

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17229

研究課題名（和文）乳歯歯髄幹細胞培養上清・エクソソームの骨誘導機序の解明と口蓋裂骨再生治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of bone regeneration mechanism of SHED-CM and exosomes on bone regeneration and clinical application for cleft palate bone regeneration treatment

研究代表者

平木 智香（HIRAKI, TOMOKA）

広島大学・医系科学研究科（歯）・研究員

研究者番号：70881275

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、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞（SHED）とSHEDの培養上清（SHED-CM）の優れた組織再生能に着目した。SHED-CM移植が骨再生に及ぼす影響、SHED-CM中の骨再生に有用な液性因子の解明およびエクソソーム成分について探索した。SHEDとSHED-CM移植は、骨再生作用を有していることを明らかにした。SHED-CM中に含まれる液性因子について解明した。さらに、骨芽細胞および骨髄由来間葉系幹細胞にSHED-CMを添加したところ、細胞増殖能および骨形成関連因子の発現を亢進することを解明した。以上より、骨再生を誘導する手段としてSHED-CMの有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、間葉系幹細胞が分泌するサイトカインのパラクライン作用が注目され、幹細胞培養上清を用いた組織再生が報告されているものの、その作用機序については不明な点が多い。本研究では、SHED-CMに含有される液性成分について解析し、移植を行うことで良好な骨再生を生じることを明らかとした。また、骨芽細胞等に対して、SHED-CM添加は、細胞増殖能や骨形成能を亢進させることを解明した。今回得られた研究結果によって、低侵襲で良好な骨再生療法を確立することで、患者の負担を軽減できることは、社会的観点から重要な社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the bone regeneration potential of deciduous dental pulp-derived mesenchymal stem cells (SHED) and SHED culture supernatant (SHED-CM). The effect of SHED-CM transplantation on bone regeneration was examined. In addition, to elucidating the humoral factors that are valuable for bone regeneration during SHED-CM, exosomal components of SHED-CM contained within SHED-CM were explored. It was revealed that SHED and SHED-CM transplantation had the bone regeneration.

We elucidated the humoral factors contained in SHED-CM. Furthermore, we elucidated that adding SHED-CM to osteoblasts and bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced cell proliferative capacity and the expression of osteogenesis-related factors. These findings indicate the potential benefits of SHED-CM in bone tissue regeneration.

研究分野：骨再生

キーワード：SHED 間葉系幹細胞 骨再生 培養上清

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 (cleft lip and palate 以下; CLP) は、胎生期における顔面の癒合不全に起因する顎裂を特徴とする、複数の遺伝子要因と環境因子から発症する多因子疾患である。日本人における発症率は、0.19% であり、頭頸部に生じる先天性疾患では最も多い。CLP を有する患者の顎裂部に対して、自家腸骨海綿骨移植が広く行われている。骨架橋の確立や歯槽堤の形成、鼻口腔瘻の完全閉鎖などを目的として、ほとんどの症例において同部への腸骨移植が学齢期に行われる。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は患者の大きな負担となり、長期入院の必要性や腸骨採取後の疼痛とそれに伴う歩行障害など、種々の問題が伴う。我々の研究グループでは、これまでにビーグル犬顎裂モデルで骨髄由来 MSCs (BMSCs) による顎裂部の骨再生を確立し、再生骨への歯の移動が可能であることを明らかにした。しかしながら、骨髄液の採取には骨髄穿刺が必要であるため、患者の負担を十分に低減できるとは言えない。そのため、細胞の単離に生体侵襲をほとんど伴わない乳歯歯髄由来 MSCs (stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED) に着目した。SHED は、ヒト BMSCs (hBMSCs) と比較して、高い細胞増殖能を有し、骨再生治療に有効であることが示唆されている。さらに、SHED は通常は廃棄する脱落乳歯を用いることにより、hBMSCs と比較して容易に入手できるため、有用性が高い。我々の研究グループでは、SHED に着目し検討を重ねてきた。頭蓋骨欠損免疫不全マウスを用いて、SHED、ヒト歯髄由来 MSCs (hDPSCs) および hBMSCs の骨再生能を検討し、SHED と hDPSCs は、hBMSCs と同程度の骨再生性能を有していることが明らかとなった。この結果より、SHED は顎裂部骨再生治療に有用となり得る可能性が示された。

近年、再生医療分野において、間葉系幹細胞が分泌するサイトカインのパラクライン作用が注目され、幹細胞培養上清を用いた組織再生が報告されている。しかしながら、幹細胞の培養上清に含まれる液性因子やエクソソームが、どの様に骨再生に関与しているのか、詳細な骨再生機構は未だ不明である。また、SHED および SHED-CM が骨再生誘導に影響を及ぼす可能性が推察されるものの、培養上清中には様々な物質が含まれており、骨再生に有効な成分の詳細については未だ不明である。

以上の背景より、本研究では、SHED-CM 移植が骨再生に及ぼす影響について検討を行った。SHED-CM 中の骨再生に有用な液性因子を解明するとともに、SHED-CM 内に含まれる SHED-CM のエクソソーム成分について探索することで、SHED-CM を応用した新規の顎裂部骨再生治療法の確立を目指すことを研究の最終的な目的とし、研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞 (SHED) と SHED の培養上清 (SHED-CM) の優れた組織再生能に着目し、SHED-CM 移植が骨再生に及ぼす影響について検討を行う。そして、SHED-CM 中の骨再生に有用な液性因子を解明するとともに、SHED-CM 内に含まれる SHED-CM のエクソソーム成分について探索することとした。

### 3. 研究の方法

本研究は、研究期間内に、以下の研究計画を行った。

実験1では、SHED-CMが生体内における骨再生能を比較・検討した。

実験2では、歯髄間葉系幹細胞培養上清中の液性因子の検討とともに有効成分の解明を行った。

実験3では、SHED-CMが様々な細胞における細胞増殖・基質代謝能に及ぼす影響について、*in vitro*の検討を行った。

#### 実験1 SHED-CM抽出成分が生体内における骨再生に及ぼす影響の解明

免疫不全マウス (BALB/c-nu) に対して、全身麻酔下でトレフィンバーを用いて、頭蓋冠に骨欠損を作製し、これを骨欠損モデルとした。骨欠損部に、SHED、SHED-CM、 $\alpha$ -MEMを浸潤させたアテロコラーゲン担体を骨欠損部に移植した。マイクロCTを用いて、骨再生・修復の経日的変化について、三次元的に解析を行った。組織学的解析として、組織切片を作製し、HE染色・Masson's trichrome (MT) 染色にて、新生骨を評価した。骨代謝関連因子、および血管新生関連因子 (VEGF、CD31 など) の免疫組織化学染色法を用いて評価した。

#### 実験2 歯髄間葉系幹細胞培養上清中の液性因子の検討および有効成分の解明

ヒト乳歯およびヒト永久歯からSHEDおよびDPSCsを単離・培養した。ヒト由来BMSCsは、購入した細胞株 (Lonza社) を用いた。通法に準じて、各MSCsを培養した後、各MSCs-CMを精製した。Magneric Luminex assayを用いて、上清中に含有するタンパク質について網羅的定量解析を行った。そして、SHED-CMの骨再生有効成分の検討を行った。そして、MSCs-CMからエクソソームを抽出し、3D gene解析を行った。

#### 実験3 SHED-CMが各種細胞における細胞増殖・基質代謝能に及ぼす影響の解明

実験には、ヒト由来血管内皮細胞株 (HUVEC)、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 (MT3T3-E1)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSCs) を用いた。各細胞を培養し、SHED-CM抽出成分を添加し、細胞増殖能について検討を行った。基質形成能の検討では、各細胞を培養し、SHED-CMを添加した後、骨代謝因子および血管新生マーカーの発現について、定量PCRを用いた遺伝子解析、western blot解析、およびELISAによる評価を行った。実験2で解明された液性因子について、抗中和抗体を添加し、細胞増殖能および骨形成能を検証することで、有効な上清成分の液性因子を確定させるため検証を行った。

### 4. 研究成果

#### 実験1 SHED-CM抽出成分が生体内における骨再生に及ぼす影響の解明

骨再生・骨修復の経日的変化について、マイクロCTを用いて、三次元的に解析を行った。骨欠損を形成しアテロコラーゲンを移植した直後のマイクロCT画像では、各群で欠損部の大きさに差異は認められなかった。移植4週間および8週間において、SHED群、SHED-CM群では、明らかな骨欠損部の縮小と、骨欠損中心部に再生骨が認められた。一方、対照群では、骨欠損部のわずかな縮小と、少量の再生骨が認められた。再生骨体積は、移植4週間では、SHED-CM群の再生骨体積は、SHED群および対照群の再生骨体積よりも有意に大きな値を示した。移植8週間では、SHED-CM群の再生骨体積は、SHED群および対照群の再生骨体積よりも有意に大きく、SHED群の再生骨体積は、対照群の再生骨体積よりも有意に大きな値を示した。組織学的解析と

して、組織切片を作製し、HE 染色・MT 染色にて、新生骨を評価した。HE 染色により、SHED-CM 群および SHED 群で、再生骨が観察された。MT 染色では、成熟骨の面積率では、SHED-CM 群は、SHED 群、対照群と比較して有意に大きな値を示した。SHED 群は対照群と比較して有意に大きな値を示した。コラーゲン線維および類骨の面積率では、SHED 群は、SHED-CM 群、対照群と比較して有意に大きく、SHED-CM 群は対照群と比較して、有意に大きな値を示した。VEGF-A 免疫組織化学染色における検討では、血管、再生骨付近に多く染色が観察された。SHED-CM 群および SHED 群は、対照群より有意に高い VEGF-A 染色が認められた。CD31 免疫組織化学染色による検討を行い、血管数を計測した結果、SHED-CM 群および SHED 群は、対照群と比較して有意に多く血管が存在することが明らかとなった。

### 実験 2 歯髄間葉系幹細胞培養上清中の液性因子の検討および有効成分の解明

ヒト乳歯およびヒト永久歯から SHED および DPSCs を単離・培養し、各 MSCs-CM を精製した。その後、Magneric Luminex assay を用いて、上清中に含有するタンパク質について網羅的定量解析を得た。その結果、SHED-CM、DPSCs-CM には、血管新生に影響を与える M-CSF、MCP-1、ANG、bFGF、HGF、VEGF-C、および VEGF-A、骨代謝関連マーカーである OPG、OPN、BMP-2、および BMP-4 が両培養上清中に多く含まれていた。また、SHED-CM には、BDNF、 $\beta$ -NGF、GDNF、NT-3 などの神経栄養因子が含まれていることが確認された。そして、SHED-CM と hBMSCs-CM のタンパク質発現様相に異なりが認められた。さらに、SHED-CM から SHED エクソソームの抽出を行い、SHED エクソソーム と BMSCs エクソソームに含有する miRNA の発現について、3D gene 解析を行ったところ、miRNA の発現様相が異なることを解明した。

### 実験 3 SHED-CM が各種細胞における細胞増殖・基質代謝能に及ぼす影響の解明

HUVEC および MC3T3-E1 を培養し、SHED-CM を添加し、細胞増殖能について、MTS assay および BrdU assay を用いて検討を行った。その結果、SHED-CM 群は非添加群と比較して、有意な細胞増殖能の亢進が認められた。各細胞の骨代謝因子および血管新生マーカーの発現レベルについて、定量 PCR を用いた遺伝子解析および western blot 解析を行った。hBMSCs に SHED-CM を添加した結果、VEGF、Ang 1、Ang2、HGF、ALP、Runx2、OCN の遺伝子発現は有意に亢進された。MC3T3-E1 においても同様に、ALP、Runx2、OCN の遺伝子発現に有意な亢進が認められた。

以上の結果より、SHED-CM の生体への移植により骨再生が促進されることが明らかとなった。また、骨芽細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、および臍帯静脈内皮細胞の細胞増殖能や基質形成能に大きな影響を及ぼすことが示された。そして、SHED-CM 中には、脳神経栄養因子 (BDNF)、骨誘導タンパク質 (BMP-2, 4)、破骨細胞分化抑制因子(OPG)、血管新生因子 (VEGF)、単球走化性促進因子 (MCP-1) などが含まれていることを解明した。さらに、SHED-CM と hBMSCs-CM のタンパク質発現様相に異なりが認められ、SHED エクソソーム と BMSCs エクソソームに含有する miRNA の発現様相が異なることが明らかとなった。

乳歯歯髄由来間葉系幹細胞の培養上清を応用した骨再生治療への有効性が強く示唆された。

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 Ryo Kunimatsu, Tomoka Hiraki, Kodai Rikitake, Kengo Nakajima, Nurul Aisyah Rizky Putranti, Takaharu Abe, Kazuyo Ando, Ayaka Nakatani, Shuzo Sakata, Kotaro Tanimoto	4. 巻 11
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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(新潟)
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------