenchymal stem cell exosomes derived from deciduous dental pulp

研究代表者

阿部 崇晴（Abe, Takaharu）

広島大学・病院（歯）・助教

研究者番号：20806682

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：乳歯歯髄より単離培養した間葉系幹細胞(MSC)の培養上清から抽出したエクソソームをSHED-EXs、永久歯歯髄より単離したMSCの培養上清から単離したエクソソームをDPSC-EXsとし、実験に用いた。骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)およびヒト骨芽細胞(HCO)にSHED-ExoおよびDPSC-EXsを添加することにより、細胞数の増加が認められた。また、骨分化誘導したBMSCおよびHCOにSHED-EXsおよびDPSC-EXsを添加し、アリザリンレッド染色により定量評価を行った結果、エクソソームの添加により、骨分化の亢進が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱落あるいは便宜的に抜去する乳歯あるいは永久歯より、採取される歯髄は、従来行われてきた腸骨より採取する骨髄を用いるよりも低侵襲である。また、その培養上清より抽出した、エクソソームの骨形成への関与について解明した点において、本研究の学術的意義は高い。miRNAおよび細胞増殖、ALPやMAPKを介して、骨形成を促進させることを明らかにした。今後さらに、エクソソームを臨床応用し患者の負担が軽減され、低侵襲で良好な骨再生療法を確立する、社会的観点から重要な意義がある。

研究成果の概要（英文）：Exosomes extracted from the culture supernatant of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated and cultured from the dental pulp of deciduous teeth were called SHED-EXs, and exosomes isolated from the culture supernatant of MSCs isolated from the pulp of permanent teeth were called DPSC-EXs. It was used for. An increase in cell number was observed by adding SHED-Exo and DPSC-EXs to bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and human osteoblasts (HCO). Furthermore, when SHED-EXs and DPSC-EXs were added to BMSCs and HCOs that had been induced to undergo osteogenic differentiation, and quantitative evaluation was performed using alizarin red staining, it was found that the addition of exosomes enhanced osteogenic differentiation.

研究分野：矯正歯科

キーワード：エクソソーム 培養上清 SHED DPSC HCEM 骨再生 miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂(CLP)は、頭蓋顎顔面領域において最も高い発症率を示す先天性疾患である。顎裂を有する患者において、顎裂部への腸骨海綿骨移植が広く行われている。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は患者にとって大きな負担となり、腸骨採取後の疼痛や歩行障害などの問題が伴う。腸骨採取に伴う侵襲を低減しながら骨再生を達成する方法として、これまで我々は BMSC、SHED の移植により、骨の再生を確認している。近年、MSC が分泌する生理活性物質のパラクライン作用が注目され、幹細胞の培養上清 (MSC-CM) の組織再生誘導作用が報告されている。そこで、SHED-CM が骨再生に及ぼす影響について検討を重ねてきた。SHED-CM 移植は、優れた血管新生能と骨再生作用を有していることを解明した。また、SHED-CM に含まれるタンパク質の定量解析を行った。SHED-CM は血管新生因子、骨代謝因子、神経栄養因子などが多く含有している事も明らかとなった。近年、MSC-CM の液性因子として、細胞外小胞 (エクソソーム) の役割が報告されている。エクソソームについて、注目が集まっており、心筋梗塞の改善や骨格筋の修復など、再生医療分野において多くの有効性が報告されている。本研究で用いる SHED のエクソソームに関する報告は少なく、エクソソームの含有する microRNA や mRNA、タンパク質が組織再生に深く関与することが推察されるものの、詳細な作用機序は明らかにされておらず、未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、SHED より抽出したエクソソームを用い、生理活性作用および骨再生におけるメカニズムについて調べることで、移植に最適な環境について検討し、さらなる良好な骨再生を試みる。それを CLP 患者に応用し、低侵襲かつ良好な骨再生療法を確立することを最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

#### [実験 1] SHED-EXs および DPSC-EXs の抽出および成分の比較

乳歯および永久歯から SHED および DPSC を単離する。各 MSC-CM より Total Exosome Isolation 試薬を用いて各 MSC-EXs を精製する。得られたサンプルがエクソソームであることを確認するため、Western Blotting にて CD9 および CD81 のタンパク発現の確認を行った。また、走査型プローブ顕微鏡 (SEM; SPM-9700HT) にてその表面性状および粒径の計測を行った。3D-Gene<sup>®</sup>マイクロ RNA チップ (東レ) にて、miRNA 発現について網羅的にクラスター解析を行った。

[実験 2] BMSC および HCO に対して各 MSC-EXs 抽出成分が細胞増殖・基質代謝能に及ぼす影響  
各 EXs を骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) およびヒト骨芽細胞 (HCO) に添加し、細胞増殖能および骨分化能について検討する。細胞増殖能については BrdU を用いて、検討を行った。骨分化能については、60%コンフルエントになった時点で、骨分化メディウムに交換し、3 日おきにメディウムを交換した。Alizarin 染色を行い、定量評価を行った。

#### [実験 3] SHED-EXs および DPSC-EXs の有効成分の解明

BMSCs および HCO が 80%コンフルエントになった時点で各 EXs を添加し、その変化について 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。

また、蛍光イメージャー (Odyssey<sup>®</sup>) と western blot ゲル転写装置 (iBlot<sup>®</sup> 2Gel Transfer Device) およびプロセッシング装置 (iBind) を用い western blot 解析によりエクソソームマーカーについて検証する。更に、ELISA にて ALP のタンパク発現について調査を行った。

### 4. 研究成果

Western Blotting にて CD9 および CD81 のバンドを確認した (Fig 1a)。SEM にて粒径の計測を行ったところ、40-90 nm の大きさであった (Fig 1b)。これらのことより、抽出された粒子がエクソソームであることを確認した。

#### Exosome surface properties (SEM)

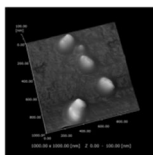
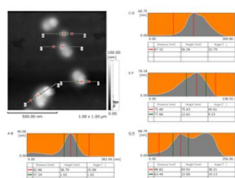


Fig 1a



#### Identification of exosomes by Western Blot

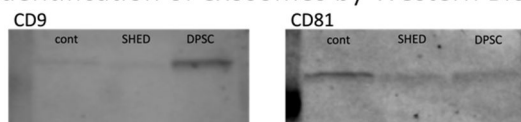


Fig 1b

また、3D-Gene®マイクロRNAチップによる網羅的miRNAの解析を行った結果、Metascapeによる濃縮分析では、「miRNAによる遺伝子サイレンシング」、「アミロイド前駆体タンパク質合成プロセスの調節」、「血管関連平滑筋細胞移動の調節」、「前立腺癌シグナル伝達経路のmiRNA調節」および「遺伝子」経路を示した。これらの中で、「miRNAによる遺伝子サイレンシング」経路が87%と最も濃縮されていた(図1c)。経路プロセス濃縮分析において重要性の高い遺伝子は、相互ネットワークを形成した(図1d)。「血管関連平滑筋細胞移動の調節」経路には、miR448、miR451A、miR638、およびmiR665が含まれていた。2倍以上変化したmiRNA発現に基づくクラスタリング分析を図1eに示す。SHED-Exoでは、miR4454、miR1260b、miR7977、miR7975、miR6765-3p、miR375-5p、およびmiR-1260aの遺伝子発現が、DPSC-ExoおよびBMSC-Exoの2倍以上アップレギュレートされた。DPSC-Exoでは、miR1246、miR6895-5p、miR4486、miR4429、miR1290、miR4732-5pおよびmiR6778-5pの遺伝子発現が、SHED-ExoおよびBMSC-Exoの2倍以上アップレギュレートされた。

(c) Enriched terms across input gene lists, colored by p-values.



(d) Pathway and Process Enrichment Analysis

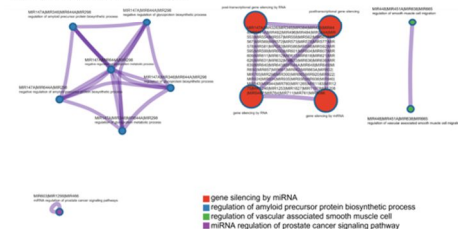


Fig 1 c,d

(e) Hierarchical Entity Tree on No. Report

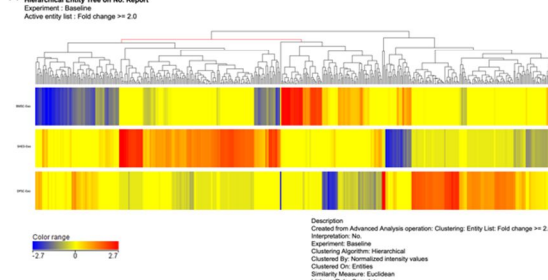


Fig 1 e

BMSCに各EXsを添加することにより、コントロールと比較して有意に細胞が増加した(Fig2a)。HCOに対して各EXsを添加することにより、25 μg/mlまで濃度依存性に細胞増殖能が増加することが明らかとなった(Fig2b)。

Evaluation of cell proliferation ability using BrdU

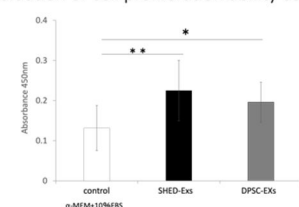


Fig 2a

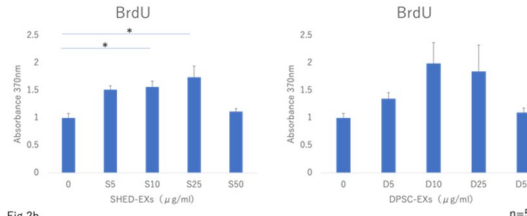


Fig 2b

また、アリザリンレッド染色により、SHED-EXsおよびDPSC-EXs添加群において濃染され、骨分化誘導の亢進が認められた。HCOにDPSC-EXsを添加した群では有意な濃染は認められなかった。

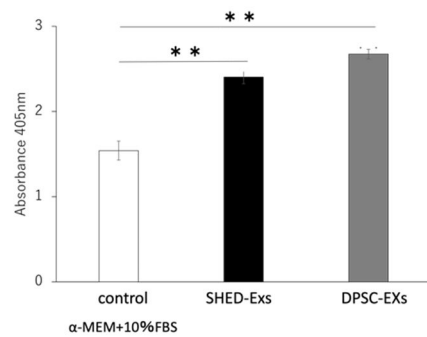


Fig 2c

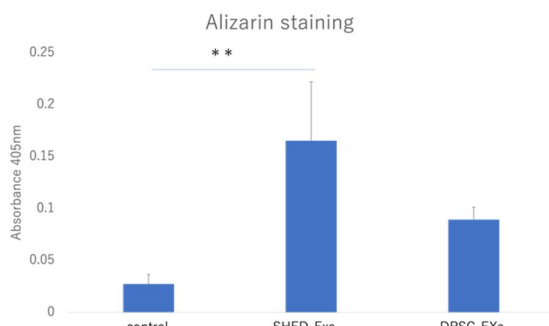


Fig 2d

BMSCにSHED-EXsおよびDPSC-EXsを添加し、遺伝子発現解析をおこなった結果、BMP2, Akt1の3群間で有意差は認められなかった。ALP, MAPK1の遺伝子発現量はコントロール群と比較してSHED-EXsおよびDPSC-EXs群の方が有意に高かった。

## Gene expression evaluation by PCR

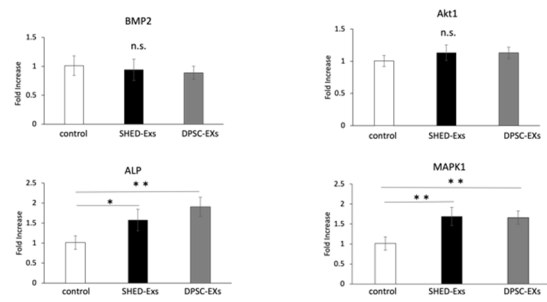


Fig 3a

HCO に SHED-EXs および DPSC-EXs を添加した群において ALP の明らかなバンドの発現が認められた。また、ELISA にて ALP のタンパク発現を確認した結果、SHED-EXs 添加により、有意な上昇が認められた。

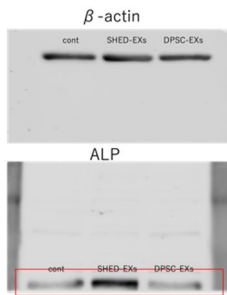


Fig 3b

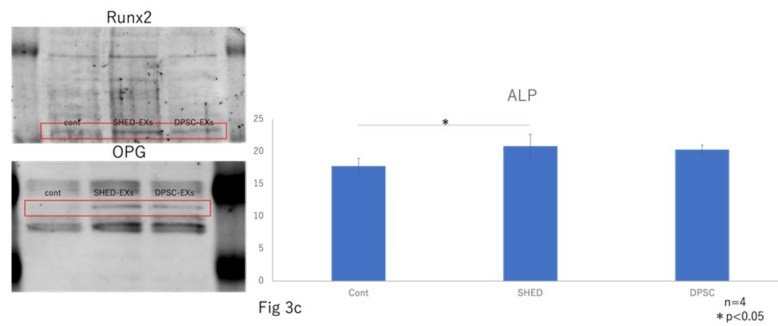


Fig 3c

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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>Putranti Nurul Aisyah Rizky, Kunimatsu Ryo, Rikitake Kodai, Hiraki Tomoka, Nakajima Kengo, Abe Takaharu, Tsuka Yuji, Sakata Shuzo, Nakatani Ayaka, Nikawa Hiroki, Tanimoto Kotaro  | 4. 巻<br>11                |
| 2. 論文標題<br>Combination of Carbonate Hydroxyapatite and Stem Cells from Human Deciduous Teeth Promotes Bone Regeneration by Enhancing BMP-2, VEGF and CD31 Expression in Immunodeficient Mice | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Cells  | 6. 最初と最後の頁<br>1914 ~ 1914 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cells11121914  | 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>-                 |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Rikitake Kodai, Kunimatsu Ryo, Yoshimi Yuki, Nakajima Kengo, Hiraki Tomoka, Aisyah Rizky Putranti Nurul, Tsuka Yuji, Abe Takaharu, Ando Kazuyo, Hayashi Yoko, Nikawa Hiroki, Tanimoto Kotaro | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Effect of CD146 SHED on bone regeneration in a mouse calvaria defect model  | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Oral Diseases  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/odi.14020  | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>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<br>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<br>第46回日本口蓋裂学会総会・学術集会   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>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<br>歯髄由来間葉系幹細胞のエクソソームが歯髄由来間葉系幹細胞に及ぼす影響                      |
| 3. 学会等名<br>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<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>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<br>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<br>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  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>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<br>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<br>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<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takaharu Abe   |
| 2. 発表標題<br>Stem cell-based therapy for patients with cleft lip and palate |
| 3. 学会等名<br>The 6th Join Scientific Meeting in Dentistry (招待講演)            |
| 4. 発表年<br>2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|