

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24792245

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来細胞による唇顎口蓋裂患者の顎裂治療

研究課題名(英文) Alveolar cleft osteoplasty using stem cells from human exfoliated deciduous teeth

## 研究代表者

柳生 貴裕 (Yagyu, Takahiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00555550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラット骨髄間葉系幹細胞を用いた予備実験にて、細胞シート工学を応用した細胞移植方法は骨再生医療における有用な治療法となることを確認した。本手法をヒト乳歯由来歯髄幹細胞に応用したところ、in vitroにて良好な骨形成を示した。顎骨欠損モデルを用いた移植実験においても治療効果は限定的ではあったが、骨形成を確認できた。細胞シート工学を応用したヒト乳歯由来歯髄幹細胞による顎骨再生の可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：The pilot study revealed that a method based on cell sheet technology in which rat bone marrow-derived stromal cells were cultured and formed into a cell sheet structure could repair critical bone defects. We applied this method to stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) and found that cell sheets prepared from SHEDs had osteogenic capacity in vitro. Next, we adopted a rat mandibular bone defect model and examined them. Although the therapeutic effect was limited, we confirmed their osteogenic capacity in vivo as well. We gained a clue for developing new approach using cell sheet technology and SHEDs towards achieving maxillofacial regeneration.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄由来幹細胞 細胞シート

### 1. 研究開始当初の背景

口唇裂口蓋裂とは、唇や顎骨などの形成が不十分なため、亀裂が生じて生まれてくる先天異常である。日本における発生頻度は約500人に1人で、最も発生頻度の高い先天奇形であり、その半数は顎裂を伴っている。顎裂は歯牙の生える場所である歯槽部の骨欠損であり、歯列の乱れのみではなく、口唇や外鼻の変形を来すため、歯槽骨の再建手術(顎裂治療)が必要である。一般的には永久歯の萌出のため、乳歯が自然脱落する9歳頃に顎裂部へ腸骨からの自家骨移植が行われる。しかし、子供にとって健常部からの自家骨採取は侵襲が大きく、顎裂治療の問題点となっており、自家骨採取の必要がない新たな顎裂治療法の開発が望まれている。

近年では、細胞治療の研究が各分野で行われている。骨髄間葉系幹細胞(骨髄MSC)においては、培養により骨形成が認められたことから、骨欠損の治療における骨髄MSCによる培養骨を使用した研究は、ヒト臨床で既に進められている(Kawate K, et al. Artif Organs. 2006)。一方で、歯髄組織中の間葉系幹細胞にも硬組織形成能が認められているため、様々な基礎研究が行われている(Yagyu T, et al. Arch Oral Biol. 2010)。特に、自然脱落する乳歯由来の歯髄間葉系幹細胞(乳歯MSC)は、無侵襲で手に入る組織幹細胞である。そのため、乳歯MSCによる顎裂治療が確立することができれば、自家骨採取を必要としない新たな顎裂治療法となる。

### 2. 研究の目的

近年では、自家骨移植に代替する方法としてMSCを利用した生体組織工学が注目されている。骨髄からMSCを単離し、生体外で骨芽細胞に分化増殖させ、人工骨と複合化することで得られる培養骨は、骨欠損に対する治療として、ヒト臨床において広く応用されている。

また、分化させた骨芽細胞を、多量の細胞外マトリックスと共にシート状に採取し移植する方法が開発され(Nakano K, et al. Plast Reconstr Surg. 2016)、整形外科領域で応用が始まっている。そこで我々は、自然脱落し、本来ならば破棄される乳歯MSCを生体組織工学を応用することにより、低侵襲な顎裂治療が行えるのではないかと考えた。

本研究の目的は、ラットを使用して、ヒト乳歯MSCによる顎裂部移植の有効性を検証することである。そして、自家骨採取を必要としない顎裂治療法の確立を目標としている。

### 3. 研究の方法

#### (1)ラット骨髄MSCを使用した予備実験

顎裂治療は、成長期に行われる。治療後も上顎骨の成長することや歯列矯正を行う必要があることより、人工骨を使用した培養骨

移植を顎裂治療に用いるより、人工骨を使用しない(スキャホールドフリー)細胞移植法を用いることとした。そこで、まず予備実験として、ラット骨髄MSCから骨芽細胞に分化させた細胞シート(骨形成細胞シート)を作製し、「ラット先天性顎裂モデル」における移植実験を行った。

動物はFischer344ラットを使用した。ラット骨髄MSCを採取し増殖させ、10nMデキサメタゾン、0.28mMアスコルビン酸添加培地で培養し、骨形成細胞シートを作製した。骨形成細胞シートのALP活性値、DNA量を生化学的に計測するとともに、組織切片を作製し、H-E染色および免疫組織化学染色(collagen 1, osteopontin, osteocalcin)を行い、骨形成能をin vitroで評価した。

また、作製した骨形成細胞シートを塊状に折りたたみ、同系ラットによる「先天性顎裂モデル」に移植した。移植後8週目で顎骨を摘出し、X線学的および組織学的に、in vivo評価を行った。

#### (2)ヒト乳歯MSCによる骨形成細胞シートの作製

骨形成能の高いヒト乳歯MSCによる骨形成細胞シートを作製するため、以下の項目を検討することで骨形成細胞シートの作製条件の設定を行った。ヒト乳歯MSCの播種密度、培養期間、添加因子(デキサメタゾン、アスコルビン酸)の濃度。

#### (3)ヒト乳歯MSCによる骨形成細胞シートを使用した移植実験

レシピエントとして使用する免疫不全動物は、F344/N Jcl-rnu/rnuとした。前検討で決定した条件でヒト乳歯MSCから骨形成細胞シートを作製し、「先天性顎裂モデル」に移植を行った。移植後8週目で顎骨を摘出し、X線学的、組織学的に評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)ラット骨髄MSCによる予備実験

##### in vitro 評価

ラット骨髄MSCを採取し増殖させ、添加因子(10nMデキサメタゾン、82μg/mLアスコルビン酸)を加えた培地で14日間培養し、コンフルエントとなった後、セルスクレーパーを使用して細胞を周囲より剥がし、シート状に採取した(骨形成細胞シート)。添加因子なしで培養したMSCをコントロール群とし、骨形成細胞シートの骨芽細胞分化能について評価を行った。経時的なDNA量とALP活性値を比較した結果、いずれの時期においても細胞シート群が有意に高い骨形成能を示していた(図1)。

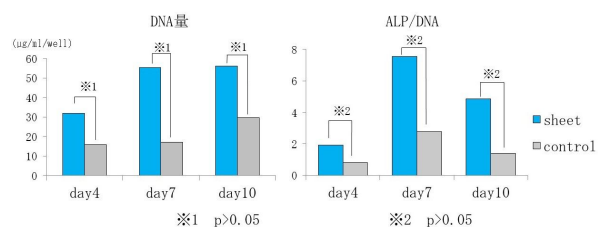


図1 経時的なDNA量とALP活性値

骨形成細胞シートをパラフィン包埋して組織切片を作製し、H-E 染色および免疫組織化学染色 (collagen 1、osteopontin、osteocalcin) を行った (図 2)。H-E 染色では骨形成細胞シート中に 2~3 層に重なった細胞が認められ、その周囲に結合組織を認めた。免疫組織化学染色ではすべてにおいて陽性を示し、骨形成細胞シートには骨芽細胞と骨タンパクが豊富に含まれていることが示された。

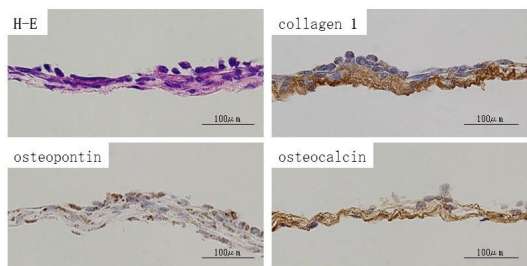


図2 H-E染色および免疫組織化学染色

#### in vivo 評価

ラット骨髄 MSC から作製した骨形成細胞シートを同系ラットによる「先天性顎裂モデル」に移植し、移植後 8 週目で顎骨を摘出して評価を行った (図 3)。

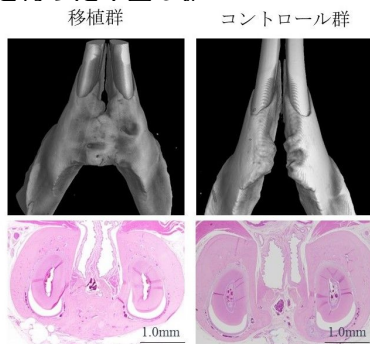


図3 ラット骨髄MSC細胞シート移植後X線学的および組織学的評価

Micro-CT 像および組織像ともに、骨形成細胞シート移植群では下顎骨正中部に骨形成を認め、左右の下顎骨が架橋されていた。一方で手術操作のみのコントロール群では骨形成は認めなかった。

#### (2) ヒト乳歯 MSC による骨形成細胞シートの作製

過去の報告をもとに、ヒト乳歯 MSC の播種密度を設定し、また、継時的な ALP 活性値の計測を行ったところ、細胞の播種密度は  $0.25 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養期間は 10 日の群で最も高い骨形成能が認められた。また、デキサメタゾン濃度は 50nM、アスコルビン酸濃度は 20.5µg/mL で最も高い骨形成が認められた。

#### (3) ヒト乳歯 MSC による骨形成細胞シートを使用した移植実験

Micro-CT 像、組織像 (図 4) では、移植部位に一致して少量の硬組織が左右の顎骨間で認められたものの、ラット骨髄 MSC を使用した実験でみられたような豊富な骨形成は

みられなかった。顎骨欠損モデルを用いた移植実験において、治療効果は限定的ではあったが、ヒト乳歯 MSC の骨形成能を確認できた。細胞シート工学を応用したヒト乳歯 MSC による顎骨再生の可能性を見出すことができた。

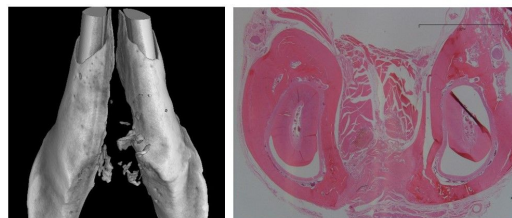


図4 ヒト乳歯MSC細胞シート移植後X線学的および組織学的評価

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

— Yagyuu T, Kirita T, Hattori K, Tadokoro M, Ohgushi H, Unique and reliable rat model for the assessment of cell therapy: bone union in the rat mandibular symphysis using bone marrow stromal cells, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 査読有、9 巻、2015、276-285  
DOI: 10.1002/term.1674

[学会発表](計 9 件)

今田光彦、柳生貴裕、上山善弘、前田雅彦、桐田忠昭、顎顔面領域の骨欠損に対する骨形成細胞シート移植による骨形成能の検討、日本再生医療学会、2016 年 3 月 18 日、「大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)」

上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、今田光彦、桐田忠昭、骨移植材料の in vivo での新たな骨形成評価 ラット下顎骨正中部への移植、バイオマテリアル学会、2015 年 11 月 9 日、「京都テルサ (京都府・京都市)」

今田光彦、柳生貴裕、上山善弘、前田雅彦、桐田忠昭、ラット DPSC (Dental Pulp Stem Cells) を用いた骨再生の検討、日本口腔外科学会、2015 年 10 月 17 日、「名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)」

柳生貴裕、上山善弘、前田雅彦、今田光彦、桐田忠昭、Osteogenesis of osteogenic matrix cell sheets in rat non-healing mandibular defect model、12th National Conference on Oral Maxillofacial Surgery in Conjunction with 1st China-Japan joint Conference on Oral Maxillofacial Surgery、2015年9月26日、「上海(中華人民共和国)」上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、今田光彦、桐田忠昭、顎顔面領域での骨欠損における骨形成細胞シートの有用性と骨化様式の検討、日本口腔科学会、2015年5月14日、「大阪国際会議場(大阪府・大阪市)」

上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、今田光彦、桐田忠昭、骨形成細胞シート移植における顎骨領域の骨形成能の検討、日本再生医療学会、2015年3月21日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、桐田忠昭、Osteogenic potential of the osteogenic matrix cell sheet in maxillofacial regeneration、AAOMS 96th annual meeting、2014年9月13日、「ホノルル(ハワイ)」

上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、桐田忠昭、顎顔面領域における細胞シートによる骨再生の検討、日本再生医療学会、2014年3月4日、「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

上山善弘、柳生貴裕、前田雅彦、桐田忠昭、顎顔面領域での新たな骨再生：骨芽細胞シートの有用性の検証、日本口腔外科学会、2013年10月12日、「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柳生 貴裕 (YAGYUU, Takahiro)  
奈良県立医科大学・口腔外科学講座・助教  
研究者番号：00555550

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

桐田 忠昭 (KIRITA, Tadaaki)  
奈良県立医科大学・口腔外科学講座・教授  
研究者番号：70201465

前田 雅彦 (MAEDA, Masashiko)  
南奈良総合医療センター・口腔外科・医長  
研究者番号：80453166

##### (4) 研究協力者

上山 善弘 (UEYAMA, Yoshihiro)  
今田 光彦 (IMADA, Mitsuhiro)