

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

学位論文

ヒト歯髄幹細胞を用いた棒状三次元細胞集合体の創製

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

顎口腔機能再建学講座(歯科理工学教室)

(指導教員:今里 聡教授)

伊藤 善博

目次

Ι	緒言	4
П	材料と方法	7

- 1. 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
 - 2) hDPSCs 由来棒状三次元細胞集合体の作製
 - (1) 細胞懸濁液を用いる方法
 - (2)シート状細胞塊を用いる方法
- 2. 棒状三次元細胞集合体の構造と機能評価

9

13

- 1)棒状三次元細胞集合体の長期培養
- 2)棒状三次元細胞集合体の内部構造観察
 - (1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色
 - (2) Live/Dead 染色
- 3) 棒状三次元細胞集合体の自己組織化能の評価
 - (1) 免疫蛍光染色
 - (2) von Kossa 染色
 - (3) リアルタイム PCR
- 3. 歯髄再生用材料としての in vivo での評価

1) 埋入用抜去歯の準備

2) 拔去歯埋入実験

- 3) 実体顕微鏡観察
- 4) 組織学的評価
- 4. 統計学的解析

15

16

Ⅲ 結果

- 1. 棒状三次元細胞集合体の作製
- 2. 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
 - 2)棒状三次元細胞集合体の内部構造観察
 - (1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色
 - (2) Live/Dead 染色
 - 3) 棒状三次元細胞集合体の自己組織化能の評価
 - (1) 免疫蛍光染色
 - (2) von Kossa 染色
 - (3) リアルタイム PCR
- 3. 歯髄再生用材料としての in vivo での評価

 $\mathbf{2}$

19

1) 実体顕微鏡観察

2) 組織学的評価

- (1) HE 染色
- (2)免疫蛍光染色

IV	考察	21
V	結論	29
VI	謝辞	30
VII	参考文献	31
VIII	図表	43

I 緒言

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^{1.5)}。現在、重度のう触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⁶ ¹⁰⁾。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¹¹⁻¹⁵⁾。しかし、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、う触や根尖性歯周炎の発症リスクが増加すること が知られており¹⁶⁾、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。 実際、Caplan ら¹⁷⁾は、無髄歯の喪失リスクを有髄歯と比較した場合、ハザード 比は大臼歯において7.4、前歯と小臼歯においては 1.8 であると報告しており、 歯髄の有無が歯の予後に大きく関わっている事が明らかとなっている。

こういったことから、近年、無髄となった歯に歯髄を再生させる治療法が注目 されている。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(Tissue Engineering)¹⁸⁾的手法を用いた歯髄再生技術 への関心が高く、従来の根管充填材を用いた処置にとって代わる画期的な手法 の一つとして、現在も多くの研究が行われている¹⁹⁻²²⁾。例えば Rosa ら²³⁾は、ヒ ト脱落乳歯幹細胞とペプチドハイドロゲルの複合体をヒト抜去歯根管内に注入 し、それを免疫不全マウスの背部皮下腔に移植したところ、根管内に象牙芽細胞 を有する歯髄様組織が形成されたことを示した。また、Nakashima ら²⁴⁾は、歯髄 幹細胞、顆粒球コロニー刺激因子、コラーゲンの複合体を抜髄直後のイヌ根管内 に充填することで、歯髄様組織を再生させることに成功し、現在、臨床応用に向 けた試みがなされている。

しかしながら、こういった三つの要素を組み合わせて再生を図る組織工学的 手法においては、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、いくつかの問題点が指摘されている。例えば、スキャフォールド を用いることによって細菌感染リスクが上昇すること²⁵⁾や、スキャフォールド の生分解速度を制御することは難しいため²⁶⁾、それ自体が組織再生を阻害して しまう場合がある^{26,27)}ことなどである。また、スキャフォールドを用いて生体 の環境を模倣することは困難であり、その使用が炎症の惹起や宿主組織への生 着性を低下させる要因ともなり得る^{28,29)}。

ところで、Sasaki ら³⁰⁾は、周囲の温度が上昇すると収縮し、低下すると膨張す る性質を持つ、温度応答性高分子 Poly N-isopropylacrylamide (pNIPAAm) ゲルを 用いてマウス由来骨髄間葉系幹細胞 (Bone Marrow-Derived Stromal Stem Cells: BMSCs)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を示した。さらに、この細 胞集合体を構成する BMSCs を骨系分化誘導することによって、集合体が軟骨内 骨化を再現しながら骨様組織を形成することを確認し、得られた細胞集合体が 自己組織化能を有することを明らかにした³¹⁾。そこで、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。

Ⅱ 材料と方法

1. 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

縦12mm、横3.0mm、最大深さ3.0mmの半円柱状の溝を有するpNIPAAm ゲ ルモールドを作製するため、まずコンピューターデザインソフト(Solid works 2011、Dassault Systemes、Vélizy-Villacoublay、France)を用いて鋳型の設計を行 い、3D プリンタ(EDEN260、Objet、MN、USA)にてエポキシ樹脂で造形した (図1A、B)。この鋳型に、NIPAAm 水溶液(7mmol/L、Wako、大阪)に架橋剤 として Polyethylene glycol dimethacrylate (Sigma-Aldrich、MO、USA)を加え、そ の後、ペルオキソニ硫酸アンモニウム(Nakalai、京都)、テトラメチルエチレン ジアミン(Nakalai)を加えた溶液を流し込み、4℃で8時間静置してゲル化させ た。鋳型からゲルモールドを取り出し(図1C)、残留モノマーを除去するため に 24 時間水中浸漬した後、4℃の70%エタノール中で保存した。細胞培養にあ たっては、ゲルモールドをリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline : PBS、 ニッスイ、東京)に48時間浸漬して内部のエタノールを除去し、実験に供した。

2) hDPSCs 由来棒状三次元細胞集合体の作製

成人第三大臼歯より採取した hDPSCs(Lonza、Basel、Switzerland、図2)を用

いて、以下の二種類の方法で棒状三次元細胞集合体の作製を試みた。なお、 hDPSCs の培養は、20% Fetal bovine serum (FBS、Invitrogen、CA、USA)、1% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) 含有の Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM、Wako)を細胞増殖用培地 (Growth medium : 以下 GM) として用い、

37℃、5%二酸化炭素環境下にて行った。

(1) 細胞懸濁液を用いる方法

hDPSCsを100 mm culture dish(IWAKI、東京)を用いて100%コンフルエ ントの状態まで培養した後、PBS で洗浄し、Trypsin/EDTA(Sigma-Aldrich) を3分間作用させることで細胞を回収した。その後、遠心分離処理(1400 rpm、5分間)を行い、上清を除去した細胞懸濁液をpNIPAAm ゲルモール ドに流し込んだ(図3A)。そして、2日間培養を行った後、pNIPAAm ゲル モールドを室温環境に静置して膨張させ、細胞集合体の取り出しを試みた。 (2)シート状細胞塊を用いる方法

hDPSCs を 100 mm culture dish (IWAKI) を用いて培養し、100%コンフル エントを確認した後、さらに 5 日間培養を行った。その後、セルスクレイパ ー (CORNING、NY、USA)を用いて hDPSCs をシート状に回収し、滅菌ピ ンセットで把持して、pNIPAAm ゲルモールドに填入した (図3B)。(1)と 同様にして、その後 2 日間培養を行い、細胞集合体の取り出しを試みた。 2. 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

棒状細胞集合体の培養には、GM にアスコルビン酸(5.0×10⁻² mg/mL、Sigma-Aldrich)、β-グリセロフォスフェイト(10 mM、Sigma-Aldrich)、デキサメタゾン(1.0×10⁻⁵ mM、Sigma-Aldrich)を添加した象牙芽細胞分化誘導培地(Odontogenic differentiation medium:以下 OM)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、最長20日間まで培養を行い、実体顕微鏡(SMZ745T、NIKON、東京)観察 により経時的な大きさの変化を評価した。具体的には、実体顕微鏡像内の明部を 棒状細胞集合体の本体として2値化し、これによって得られた棒状細胞集合体 外形の面積を画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health、MD、USA) を用いて定量評価した。なお、棒状細胞集合体をGMで培養した場合をコント ロールとした。

2)棒状三次元細胞集合体の内部構造観察

(1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

培養 0、5、10、20 日目の棒状細胞集合体を PBS で洗浄し、4%パラホルム アルデヒド (PFA) を用いて 48 時間固定処理を行った後、パラフィン包埋し た。薄切切片作製装置(2125RT、Leica、Wetzlar、Germany)を用いて、棒状 細胞集合体の長軸方向と平行に厚さ5µmの薄切切片試料を作製し、スライ ドガラス(Superfrost、Matsunami、大阪)にマウントした。レモゾール(Wako) を用いた脱パラフィン処理を行った後、マイヤーへマトキシリン溶液(Wako) に3分間浸漬し、流水にて10分間水洗後、エオジン溶液(Wako)に2分間 浸漬することでへマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。染色した試 料は光学顕微鏡(ECLIPSE Ci、NIKON)を用いて観察した。

(2) Live/Dead 染色

培養 0、5、10、20 日目の棒状細胞集合体を PBS で洗浄し、長軸方向と平 行に中央部分(厚さ:0.5 mm)を外科用メス(FEATHER、大阪)で切り出し た。切り出した試料をスライドガラスにマウントし、LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit (ThermoFisher、MA、USA)を用いて、生細胞を Calcein AM、死細胞を Ethidium homodimer-1 (EthD-1)で染色した。染色した試料は、 蛍光顕微鏡 (TE2000, NIKON)を用いて、生細胞を 475 nm の波長、死細胞 を 559 nm の波長で観察した。

10

3)棒状三次元細胞集合体の自己組織化能の評価

(1) 免疫蛍光染色

2.2).(1)と同様にして、培養0、5、10、20日目のhDPSCs棒状細胞 集合体をパラフィン包埋し、長軸方向と平行に、厚さ5µmの薄切切片試料 を作製した。脱パラフィン処理をし、PBS で2回洗浄後、0.1%牛血清アルブ ミン (Nacalai) および 0.3% TritonX-100 (Alfa Aesar、Lancashire、UK) 含有 PBS (PBS-X) に 40 分間浸漬した。 次に、 anti-human dentin sialophosphoprotein (DSPP) マウスモノクローナル抗体 (sc-73632、Santa Cruz Biotechnology、 TX、USA)を PBS-X で希釈(1/200)した溶液を、室温で 30 分間作用させ た。その後、PBS で3回洗浄し、二次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen) を PBS-X で希釈 (1/500) した溶液を室温で 40 分間作用させ た。細胞核の染色は Hoechst33342 (Invitrogen) を 5 分間作用させることで行 った。染色した試料は蛍光顕微鏡(TE2000)を用いて観察するとともに、細 胞集合体辺縁部と内部において、蛍光顕微鏡画像の任意の 100 x 100 ピクセ ル領域で DSPP が発現している面積割合を画像解析ソフト Image J を用いて 算出した。

(2) von Kossa 染色

培養 0、5、10、20 日目の棒状細胞集合体内に沈着した石灰化基質を観察

するため、von Kossa 染色を行った。前述と同様にして作製した厚さ5μmの 薄切切片試料を5%硝酸銀(Sigma-Aldrich)水溶液に浸漬し、30分間の紫外 線照射を行った。蒸留水で2回洗浄後、試料を光学顕微鏡(ECLIPSE Ci)に て観察した。

(3) リアルタイム PCR

培養3、5、10日目の棒状細胞集合体をPBSにて2回洗浄後、外層(最外 層から1mm)と内層(中心部)を外科用メスで切り分けた。そして、それ ぞれの層を構成する DPSCs の Dspp と Nanog の mRNA 発現量を TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct[™] Kit (Ambion、TX、USA) を用いて測定した。 すなわち、50 μL の Lysis Solution を室温下で5分間作用させることで、各層 の細胞を溶解し、これに 5 µL の Stop Solution を加えたものをサンプルライ セートとした。10 μL のサンプルライセートに、25 μL の 2X RT Buffer、2.5 µLの20X RT Enzyme Mix、12.5 µLの Nuclease-Free Water を加え、37℃で60 分間、95℃で5分間の逆転写反応を行うことで cDNA を作製した。次に、10 μ L \mathcal{O} TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 5.0 μ L の Nuclease-Free Water、1.0 μ L の各プライマー (*Dspp*、*Nanog*、 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: Gapdh)、4.0 µL の cDNA を混合し、 StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems) を用いて PCR 反応によ

る増幅を行った。それぞれの遺伝子の発現量は、ΔΔCt 法を用いて Gapdh の mRNA 量で補正した。集合体内層の hDPSCs の Dspp 発現量を1とし、外層 の細胞の Dspp 発現量を相対値として求めた。一方、Nanog においては、集 合体外層の hDPSCs の Nanog 発現量を1とし、内層の細胞の Nanog 発現量 を相対値として求めた。

3. 歯髄再生用材料としての in vivo での評価

生体内における歯髄再生能を評価することを目的として、ヒト抜去歯の根管 に棒状細胞集合体を填入し、重症複合免疫不全(Severe combined Immunodeficiency: SCID)マウスの背部皮下腔への移植実験を行った。なお、本 実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認(動物実験承認番号: 動歯-26-021-0)のもと、大阪大学動物実験規程に則って実施した。

1) 埋入用抜去歯の準備

ヒト抜去上顎中切歯をフィッシャーバー(MANI、栃木)にて切断し、10mm の長さの歯根を得た。根尖部も含め、ステンレス K-file(MANI)を用いて 80 号 まで根管を拡大し、スメア層除去のためスメアクリン(NISIKA、山口)、2.5%次 亜塩素酸ナトリウム水溶液(NaOCl)で交互洗浄後、殺菌処理のため 5% NaOCl に5分間浸漬した。その後、1% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)を添加した PBS に浸漬し、4℃下で保管した。

2) 抜去歯埋入実験

1) で準備した歯根の根管内に、作製直後(培養0日)の棒状細胞集合体を填入し、歯冠側 3 mm の部位までをグラスアイオノマーセメント(ベースセメント、松風、京都)で封鎖して埋入用試料とした。6 週齢オスの SCID マウス(日本クレア、大阪)に対し、ジエチルエーテル(Wako)を吸入させることで麻酔を施し、剃毛後、両側背部皮下にディスポーザブルメス(FEATHER)を用いて15 mm の切開を加えた。背部皮下腔に棒状集合体を填入した試料を埋入し、創面を絹糸(ネスコスーチャー、アルフレッサファーマ、大阪)で縫合した(移植群)。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群とした(図4)。

3) 実体顕微鏡観察

埋入から6週間後にSCIDマウスを屠殺し、背部皮下腔より試料を取り出して、4%パラホルムアルデヒド水溶液に48時間浸漬して固定した。PBSで2回 洗浄後、実体顕微鏡(SMZ745T)を用いて試料の観察を行った。

4) 組織学的評価

パラホルムアルデヒドで固定した試料をモールス液(Wako)に2週間浸漬し て脱灰し、パラフィン包埋した。歯軸と平行に、厚さ7μmの薄切切片試料を作 製し、HE 染色を施して顕微鏡観察を行った。また、同様の薄切切片に対して、 anti-human DSPP マウスモノクローナル抗体 (sc-73632)、anti-human STRO-1 マウ スモノクローナル抗体 (sc-47733)、anti-human CD31 マウスモノクローナル抗体 (M0823、DAKO、Glostrup、Denmark)を用いて免疫蛍光染色を施し、DSPP と STRO-1、ならびに CD31 の発現を評価した。

4. 統計学的解析

細胞集合体の長期培養による大きさの変化については Two way ANOVA, Bonferroni test を、免疫蛍光染色の定量データについては Paired *t*-test を、また、 リアルタイム PCR の結果については Student's *t*-test を用いて、危険率 5%で統計 学的有意差の検定を行った。

Ⅲ 結果

1. 棒状三次元細胞集合体の作製

二種の方法によって棒状三次元集合体の作製を試みた結果(実体顕微鏡像)を 図5に示す。Trypsin/EDTA 溶液で回収した hDPSCs を細胞懸濁液の状態で pNIPAAm ゲルモールドに播種する方法では、ゲルモールドから取り出す際に細 胞が分散してしまい、一塊の細胞集合体は得られなかった(図5A)。一方、セ ルスクレイパーを用いて回収したシート状の hDPSCs をゲルモールドに填入す る方法では、長径約7 mm、短径約3 mm の棒状細胞集合体を取り出すことが可 能であった(図5B)。そのため、以降の実験では、シート状細胞塊をモールドに 填入する方法で棒状細胞集合体を作製し、実験に用いた。

2. 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 0、1、20 日目の棒状細胞集合体の実体顕微鏡観察像を図 6 A に、大きさ 変化の定量評価の結果を図 6 B に示す。棒状細胞集合体の大きさは、GM または OM での培養により、1 日後に、それぞれ 80.0 ± 8.0%、77.9 ± 8.0%に減少した。 OM で培養した場合は、その後 20 日目まで大きさに変化はなく、形状も維持さ れたままであった。一方、GM で培養した場合、培養 1 日目以降も集合体の大き さが減少し、5日目には OM と比較して有意に小さくなった。その後も経時的に 大きさは減少して形態が球状に近づき、20日間培養後には 49.0±8.0%に縮小し た。

2) 棒状三次元細胞集合体の内部構造観察

(1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

棒状細胞集合体の HE 染色の結果を図7に示す。作製直後(培養0日目) から、棒状細胞集合体辺縁部に密な細胞群を認め、培養10日目まで最外層 に細胞が密に存在している様子が観察された。しかし、培養20日目では、 集合体最外層部の細胞の連続性が消失していた。また、集合体内部は細胞の みの充実性の構造を呈しており、培養期間を通じて、その構造に変化はみら れなかった。

(2) Live/Dead 染色

Live/Dead 染色の結果を図8に示す。最大20日間の培養期間中、棒状集合体を構成するほとんどの細胞は緑色に染色され、集合体内で生存している状態が観察された。赤く染色された死細胞の存在は棒状細胞集合体中心部に見られたが、培養期間中を通して、生細胞と比較するとごくわずかであった。

3)棒状三次元細胞集合体の自己組織化能の評価

(1) 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色の結果、培養 0 日目の棒状細胞集合体内では DSPP の発現 は認められないが、培養 5 日目から 10 日目には、集合体外層に DSPP が局 在していた。また、20 日間の培養後には、棒状細胞集合体全体にわたって DSPP が発現していた(図 9)。

また、図10に、免疫蛍光染色像から DSPP 発現領域の定量評価を行った 結果を示す。培養5日目の辺縁部での発現領域は30.5±1.2%、内部における 発現領域は1.4±0.5%であった。また、培養10日目の試料における DSPP 発 現領域は、辺縁部で70.5±1.6%、内部では32.9±3.3%であり、培養5日目 と10日目において、DSPPの発現領域は集合体内部と比較して辺縁部で有 意に増加していた。しかし、培養20日目における DSPP の発現領域は、辺 縁部と内部の間で有意差を認めなかった。

(2) von Kossa 染色

von Kossa 染色の結果、培養 0 日目と 5 日目においては、集合体内に石灰 化基質の沈着は認められなかった。培養 10 日目になると、集合体外層に石 灰化基質の沈着がみられ、20 日目には、集合体全体にわたって石灰化基質が 沈着していた(図11)。 (3) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR の結果を図12に示す。培養3日目において、集合体 外層を構成する hDPSCs の *Dspp* 発現量は7.94±1.61 であり、内層の細胞と 比較して有意に多かった(図12A)。また、培養5日目および10日目にお いても、外層に存在する細胞は、内層の細胞と比較して有意に *Dspp* の発現 が大きかった。

一方、Nanogの発現量に関しては、培養3日目では、集合体内層で5.87± 1.00と内層の方が有意に多く、また培養5日目と10日目においても、同様 に内層の方が外層よりも発現が有意に大きかった(12B)。

3. 歯髄再生用材料としての in vivo での評価

1) 実体顕微鏡観察

埋入から 6 週間後に摘出した移植群およびコントロール群の状態を図13に 示す。コントロール群では、埋入前と変化が認められなかったが、移植群は根尖 部が赤色を呈し、血液成分を含む組織が存在している様子が観察された。

2) 組織学的評価

(1) HE 染色

HE 染色の結果を図14に示す。コントロール群では、根管内が空洞で、 組織の存在は全く認められなかった。一方、移植群では、弱拡大像において、 根管内に充実性の組織が存在し、根尖部からは宿主由来と考えられる組織の 侵入が観察された。また、強拡大像で見ると、移植した棒状細胞集合体内に 多数の血管様組織が形成されており、血球成分を含むものも認められた。

(2) 免疫蛍光染色

移植群の免疫蛍光染色像を図15、図16に示す。DSPP抗体を用いた染 色により、棒状細胞集合体を移植した部分の根管壁象牙質に近接した部位に DSPPの局在が認められた(図15A)。また、STRO-1抗体で染色すると、 STRO-1陽性細胞は根管内の組織の中央部で観察され、逆に象牙質に近接す る部位では存在が認められなかった(図15A、B)。さらに、ヒトCD31抗 体を用いて染色した結果では、移植した棒状細胞集合体内にCD31陽性細胞 からなる管腔様構造の形成が認められた(図16)。

IV 考察

本研究では、あらかじめ in vitro でスキャフォールドフリーの人工歯髄様組織 を構築し、これを無髄歯に移植するという新規の歯髄再生治療技術を確立する ため、hDPSCs のみで構成される棒状三次元細胞集合体の作製を試み、さらに、 その歯髄再生用材料としての有用性を評価した。

スキャフォールドを用いずに作製した細胞の凝集塊は、一般的に、スフェロイ ドと呼ばれ、再生医療や創薬への応用が期待されている³²⁻³⁵⁾。スフェロイドの作 製法については、これまでに多くの研究が行われており、マイクロウェルアレイ を応用した手法 36-40)をはじめとするさまざまな方法 41-40が開発されている。し かし、これらの手法を用いて作製できるスフェロイドは、最大でも 1.5 mm 程の 大きさである。そこで本研究では、まず、hDPSCs を用いて、ヒトの無髄歯根管 内に移植可能な大きさの細胞集合体を作製する方法の確立を試みた。本研究で は、スフェロイド作製法のなかでも、その形状の制御が比較的容易であるとして 知られる、pNIPAAm ゲルを用いた細胞集合体作製システム^{30,31,47)}を応用するこ とによる棒状細胞集合体の作製に取り組んだ。その結果、まず Trypsin/EDTA で 回収した細胞の懸濁液を pNIPAAm ゲルモールドに注入する方法では、集合体を 作製することはできなかった。一方で、セルスクレイパーを用いて回収したシー ト状細胞塊をモールドに填入する方法では、長径約7mmにも及ぶ棒状細胞集合 体の作製が可能であった。これは、Trypsin/EDTA 処理した細胞ではラミニン⁴⁸⁾ やフィブロネクチン⁴⁹⁾などの細胞外基質(Extracellular Matrix; ECM)が分解さ れたのに対し、セルスクレイパーで回収することで ECM を保持することができ た結果であると考えられた。歯髄幹細胞を用いてスフェロイドを作製すると、細 胞間接着や細胞-ECM 間接着に関与するビンキュリンが多く発現することが知 られている²⁵⁾。ビンキュリンは、インテグリンと細胞骨格であるアクチンフィ ラメントの結合を仲介することで細胞-ECM 間接着を制御する⁵⁰⁾。すなわち、 シート状細胞塊を成形することで、E-カドへリン⁵¹⁾等による細胞間接着に比べ て強固な接着力を有するインテグリン α1 やインテグリン αv⁵²⁾を介した細胞-ECM 間接着を早期に誘導できた結果、5 mm 以上の大きさの細胞集合体を形成 することが可能であったものと考えられる。

作製した細胞集合体を移植組織として利用するためには、集合体を構成する 細胞が生存していることが重要な因子となる⁵³⁾。そこで、棒状細胞集合体を長 期培養し、構造や構成する細胞の生死について検討を行った。培養のための培地 として GM または OM を用いたところ、GM では集合体の大きさが維持できな かったのに対し、OM で培養した場合には、培養1日目以降、20日目まで大き さが維持され、形状にも変化は認められなかった。OM で培養すると hDPSC に よる ECM の産生が促進され、集合体の強度が維持されるために大きさに変化が 生じなかったことが推測される。また、HE 染色の結果から、培養 10 日目まで は、集合体最外層に細胞が密に存在していることが明らかとなった。これは、培 地から栄養や酸素が豊富に供給される辺縁部では細胞の増殖が促進されるため であると考えられる。なお、培養 20 日目の試料では最外層部の細胞の連続性の 消失を認めたが、長期培養により最外層で密に沈着した ECM が、切片作製時や 染色の際にスライドガラスから剥離したためと思われる。

Live/Dead 染色の結果から、最大 20 日間の培養期間中、棒状細胞集合体中心部 に死細胞の存在をわずかに認めたものの、集合体を構成するほぼ全ての hDPSCs が生存していることが明らかとなった。これまでの研究では、スフェロイドや細 胞集合体の中心部では、低酸素や低栄養によってアポトーシスが誘導されるこ とが報告されている^{25,54-58)}。本研究においては、ECM の豊富なシート状の hDPSCs 塊を成形する方法で、細胞集合体の作製を行った。hDPSCs が産生する I型コラーゲン⁵⁹⁾やバーシカン⁶⁰⁾といった ECM は、繊維状の疎な構造をして おり、本研究での細胞集合体は、作製時からすでにこれらの ECM を多く保持し た状態であったため、集合体内に培地が浸透しやすい構造であったと考えられ る。そのため、細胞集合体内部の hDPSCs についても、培地から栄養や酸素が十 分に供給され、アポトーシスの誘導が抑制されたのであろう。

DPSCs は、OM で培養することにより象牙芽細胞へ分化する⁶¹⁻⁶³⁾。また、細胞

のみで構成される集合体やスフェロイドは、生体組織が本来有する自己組織化 能を in vitro において発揮できることが知られている^{30,31)}。そこで、hDPSCs か らなる棒状細胞集合体を OM で培養し、象牙芽細胞への分化という観点から自 己組織化能の保有について検討した。免疫蛍光染色の結果、培養5日目と10日 目において、細胞集合体外層に、象牙芽細胞マーカーである DSPP の局在が認め られた。このことは、棒状細胞集合体の外層を構成する hDPSCs が象牙芽細胞に 分化し、DSPP を産生したことを示している。また、von Kossa 染色の結果、培養 10 日目において、棒状細胞集合体外層のみに石灰化基質が沈着していることが 分かった。さらに、hDPSCs は幹細胞マーカーである Nanog を発現しており^{64,} ⁶⁵⁾、象牙芽細胞へ分化することによって Dspp を発現する^{19,63,66)}ことから、組織 学的検討によって観察された結果をより詳細に解析するために、これらの遺伝 子発現の定量評価を行った。その結果、棒状細胞集合体の外層に存在する hDPSCs は、内層を構成する細胞と比較して Dspp が多く発現する一方で、Nanog の発現量が少ないことが分かった。この結果は、集合体外層の hDPSCs が象牙芽 細胞に分化したことを意味しており、組織学的検討で得られた結果と一致して いる。さらに、内層で Nanog の発現量が多いという所見は、細胞集合体の外層 と中心部では hDPSCs の表現型が異なり、中心部の hDPSCs が幹細胞性を維持し ていることを示している。これらのことから、集合体を構成する hDPSCs が象牙

芽細胞への分化能を維持しており、本研究で作製した棒状細胞集合体が歯髄再 生のための移植体として機能するだけの自己組織化能を有していることが示唆 された。

In vitro の実験系で、作製した DPSCs 棒状集合体が自己組織化能を有している ことが確認できたため、続いて、ヒト抜去歯の根管内に細胞集合体を填入し、マ ウス背部皮下腔に移植する実験を行った。歯髄再生能を評価する動物実験モデ ルとしては、厚さ約1.5mmにスライスした歯根内部に生体材料を充填した複合 体を SCID マウスの背部皮下腔に移植するモデル 67-71)や、抜髄したイヌの根管内 に生体材料を充填するモデル 72-74)などもあるが、本研究では、細胞集合体が根管 という閉鎖空間で歯髄様組織として定着できるか否かについて検討するために、 抜去歯の根管内に細胞集合体を填入したものを埋入用試料とする方法 ⁷⁵⁾を採用 した。実験の結果、棒状細胞集合体を填入した移植群では、埋入6週間後に、根 管内に血管を豊富にもつ歯髄様組織が形成されていることが分かった。Li ら⁷⁵⁾ は、DPSCs とポリL乳酸を組み合わせた複合体をヒト抜去歯根管に充填し、そ れをマウス背部皮下腔へと移植すると、9週間後に歯髄様組織が形成されたこと を報告している。本研究で観察された組織像は、Li らの結果と一致している。 また、棒状細胞集合体を移植しなかったコントロール群では、歯髄様組織の形成 がみられなかったことから、本研究で作製した細胞集合体が、根管内において歯

髄様組織の形成を誘導したことが明らかとなった。さらに、DSPPとSTRO-1の 免疫蛍光染色の結果、形成された歯髄様組織の根管壁象牙質に近接した部位に DSPP が、また、形成組織中央部に幹細胞マーカーである STRO-1^{55,76)}の発現が 局在していることが分かった。象牙質に含まれる基質は hDPSCs の象牙芽細胞 分化にとって重要であることが明らかとなっており⁷⁷⁾、bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) や transforming growth factor-β (TGF-β) といった液性因子が 関与していることが知られている⁷⁸⁻⁸¹⁾。このことから、根管壁と接する hDPSCs は、これら液性因子の影響を受けることで象牙芽細胞へと分化し、その反対に、 象牙質基質の影響を受けなかった根管内中央部では移植した hDPSCs が幹細胞 性を維持したものと推測される。さらに、血管内皮細胞マーカー^{82,83)}である CD31 の免疫蛍光染色の結果、形成された歯髄様組織全体にわたって CD31 陽性細胞 から構成される管腔様構造が認められた。本研究で用いた CD31 抗体は、マウス 由来 CD31 に交差反応を示さないものである。したがって、移植した棒状集合体 を構成する hDPSCs が根管内で血管を形成したものと考えられ、さらに HE 染色 像で血球成分を含む血管様組織の存在を認めたことから、それらが宿主の血管 と吻合した可能性が考えられる。以上の結果は、in vitro で確認された棒状集合 体の自己組織化能が in vivo においても発揮されたことを示しており、hDPSCs 棒 状細胞集合体が生体内、とりわけ無髄歯根管内において機能的な歯髄様組織を

形成できることを示唆している。歯髄再生医療において、根管内へ移植した細胞 を生存させるためには、根尖から宿主の血流を早期に歯根内部に誘導すること に加えて、移植組織が血管形成能を有していることが重要となる⁸⁴⁾。そういっ たことから、再生歯髄様組織への早期の血管導入を目指して、血管内皮細胞増殖 因子を用いた研究⁸⁵⁾や、DPSCsと血管内皮細胞を混合したスフェロイドを用い た研究^{84,86)}などが行われてきた。本研究では、スキャフォールドや液性因子を 用いることなく、細胞のみを用いて、血管を豊富に含む歯髄様組織が形成できる ことが示されたことから、本研究の結果を応用することで、より安全性の高い歯 髄再生技術を確立することが可能になるものと期待できる。

ただし、根管内に形成された歯髄様組織の全てが移植した細胞集合体から発 生したか否かについては、本研究結果からは言及することができない。すなわち、 細胞集合体が存在することによって根尖部から宿主の組織が誘導され、歯髄様 組織の一部を形成した可能性もある⁸⁷⁾。動物実験の結果から、移植した hDPSCs によって構築された機能的な歯髄様組織が新生組織全体にわたって分布してい ることは明らかではあるが、臨床的有効性を評価するためには、さらに詳細な検 討が必要である。

本研究の結果、pNIPAAm ゲルモールドを用いた培養法を応用することで、 hDPSCs から構成されるスキャフォールドフリーの棒状細胞集合体を作製する ことに成功し、さらに、作製した集合体を移植する歯髄再生技術実現の可能性を 示すことができた。本研究では、一定の大きさと形状の細胞集合体を用いたが、 コンピューターデザインソフトで設計した鋳型からモールドを作製する今回の 方法では、細胞集合体の最終的なサイズや形状を自由に設計することができる。 したがって、Computed Tomography 画像から歯髄腔の形態をデータ化し、これを もとに鋳型の設計を行えば、個々の歯に合わせた細胞集合体の作製が可能とな る。患者ひとりひとりに対応するテーラーメイド歯髄再生医療を実現させるう えで、本研究で確立した技術は有望であると期待される。

<u>V</u> 結論

本研究の結果、シート状細胞塊を温度応答性高分子ゲルモールドで成形する ことで、hDPSCsの棒状三次元集合体の作製が可能であった。また、作製した hDPSCs棒状三次元細胞集合体は自己組織化能を有しており、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。

VI 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて戴き、御指導と御高配を賜りまし た大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座(歯科理工学教室)の今里 聡教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました同 研究科口腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室)林 美加子 教授ならびに同研 究科顎口腔機能再建学講座(歯科理工学教室)の佐々木淳一 助教に心より感謝 申し上げます。

最後に、本研究を行うに際し、多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学 院歯学研究科顎口腔機能再建学講座(歯科理工学教室)ならびに同研究科口腔分 子感染制御学講座(歯科保存学教室)の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

VII 文献

- Goldberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. J Dent 1995;23(1):15-20.
- Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. Crit Rev Oral Biol Med 1996;7(2):104-133.
- Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. Mediators Inflamm 2015;2015:230251.
- Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? Crit Rev Oral Biol Med 2001;12(5):425-437.
- Zheng Y, Chen M, He L, Marão HF, Sun DM, Zhou J, Kim SG, Song S, Wang SL, Mao JJ. Mesenchymal dental pulp cells attenuate dentin resorption in homeostasis. J Dent Res 2015;94(6):821-827.
- 6) Michanowicz AE, Michanowicz JP, Michanowicz AM, Czonstkowsky M, Zullo TP. Clinical evaluation of low-temperature thermoplasticized injectable gutta-percha: a preliminary report. J Endod 1989;15(12):602-607.
- Chu CH, Lo EC, Cheung GS. Outcome of root canal treatment using Thermafil and cold lateral condensation filling techniques. Int Endod J 2005;38(3):179-185.

- Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. Int Endod J 2003;36(3):147-160.
- Peng L, Ye L, Tan H, Zhou X. Outcome of root canal obturation by warm guttapercha versus cold lateral condensation: a meta-analysis. J Endod 2007;33(2):106-109.
- Tortini D, Grassi M, Re Cecconi D, Colombo M, Gagliani M. Warm gutta-percha obturation technique: a critical review. Minerva Stomatol 2011;60(1-2):35-50.
- Lee AH, Cheung GS, Wong MC. Long-term outcome of primary non-surgical root canal treatment. Clin Oral Investig 2012;16(6):1607-1617.
- 12) Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success. Int Endod J 2007;40(12):921-939.
- 13) de Chevigny C, Dao TT, Basrani BR, Marquis V, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. Treatment outcome in endodontics: the Toronto study--phase 4: initial treatment. J Endod 2008;34(3):258-263.
- Ng YL, Mann V, Gulabivala K. Tooth survival following non-surgical root canal treatment: a systematic review of the literature. Int Endod J 2010;43(3):171-189.
- Friedman S, Mor C. The success of endodontic therapy--healing and functionality. J Calif Dent Assoc 2004;32(6):493-503.

- 16) Mao JJ, Kim SG, Zhou J, Ye L, Cho S, Suzuki T, Fu SY, Yang R, Zhou X. Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation. Dent Clin N Am 2012;56(3):639-649.
- 17) Caplan DJ, Cai J, Yin G, White BA. Root canal filled versus non-root canal filled teeth: a retrospective comparison of survival times. J Public Health Dent 2005;65(2):90-96.
- 18) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993;260(5110):920-926.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97(25):13625-13630.
- Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. J Endod 2005;31(10):711-718.
- Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2012;18(1-2):176-184.
- 22) Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. Dent Mater 2013;29(1):97-102.
- Rosa V, Zhang Z, Grande RH, Nör JE. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. J Dent Res 2013;92(11):970-975.
- 24) Nakashima M, Iohara K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. J Endod 2014;40(4):S26-S32.

- 25) Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, Koizumi Y, Takimoto K, Suzuki N, Saito M, Suda H. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells. Arch Oral Biol 2014;59(3):310-317.
- 26) Murray PE. Constructs and scaffolds employed to regenerate dental tissue. Dent Clin North Am 2012;56(3):577-588.
- Yildirimer L, Seifalian AM. Three-dimensional biomaterial degradation-material choice, design and extrinsic factor considerations. Biotechnol Adv 2014;32(5):984-999.
- Garg T, Goyal AK. Biomaterial-based scaffolds-current status and future directions. Expert Opin Drug Deliv 2014;11(5):767-789.
- 29) Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. Eur Cell Mater 2013;26:120-132.
- Sasaki J, Asoh TA, Matsumoto T, Egusa H, Sohmura T, Alsberg E, Akashi M, Yatani
 H. Fabrication of three-dimensional cell constructs using temperature-responsive
 hydrogel. Tissue Eng Part A 2010;6(8):2497-2504.
- 31) Sasaki J, Matsumoto T, Egusa H, Matsusaki M, Nishiguchi A, Nakano T, Akashi M, Imazato S, Yatani H. *In vitro* reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct. Integr Biol 2012;4(10):1207-1214.
- 32) Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnol J 2008;3(9-10):1172-1184.

- 33) Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. Trends Biotechnol 2013;31(2):108-115.
- 34) Zhang W, Zhuang A, Gu P, Zhou H, Fan X. A review of the three-dimensional cell culture technique: Approaches, advantages and applications. Curr Stem Cell Res Ther 2016;11(4):370-380.
- 35) Sambale F, Lavrentieva A, Stahl F, Blume C, Stiesch M, Kasper C, Bahnemann D, Scheper T. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. J Biotechnol 2015;205:120-129.
- 36) Rivron NC, Vrij EJ, Rouwkema J, Le Gac S, van den Berg A, Truckenmüller RK, van Blitterswijk CA. Tissue deformation spatially modulates VEGF signaling and angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109(18):6886-6891.
- 37) Napolitano AP, Chai P, Dean DM, Morgan JR. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. Tissue Eng 2007;13(8):2087-2094.
- 38) Truckenmüller R, Giselbrecht S, Rivron N, Gottwald E, Saile V, van den Berg A, Wessling M, van Blitterswijk C. Thermoforming of film-based biomedical microdevices. Adv Mater 2011;23(11):1311-1329.
- 39) Markovitz-Bishitz Y, Tauber Y, Afrimzon E, Zurgil N, Sobolev M, Shafran Y, Deutsch A, Howitz S, Deutsch M. A polymer microstructure array for the formation, culturing, and high throughput drug screening of breast cancer spheroids. Biomaterials 2010;31(32):8436-8444.
- 40) Chen H, Li J, Zhang H, Li M, Rosengarten G, Nordon RE. Microwell perfusion array

for high-throughput, long-term imaging of clonal growth. Biomicrofluidics 2011;5(4):44117.

- 41) Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. J Natl Cancer Inst 1971;46(1):113-120.
- 42) Timmins NE, Dietmair S, Nielsen LK. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. Angiogenesis 2004;7(2):97-103.
- 43) Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput
 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. Analyst 2011;136(3):473-478.
- 44) Hsiao AY, Tung YC, Kuo CH, Mosadegh B, Bedenis R, Pienta KJ, Takayama S.
 Micro-ring structures stabilize microdroplets to enable long term spheroid culture in 384 hanging drop array plates. Biomed Microdevices 2012;14(2):313-323.
- 45) Costa EC, Gaspar VM, Coutinho P, Correia IJ. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. Biotechnol Bioeng 2014;111(8):1672-1685.
- 46) Want AJ, Nienow AW, Hewitt CJ, Coopman K. Large-scale expansion and exploitation of pluripotent stem cells for regenerative medicine purposes: beyond the T flask. Regen Med 2012;7(1):71-84.
- 47) Sasaki J, Matsumoto T, Egusa H, Matsusaki M, Nishiguchi A, Nakano T, et al. In vitro reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct. Integr Biol 2012;4(10):1207-1214.

- 48) He L, Pan S, Li Y, Zhang L, Zhang W, Yi H, Song C, Niu Y. Increased proliferation and adhesion properties of human dental pulp stem cells in PLGA scaffolds via simulated microgravity. Int Endod J 2016;49(2):161-173.
- 49) Harumi Miyagi SP, Kerkis I, da Costa Maranduba CM, Gomes CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. J Endod 2010;36(5):826-831.
- 50) Izard T, Evans G, Borgon RA, Rush CL, Bricogne G, Bois PR. Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. Nature 2004;427(6970):171-175.
- 51) Takahashi N, Chosa N, Hasegawa T, Nishihira S, Okubo N, Takahashi M, Sugiyama Y, Tanaka M, Ishisaki A. Dental pulp cells derived from permanent teeth express higher levels of R-cadherin than do deciduous teeth: implications of the correlation between R-cadherin expression and restriction of multipotency in mesenchymal stem cells. Arch Oral Biol 2012;57(1):44-51.
- 52) Staquet MJ, Couble ML, Roméas A, Connolly M, Magloire H, Hynes RO, Clezardin P, Bleicher F, Farges JC. Expression and localisation of alphav integrins in human odontoblasts. Cell Tissue Res 2006;323(3):457-463.
- 53) Zhang Q, Nguyen AL, Shi S, Hill C, Wilder-Smith P, Krasieva TB, Le AD. Threedimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis. Stem Cells Dev 2012;21(6):937-947.
- 54) Xiao L, Tsutsui T. Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: stem cells in the core. J Cell Biochem 2013;114(11):2624-2636.

- 55) Xiao L, Kumazawa Y, Okamura H. Cell death, cavitation and spontaneous multidifferentiation of dental pulp stem cells-derived spheroids *in vitro*: a journey to survival and organogenesis. Biol Cell 2014;106(12):405-419.
- 56) Bates RC, Edwards NS, Yates JD. Spheroids and cell survival. Crit Rev Oncol Hematol 2000;36(2-3):61-74.
- 57) Desoize B, Gimonet D, Jardiller JC. Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. Anticancer Res 1998;18(6A):4147-4158.
- Cesarz Z, Tamama K. Spheroid culture of mesenchymal stem cells. Stem Cells Int 2016;2016:9176357.
- 59) Harumi Miyagi SP, Kerkis I, da Costa Maranduba CM, Gomes CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. J Endod 2010;36(5):826-831.
- 60) Park SJ, Bae HS, Park JC. Osteogenic differentiation and gene expression profile of human dental follicle cells induced by human dental pulp cells. J Mol Histol 2015;46(1):93-106.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res 2002;81(8):531-535.
- 62) Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftsoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Comparative analysis of *in vitro* osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). Arch Oral Biol 2011;56(7):709-721.

- 63) Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. J Endod 2007;33(6):703-708.
- 64) Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, Totey S, Bhonde RR, Abu Kasim NH. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. J Endod 2010;36(9):1504-1515.
- 65) Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs 2006;184(3-4):105-116.
- 66) Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R, Ueda M. Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. Biomaterials 2006;27(20):3766-3781.
- 67) Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. J Endod 2008;34(8):962-969.
- 68) Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. J Dent Res 2010;89(6):603-608.
- 69) Atalayin C, Tezel H, Dagci T, Karabay Yavasoglu NU, Oktem G, Kose T. *In vivo* performance of different scaffolds for dental pulp stem cells induced for odontogenic differentiation. Braz Oral Res 2016;30(1):e120.

- 70) Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration *in vivo*. Tissue Eng Part A 2015;21(3-4):550-563.
- 71) Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, Jansen JA. *In vivo* evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. J Tissue Eng Regen Med 2008;2(2-3):117-125.
- 72) Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. Tissue Eng Part A 2011;17(15-16):1911-1920.
- 73) Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M. Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. Biomaterials 2012;33(7):2109-2118.
- 74) Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu NX, Lv X, Li Q, Chen FM, Zhang M. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. Cell Tissue Res 2015;361(2):439-455.
- 75) Li X, Ma C, Xie X, Sun H, Liu X. Pulp regeneration in a full-length human tooth root using a hierarchical nanofibrous microsphere system. Acta Biomater 2016;35:57-67.

- 76) Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. Tissue Eng 2007;13(4):767-773.
- 77) Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin *in vitro*. J Endod 2006;32(11):1066-1073.
- 78) Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV. *In vivo* morphogenetic activity of dentine matrix proteins. J Biol Buccale 1990;18(2):123-129.
- 79) Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. J Dent 2000;28(2):77-92.
- 80) Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15(1):13-27.
- Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nör JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. Biomaterials 2006;27(14):2865-2873.
- Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. Trends Immunol 2003;24(6):327-334.
- 83) D' Alimonte I, Nargi E, Mastrangelo F, Falco G, Lanuti P, Marchisio M, Miscia S, Robuffo I, Capogreco M, Buccella S, Caputi S, Caciagli F, Tetè S, Ciccarelli R. Vascular endothelial growth factor enhances in vitro proliferation and osteogenic

differentiation of human dental pulp stem cells. J Biol Regul Homeost Agents 2011;25(1):57-69.

- 84) Dissanayaka WL, Zhu L, Hargreaves KM, Jin L, Zhang C. Scaffold-free prevascularized microtissue spheroids for pulp regeneration. J Dent Res 2014;93(12):1296-1303.
- 85) Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. J Dent Res 2010;89(8):791-796.
- 86) Dissanayaka WL, Zhu L, Hargreaves KM, Jin L, Zhang C. *In vitro* analysis of scaffold-free prevascularized microtissue spheroids containing human dental pulp cells and endothelial cells. J Endod. 2015;41(5):663-670.
- 87) Syed-Picard FN, Ray HL Jr, Kumta PN, Sfeir C. Scaffoldless tissue-engineered dental pulp cell constructs for endodontic therapy. J Dent Res 2014;93(3):250-255.



В





図1. pNIPAAmゲルモールドの作製方法

С

A: CADソフトでモールドの鋳型デザインを設計 B: 3Dプリンタで樹脂製のモールドの鋳型を作製 C: 得られたpNIPAAmゲルモールド



図2. 本研究で使用したヒト歯髄幹細胞(Human Dental Pulp Stem Cells: hDPSCs)



図3.hDPSCs由来棒状細胞集合体の作製方法

A:細胞懸濁液を用いる方法

B:シート状細胞塊を用いる方法

いずれの方法においても、pNIPAAmゲルモールドに細胞を播種してから 2日間培養後、室温に静置することでゲルモールドを膨張させ、棒状細胞 集合体の取り出しを試みた。



図4. マウス背部皮下への埋入試験の概要



- 図5. pNIPAAmゲルモールドから取り出したhDPSCsの状態
 - A: Trypsin / EDTAで回収した細胞をゲルモールドに播種した試料 細胞が分散し、細胞集合体は得られなかった。
 - B:シート状に回収した細胞塊をゲルモールドに填入した試料 棒状細胞集合体の作製が可能であった。





図6.棒状細胞集合体の長期培養による変化

A: 実体顕微鏡像

А

B:棒状細胞集合体の大きさ変化

(n = 4, Two way ANOVA, Bonferroni test, *p < 0.05)

エラーバーは標準偏差を示す



------ 細胞集合体の外縁



В





Day 10

Day 20

- 図8.棒状細胞集合体のLive/Dead染色像
 - A: Live/Dead染色用試料の切り出し方法
 - B:Live/Dead染色像

緑:生細胞、赤色:死細胞





図9.棒状細胞集合体のDSPP免疫蛍光染色像

緑:DSPP、赤:細胞核

---- 細胞集合体の外縁



図10. 免疫蛍光染色像におけるDSPP発現領域の定量評価 (n = 4, Paired *t*-test, **p* < 0.05) エラーバーは標準偏差を示す



図11.棒状細胞集合体のvon Kossa染色像

■細胞集合体の外縁



Day 3

Day 5

Day 10

図12. リアルタイムPCRによるDsppとNanogの発現

A : Dspp

B: *Nanog* (n = 4, Student's *t*-test, **p* < 0.05) エラーバーは標準偏差を示す



コントロール群

移植群

図13. 埋入6週間後に取り出した試料の実体顕微鏡像

画像左上は根尖部の拡大画像を示す



コントロール



移植群

図14. 埋入試料のHE染色像



血球成分を含む血管様組織



図15.移植群の免疫蛍光染色像

A: DSPP抗体による染色像と核染色像の重ね合わせ像

B:STRO-1抗体による染色像と核染色像の重ね合わせ像(弱拡大像)

C:STRO-1抗体による染色像と核染色像の重ね合わせ像(強拡大像)

-----移植体/象牙質境界

緑:陽性細胞

赤:細胞核



D



図16.移植群の免疫蛍光染色像

- A: CD31抗体による染色像
- B:細胞核染色像
- C:AとBの重ね合わせ像
- D:重ね合わせ像(強拡大)

緑: CD31陽性細胞 赤:細胞核

