

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

今西 悠華

論文題目

歯髄幹細胞由来 extracellular vesicles の
骨組織再生における有効性について

I. 緒言

疾病や外傷などによって損傷を受けた組織・臓器の機能を回復する治療法としては、損傷部位に細胞・組織を移植する再生医療が注目され、研究・臨床応用が進んでいる。間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSCs) は、再生医療への応用が期待される細胞の一つで、免疫調節作用、障害された組織への集積性、組織再生に有効な液性因子であるサイトカイン、細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) 等の産生能が認められ、様々な疾患を対象に臨床研究が進められている。歯科領域においては、顎骨、歯周組織、歯髄組織の損傷に対して骨髄、脂肪、歯髄等を由来とする MSCs を用いた臨床研究が進められている。MSCs の治療効果の一因には、MSCs が放出する液性因子の一部である EVs が免疫調節作用や組織再生作用に重要な役割を担っていることが最近の研究から明らかとなっている。EVs は、核酸、タンパク質、脂質を内包しており、レシピエント細胞内へ取り込まれることで作用することから、EVs を組織再生への治療に応用することは MSCs を用いた治療効果を促進させるものとして期待されている。

近年、歯髄から分離される MSCs は、歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells: DPSCs) として再生医療の分野では研究が行われている。さらに、DPSCs から分泌される歯髄幹細胞由来細胞外小胞 (dental pulp stem cells-derived extracellular vesicles: DPSC-EVs) は、骨欠損の疾患に有効性を示すと報告されている。しかし、骨髄や脂肪組織に由来する MSCs からの EVs と比較

して報告が少なく、その特性等について未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、DPSC-EVs が DPSCs の骨組織再生促進効果の一因であるとの仮説を立て、DPSC-EVs の骨組織再生への有効性を明らかにするために、ラット頭頂骨欠損モデルを構築して、骨組織形成能について検討した。

II. 実験材料および方法

1. DPSCsの分離および培養

DPSCsは6週齢雄性Sprague-Dawley (SD) ラット下顎中切歯より採取した歯髓組織に、トリプシンコラゲナーゼを用いて酵素処理を行い、分離、培養した。位相差顕微鏡により紡錘形のDPSCsを確認した。実験には第3-6継代のDPSCsを使用した。本実験は、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認を受けて実施している。(承認番号AGUD437-2)

2. DPSCsの同定

フローサイトメトリーを用いて、DPSCs の表面抗原解析を行った。脂肪・骨分化誘導を行い、脂肪分化を oil red O 染色および FABP-4 染色により、骨分化を ALP 染色および osteocalcin 蛍光免疫染色により確認した。

3. DPSC-EVsの抽出

DPSC-EVs は、DPSCs を無血清培地にて 48 時間培養した上清に対して 0.5

倍量の Total Exosome Isolation Reagent を添加し、遠心分離を行い、抽出した。

4. DPSC-EVs の同定

DPSC-EVs の形態を透過型電子顕微鏡を用いて観察し、DPSC-EVs に含まれるタンパク質を Western blot 法により検出した。

5. ラット頭頂骨欠損部への DPSC-EVs 投与および DPSCs 移植の方法

11 週齢雄性 SD ラットの頭頂骨両側に直径 4.6 mm の骨欠損部を形成し、右側を移植側、左側を対照側とした。移植側には、足場材料として collagen (Col)、 β -tricalcium phosphate (β -TCP)、hydroxyapatite (HA) を移植後、DPSC-EVs (0.0615 μ g/ μ l) を投与または DPSCs (1 x 10⁶ 個/ml) を移植とした。対照側には、生理食塩水の投与もしくは Col、 β -TCP または HA の移植とした。

6. マイクロ CT による形態計測と定量分析

ラット頭頂骨欠損部の移植側に DPSC-EVs/足場材料、および DPSCs/足場材料を移植し、対照側に生理食塩水を投与または足場材料を単体で移植した。術後 4 週に、マイクロ CT を用いてラット頭頂骨欠損部の断層撮影を行った。構築した三次元画像から TRI/3DBONE ソフトウェアを使用して不透過

像領域の体積を算出した。

7. ラット頭頂骨欠損部の組織観察

ラット頭頂骨欠損部の移植側に DPSC-EVs/足場材料を移植し、対照側に生理食塩水を投与または足場材料を単体で移植した。術後 16 週に、ラット頭頂骨に対し、川本の方法を参考に凍結切片を作製した。切片は hematoxylin-eosin (HE) 染色、酵素抗体法による Osteocalcin 免疫染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

8. 統計処理

各データの処理は一元配置分散分析を使用し比較検討した。有意水準は 5% とした。

III. 結果

1. DPSCs の同定

DPSCs における表面抗原の発現は、幹細胞マーカーである CD29、CD49d および CD90 に対して陽性であり、造血幹細胞マーカーである CD34 および CD45 に対して陰性を示した。

また、oil red O 染色および FABP-4 免疫染色において DPSCs の脂肪分化が認められ、ALP 染色および osteocalcin 免疫染色において DPSCs の骨分化が認

められた。

2. DPSC-EVs の同定

透過型電子顕微鏡を用いた観察により、DPSC-EVs が直径約 100 nm の円形の形態を示すことを認めた。

Western blot 法を用いて、CD9 および α -tubulin の発現が認められた。

3. マイクロCTによる形態計測および定量分析

術後 4 週に硬組織形成の観察を行った。移植側において、DPSC-EVs/Co1 および DPSCs/Co1 は骨欠損部辺縁および骨欠損内部に不透過像を認めた。

DPSC-EVs/ β -TCP、DPSC-EVs/HA、DPSCs/ β -TCP および DPSCs/HA は、骨欠損内部に顆粒状の不透過像、骨欠損部辺縁に不透過像を認めた。

対照側については、生理食塩水および Co1 単体移植において骨欠損部辺縁に不透過像を認めた。 β -TCP 単体移植および HA 単体移植は骨欠損内部に顆粒状の不透過像、骨欠損部辺縁に不透過像を認めた。

マイクロ CT における不透過像の定量分析より、DPSCs/Co1 および DPSC-EVs/Co1 において新たに形成された不透過像体積は、生理食塩水と比較し、有意に増加した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。DPSC-EVs/Co1 は DPSCs/Co1 との比較において、有意差を認めなかった。DPSC-EVs/Co1 と Co1 単体との間には有意差は認められないものの、不透過像体積の増加が確認された。

4. ラット頭頂骨欠損部の組織観察

術後16週にHE染色を行い、組織の観察を行った。移植側においては、DPSC-EVs/Col1は骨欠損部辺縁および骨欠損内部に新生骨の形成を認めた。DPSC-EVs/ β -TCPは、 β -TCP顆粒の吸収および骨欠損部辺縁に新生骨を認めた。DPSC-EVs/HAは、骨欠損内部にHA顆粒および骨欠損部辺縁に新生骨を認めた。

対照側については、Col1単体移植では骨辺縁部とその周囲に新生骨の形成を認めた。 β -TCP単体移植では β -TCP顆粒の吸収および骨欠損部辺縁部に新生骨を認めた。HA単体移植では骨欠損内部にHA顆粒および骨欠損部辺縁部に新生骨を認めた。生理食塩水では線維性結合組織の形成を認めた。炎症反応はどの群においても観察されなかった。

術後16週にOsteocalcin免疫染色を行った。DPSC-EVs/Col1では骨欠損部辺縁および骨欠損内部に新生骨の形成を認めた。Col1単体移植では骨欠損部辺縁とその周囲において新生骨の形成を認めた。 β -TCP単体移植およびHA単体移植においては、骨欠損部辺縁に新生骨の形成を認めた。生理食塩水では骨欠損内部において新生骨の形成は認められなかった。

IV. 考察

本研究では、DPSCsの骨組織形成作用の一因にはDPSC-EVsが関与していることが明らかとなった。術後4週のマイクロCTおよび定量解析の結果か

ら、DPSC-EVs/Col は骨欠損部位において DPSCs/Col と同等の効果が認められ、DPSC-EVs の有効性が示唆された。

また、マイクロ CT による三次元構築画像および HE 染色組織像では、DPSC-EVs に Col、 β -TCP、HA を組み合わせた全ての移植において、ラット頭頂骨欠損部に新生骨の形成を認めた。DPSC-EVs/Col 移植においては骨欠損部の内部においても新生骨が認められ、DPSC-EVs と Col を併用することで、Col が DPSC-EVs の作用を持続させ、骨欠損部周囲の幹細胞の生着を促し、 β -TCP および HA には認められなかった骨欠損内部からの骨組織再生を促進したと考えられる。

今後、DPSC-EVs の詳細な作用機序については、組織学的分析と *in vitro* 実験系による細胞内シグナル伝達系の分析により明らかとなるものと考えている。

V. 結論

術後4週のマイクロCTおよび定量解析の結果から、DPSC-EVs/Colは骨欠損部位においてDPSCs/Colと同等の効果が認められた。また、術後16週の組織観察より、DPSC-EVs/Colは足場材料であるCol単体移植と比較して新生骨の形成が認められた。これらの結果より、DPSCsの骨組織形成作用の一因にはDPSC-EVsが関与していることを示すものであり、DPSC-EVsを応用した骨組織再生治療への有効性が示唆された。