The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト歯髄幹細胞を用いた棒状三次元細胞集合体の創製
Author(s)	伊藤, 善博
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61658
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　伊藤　善博　）	
論文題名	ヒト歯髄幹細胞を用いた棒状三次元細胞集合体の創製

論文内容の要旨

【研究目的】

歯髄は、象牙質という硬組織に囲まれた特殊な環境下に存在する結合組織を主とする器官であり、歯の感覚や恒常性の維持、象牙質の修復など様々な役割を担っている。現在、重度のう蝕や外傷などにより歯髄壊死や不可逆性歯髄炎に陥った歯に対しては、通常、根管内の歯髄を取り除き、シーラーとガッタパーチャで充填することによって生体内外の交通を遮断する処置が行われている。こういった抜髄処置を含めた根管治療は、近年の器材や材料の発展により、一定の成功率を示しているものの、抜髄処置が施された歯では、歯髄が有する生体防御機構が失われ、う蝕や根尖性歯周炎の発症リスクが増加し、最終的に抜歯に至るケースも歯科臨床の場で散見される。

このような背景から、近年、無髄となった歯に歯髄を再生させる治療法に注目が集まっている。なかでも、活性分子、幹細胞、スキャフォールドを組み合わせて根管内に適用する、組織工学的手法を用いた歯髄再生技術への関心が高く、多くの研究が行われている。しかしながら、外因性物質であるスキャフォールドを移植体として利用することについては、細菌感染リスクの上昇や、それ自体が組織再生を阻害してしまう場合があるといった問題点が指摘されている。

ところで、過去の研究により、温度応答性高分子 Poly N-isopropylacrylamide（pNIPAAm）ゲルを用いて幹細胞を培養することにより、任意の形状や大きさを有するスキャフォールドフリーの三次元細胞集合体の作製が可能であることが示されている。したがって、この技術を応用すれば、象牙質形成能等の自己組織化能を有する歯髄様組織を *in vitro* で構築することが可能となり、これを無髄歯の根管内に移植することによって、スキャフォールド使用の問題を回避した全く新たな歯髄再生医療技術が実現できるのではないかと着想した。そこで本研究では、移植用歯髄様組織の *in vitro* 構築に向け、まず、ヒト歯髄幹細胞（Human Dental Pulp Stem Cells : hDPSCs）を用いた棒状三次元細胞集合体の作製と培養技術の確立を試み、さらに、*in vitro* および *in vivo* において、作製した棒状細胞集合体の歯髄再生用材料としての機能評価を行って、スキャフォールドフリーでの新規歯髄再生療法の実現の可能性について検討することを目的とした。

【材料および方法】

Ⅰ．棒状三次元細胞集合体の作製

1. pNIPAAm ゲルモールドの設計と作製

コンピューターデザインソフト（Solid works 2011）を用いて鋳型の設計を行い、3D プリンタ（EDEN260）にて樹脂製の鋳型を造形した。この鋳型に pNIPAAm ゲルを流し込んで 4℃で 8 時間静置し、12 mm×3 mm、最大深さ 3 mm の半円柱状のモールドを作製した。

2. hDPSCs 由来棒状三次元細胞集合体の作製

hDPSCs を、20%FBS 添加 DMEM（増殖培地）を用いてコンフルエントになるまで培養した後、

1）Trypsin/EDTA 溶液で細胞を回収して pNIPAAm ゲルモールドに流し込む

2）セルスクレーパーを用いて細胞をシート状に回収し、pNIPAAm ゲルモールドに填入

の二通りの方法で 2 日間培養し、棒状細胞集合体の作製を試みた。

Ⅱ.棒状三次元細胞集合体の構造と機能評価

1. 棒状三次元細胞集合体の長期培養

細胞集合体の培養には、象牙芽細胞分化誘導培地を用いた。pNIPAAm ゲルモールドから取り出した直後の棒状細胞集合体を培養 0 日目として、最長 20 日間まで培養し、実体顕微鏡観察により経時的な大きさの変化を評価した。なお、増殖培地で培養を行ったものをコントロールとした。

2. 棒状三次元細胞集合体の内部構造観察

モールドから取り出した直後を 0 日目とし、最長 20 日間まで培養を行った細胞集合体について、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行って内部構造を観察した。また、Live/Dead 染色により集合体内部の細胞の生死を確認した。

3. 棒状三次元細胞集合体の自己組織化能の評価

象牙芽細胞分化誘導培地を用いて、細胞集合体を最長 20 日間まで培養し、免疫蛍光染色により Dentin sialophosphoprotein（DSPP）の局在を、また von Kossa 染色により石灰化基質の形成を評価した。さらに、細胞集合体外層と内層での *Dspp* と *Nanog* の mRNA 発現量を、リアルタイム PCR 法によって定量評価した。

Ⅲ. 歯髄再生材料としての *in vivo* での評価

ヒト抜去上顎中切歯から歯根を切り出し、根管を#80 まで拡大した後、モールドから取り出した 0 日目の棒状細胞集合体を填入して、6 週齢免疫不全マウスの背部皮下に埋入した。6 週間後に試料を取り出し、パラフィン包埋薄切切片を作製して HE 染色を行うとともに、DSPP、STRO-1、CD31 の免疫蛍光染色により、根管内の組織の状態を評価した。なお、根管内に細胞集合体を填入していない試料を埋入したものをコントロールとした。

【結果および考察】

Ⅰ. 棒状三次元細胞集合体の作製

Trypsin/EDTA 溶液で回収した hDPSCs を播種する方法では、モールドから取り出すと細胞が容易に分散し、集合体は得られなかった。一方、シート状に回収した細胞をモールドに填入して培養した場合は、棒状集合体の作製が可能であった。hDPSCs は比較的脆弱な細胞間接着構造を形成すると考えられ、後者の方法では、豊富な細胞外基質（ECM）を維持でき、細胞－基質間接着を誘導できたため、集合体の作製が可能となったと考えられた。

Ⅱ. 棒状三次元細胞集合体の構造と機能評価

1. 棒状三次元細胞集合体の長期培養

培養 1 日目では集合体の大きさがわずかに減少したが、分化誘導培地で培養した場合は、hDPSCs による ECM の産生が促進されて集合体の強度が維持されるため、その後は大きさと形状に変化は認められなかった。一方、コントロール群では、培養 1 日目以降も細胞集合体の大きさが小さくなる結果となった。

2. 棒状三次元細胞集合体の内部構造観察

HE 染色の結果、集合体内部は細胞のみから構成されており、栄養と酸素供給の豊富な辺縁部では増殖が促進されて密な細胞集団が形成されていることが分かった。また、Live/Dead 染色の結果、20 日間の培養期間を通して、細胞集合体を構成する内部の hDPSCs のほとんどが生存していることが明らかとなった。

3. 棒状三次元細胞集合体の自己組織化能の評価

免疫蛍光染色の結果、培養 5 日目において細胞集合体の外層に DSPP の発現が認められ、また、培養 10 日後には、von Kossa 染色により、集合体外層で石灰化基質の沈着が観察された。*Dspp* の mRNA 発現は細胞集合体の外層に存在する hDPSCs に多く、一方、*Nanog* は集合体中心部の細胞に多く発現していた。これらの結果は、hDPSCs が集合体外層で象牙芽細胞に分化し、中心部では幹細胞性を維持していることを示しており、細胞集合体が自己組織化能を有していることが確認された。

Ⅲ. 歯髄再生材料としての *in vivo* での評価

HE 染色で、コントロール群では根管内に組織は存在しなかったが、細胞集合体を移植した群では、充実性組織の定着と根尖部からの組織の侵入が認められた。また、移植した組織内に血管形成が見られたことから、細胞集合体が歯髄様組織を形成したものと考えられた。さらに、根管壁象牙質に近接する細胞集合体部分では DSPP が強く発現し、根管中央部の組織では STRO-1 と CD31 の強い発現が認められた。これらの所見は、集合体由来の細胞が象牙質と近接した部分で象牙芽細胞へと分化しつつ、内部では幹細胞性を維持し、さらに組織内で血管形成を誘導したことを示しており、移植した細胞集合体が *in vivo* でも自己組織化機能を維持していることが確認された。

【結論】

本研究において、シート状細胞塊をpNIPAAmゲルモールドで培養する方法により、hDPSCsの棒状三次元集合体の作製に成功した。また、作製したhDPSCs棒状三次元細胞集合体が自己組織化能を有していることが明らかとなり、あらかじめ*in vitro*で作製した人工歯髄様組織を無髄歯に移植するという、新規の歯髄再生治療を実現させる移植用材料として応用できる可能性が示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　伊藤　善博　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教　授	今里　聡
	副 査　教　授	阪井　丘芳
	副 査　准教授	前田　隆史
	副 査　講　師	山田　聡

論文審査の結果の要旨

本研究は、*in vitro* で構築した歯髄様組織を根管内に移植する新規の歯髄再生療法の確立に向けて、ヒト歯髄幹細胞由来の棒状三次元細胞集合体の作製を試み、さらに、*in vitro* および *in vivo* において、作製した細胞集合体の機能評価を行ったものである。

その結果、温度応答性高分子ゲルモールドを利用することで、スキャフォールドフリーのヒト歯髄幹細胞からなる棒状三次元細胞集合体の作製が可能であり、また、作製した細胞集合体が自己組織化能を有していることが確認された。さらに、根管内に移植した棒状三次元細胞集合体が歯髄様組織として機能できる可能性が、*in vivo* において明らかとなった。

以上の研究成果は、全く新しいアプローチの歯髄再生療法を実現するための基盤技術の開発に成功したことを示すものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。