



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 聰 教授）

伊藤 善博

目次

I 緒言	4
II 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
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. 齒髄再生用材料としての <i>in vivo</i> での評価	13

1) 埋入用抜去歯の準備	
2) 抜去歯埋入実験	
3) 実体顕微鏡観察	
4) 組織学的評価	
4. 統計学的解析	15
III 結果	
1. 棒状三次元細胞集合体の作製	16
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 <i>in vivo</i> での評価	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、う蝕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、スキヤ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、スキヤ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、スキヤ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 12 mm、横 3.0 mm、最大深さ 3.0 mm 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 1 A、B）。この鋳型に、NIPAAm 水溶液（7 mmol/L、Wako、大阪）に架橋剤として Polyethylene glycol dimethacrylate（Sigma-Aldrich、MO、USA）を加え、その後、ペルオキソ二硫酸アンモニウム（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°C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 1 C）、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°C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°C、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 3 A)。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、滅菌ビンセットで把持して、pNIPAAm ゲルモールドに填入した (図 3 B)。(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 5 μm 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、マイヤーヘマトキシリン溶液（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ヘマトキシリン・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。

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 5 μm 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 5 μm 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 1 mm）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-CtTM 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°C で 60 分間、95°C 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 μL の TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems、CA、USA)、5.0 μL の Nuclease-Free Water、1.0 μL 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、 $\Delta\Delta Ct$ 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. 齒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：動歙-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、10 mm 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、スマア層除去のためスマアクリン (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°C 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）を吸入させて麻酔を施し、剃毛後、両側背部皮下にディスピーザブルメス（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（ネスコスチーチャー、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 7 μm 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 5 A）。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 5 B）。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 $80.0 \pm 8.0\%$ 、 $77.9 \pm 8.0\%$ 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つた。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 $49.0 \pm 8.0\%$ 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つた。

(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 $30.5 \pm 1.2\%$ 、内部における発現領域は $1.4 \pm 0.5\%$ 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 $70.5 \pm 1.6\%$ 、内部では $32.9 \pm 3.3\%$ 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 1 2 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 1 2 A）。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（1 2 B）。

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 1 3 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つたが、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 1 4 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 1 5、図 1 6 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 1 5 A）。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 1 5 A、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 1 6）。

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了手法³⁶⁻⁴⁰⁾をはじめとするさまざまな方法⁴¹⁻⁴⁶⁾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 7 mm 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-カドヘリン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 $\alpha 1$ やインテグリン αv ⁵²⁾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つたのに対し、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 の產生が促進され、集合体の強度が維持されるために大きさに変化が

生じなかつ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つた。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つた。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つた。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、纖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 1.5 mm 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、抜髓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⁾を採用了。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

髓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、形成された歯髓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、形成された歯髓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、とりわけ無髓歯根管内において機能的な歯髓様組織を

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⁾。そういうことから、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。

V 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）の今里聰 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 文獻

- 1) Goldberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. *J Dent* 1995;23(1):15-20.
- 2) Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7(2):104-133.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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, Czonstkowski M, Zullo TP. Clinical evaluation of low-temperature thermoplasticized injectable gutta-percha: a preliminary report. *J Endod* 1989;15(12):602-607.
- 7) 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.

- 8) 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.
- 9) Peng L, Ye L, Tan H, Zhou X. Outcome of root canal obturation by warm gutta-percha versus cold lateral condensation: a meta-analysis. *J Endod* 2007;33(2):106-109.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 19) 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.
- 20) Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 2005;31(10):711-718.
- 21) 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.
- 23) 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.
- 27) Yildirim L, Seifalian AM. Three-dimensional biomaterial degradation-material choice, design and extrinsic factor considerations. *Biotechnol Adv* 2014;32(5):984-999.
- 28) 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.
- 30) 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. Micowell 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. Three-dimensional 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 multi-differentiation 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.
- 58) 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.
- 61) 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.

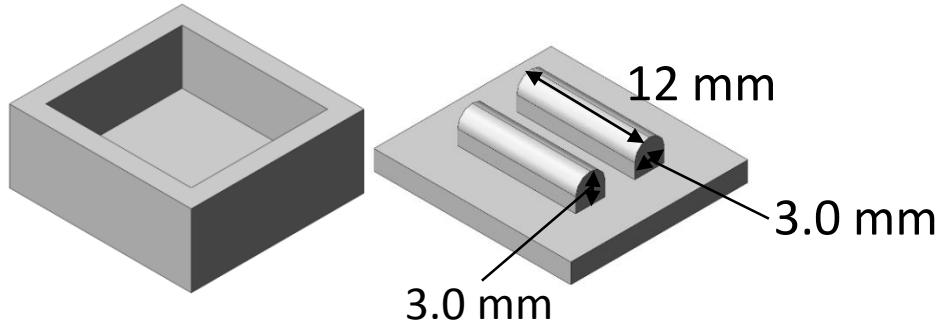
- 70) Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration *in vivo*. *Tissue Eng Part A* 2015;21(3-4):550-563.
- 71) Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt 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, Shagranova 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) Tziaras 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.
- 81) 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.
- 82) 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

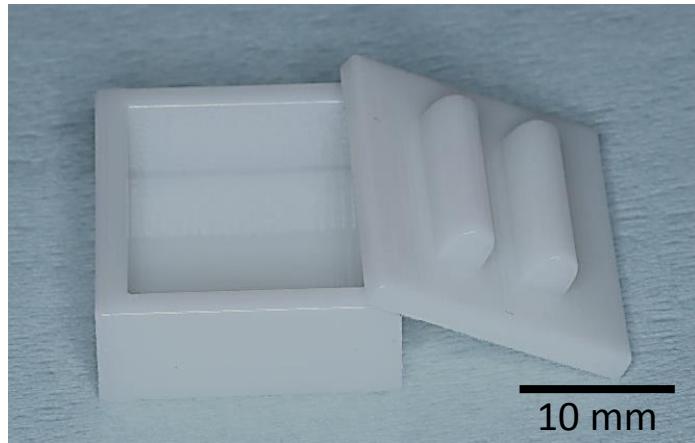
differentiation of human dental pulp stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 2011;25(1):57-69.

- 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.

A



B



C

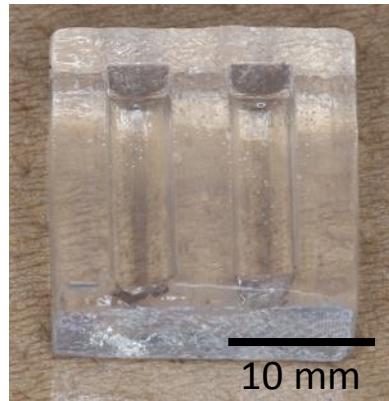


図1. pNIPAAmゲルモールドの作製方法

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

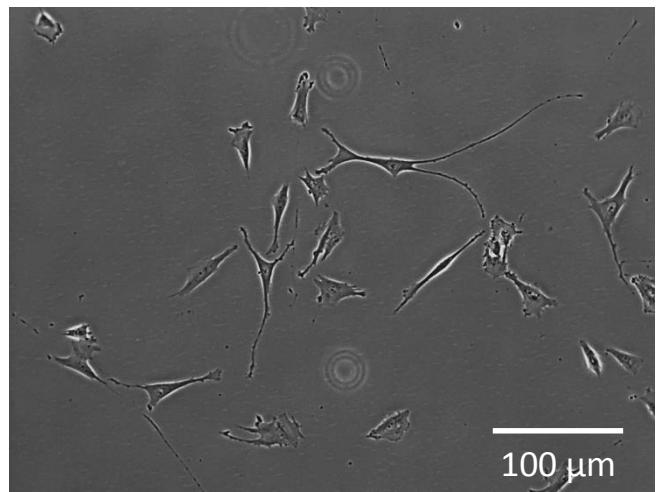
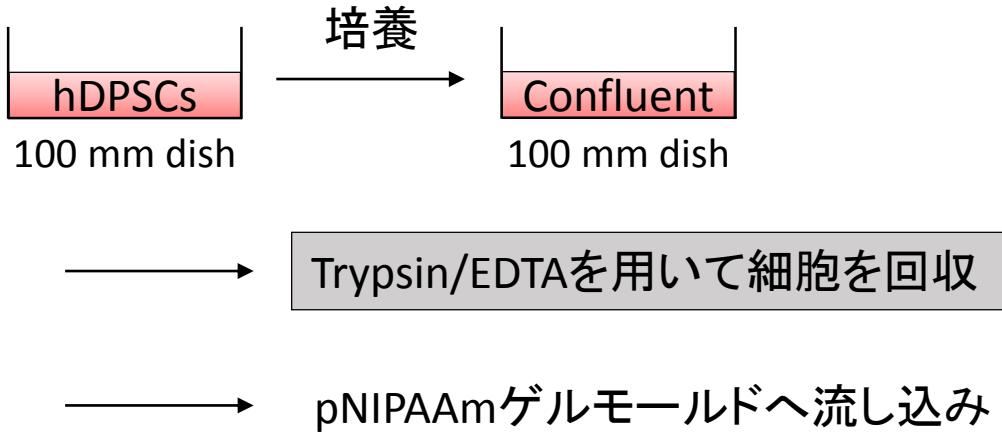


図2. 本研究で使用したヒト歯髄幹細胞(Human Dental Pulp Stem Cells : hDPSCs)

A



B

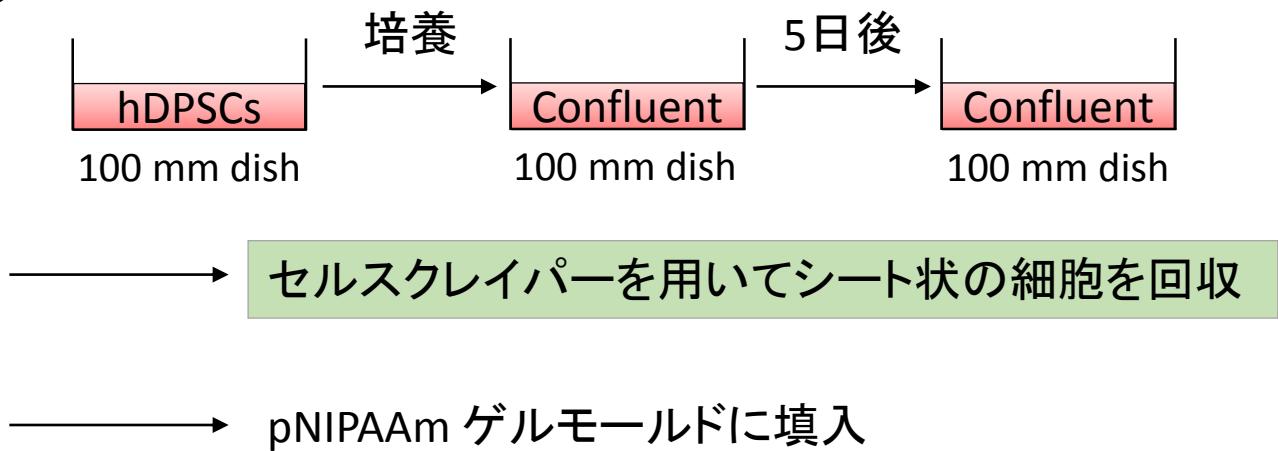
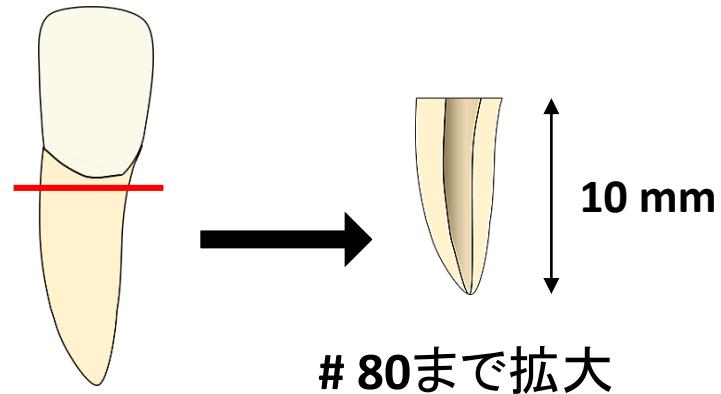


図3. hDPSCs由来棒状細胞集合体の作製方法

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

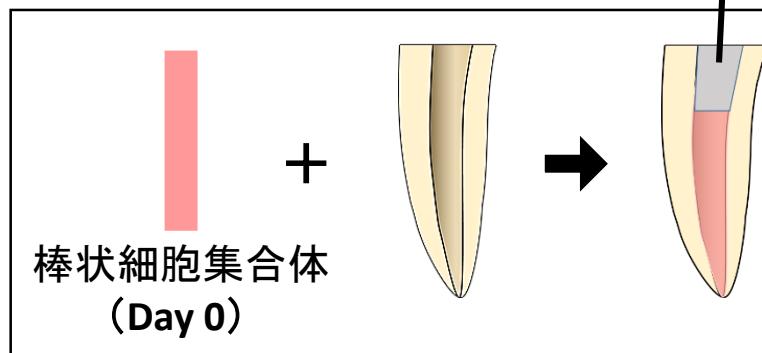
いずれの方法においても、pNIPAAmゲルモールドに細胞を播種してから2日間培養後、室温に静置することでゲルモールドを膨張させ、棒状細胞集合体の取り出しを試みた。



ヒト上顎中切歯



グラスアイオノマー
セメント



免疫不全(SCID)マウス
背部皮下腔に移植

図4. マウス背部皮下への埋入試験の概要

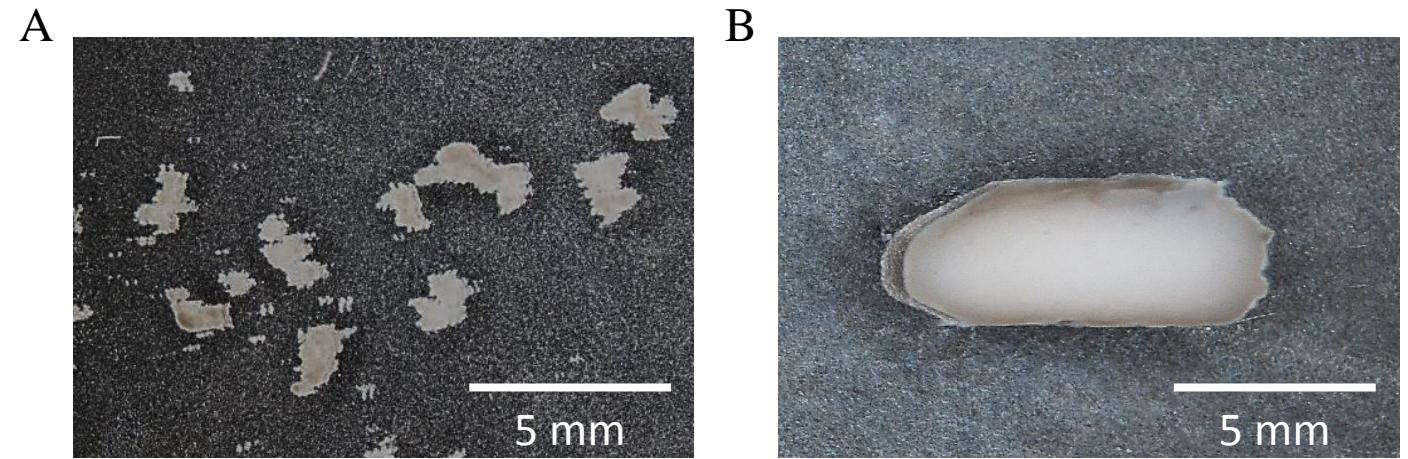


図5. pNIPAAmゲルモールドから取り出したhDPSCsの状態

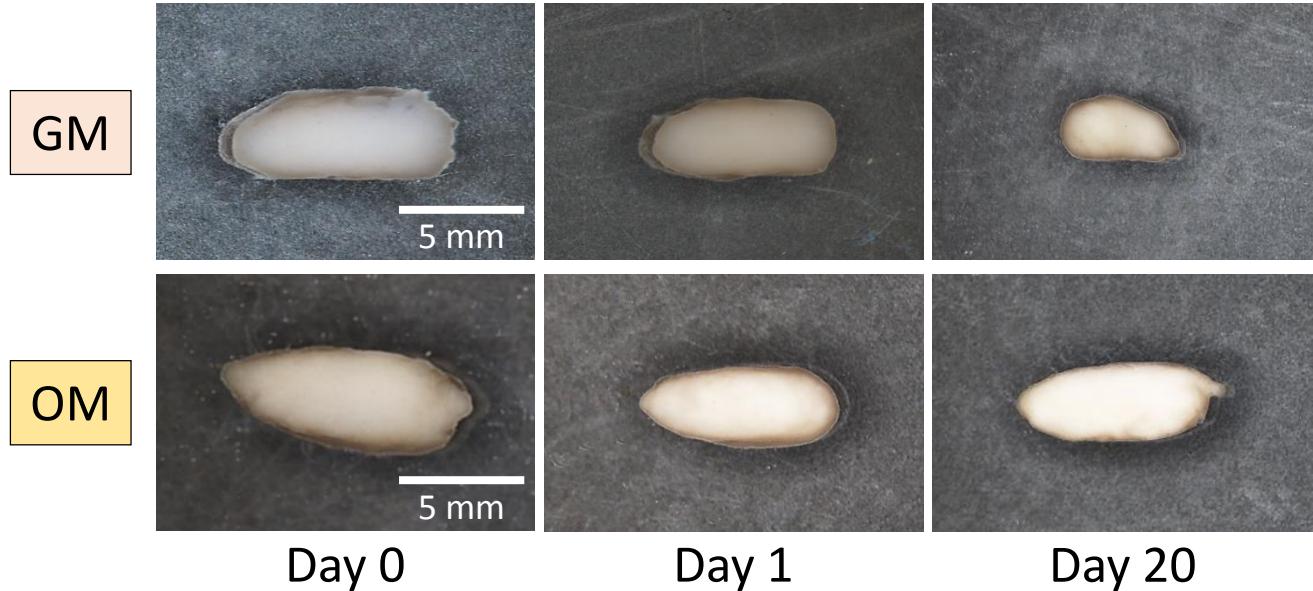
A : Trypsin / EDTAで回収した細胞をゲルモールドに播種した試料

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。

A



B

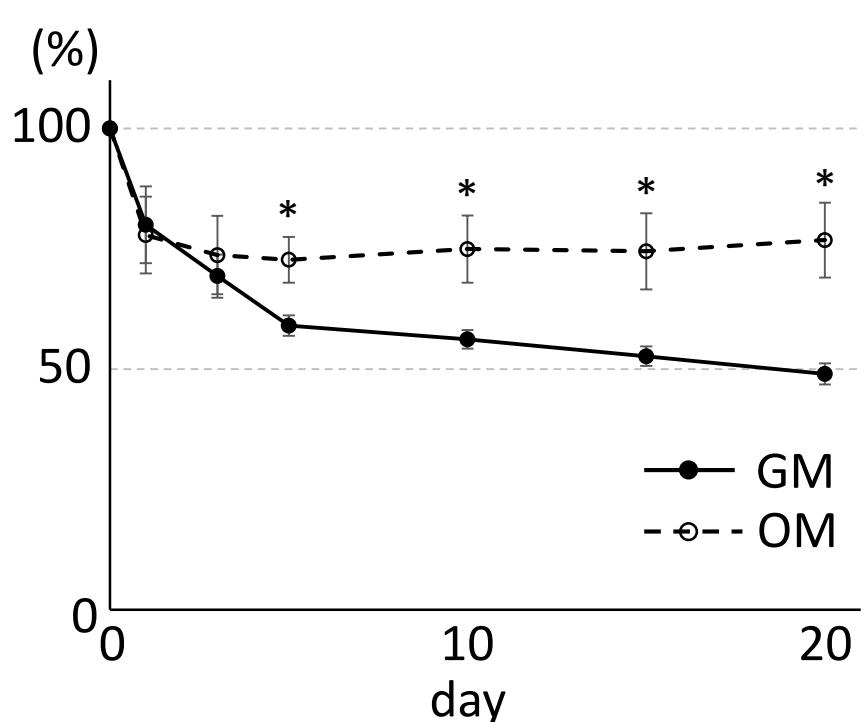


図 6. 棒状細胞集合体の長期培養による変化

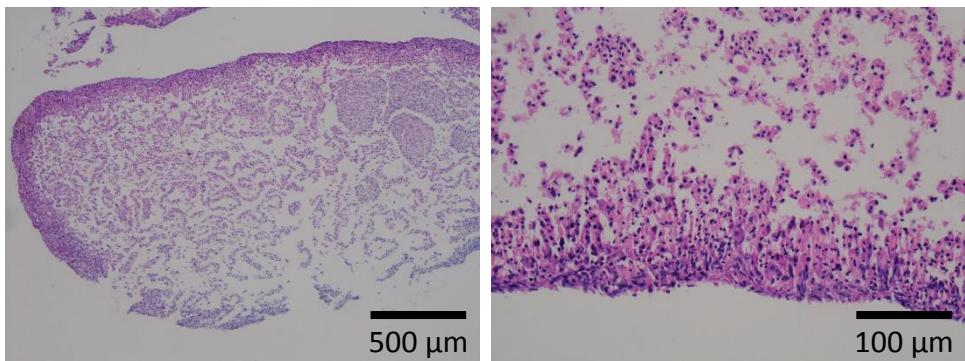
A : 実体顕微鏡像

B : 棒状細胞集合体の大きさ変化

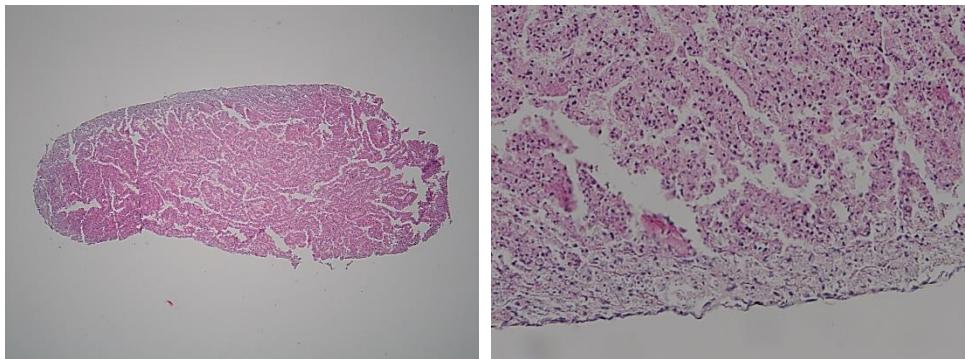
($n = 4$, Two way ANOVA, Bonferroni test, $*p < 0.05$)

エラーバーは標準偏差を示す

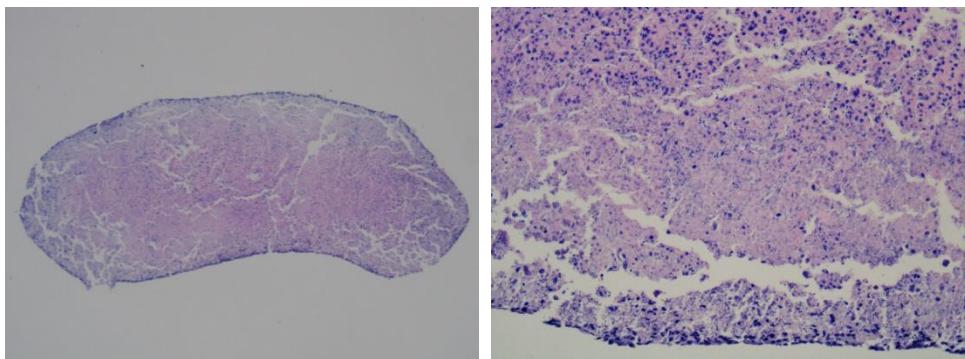
Day 0



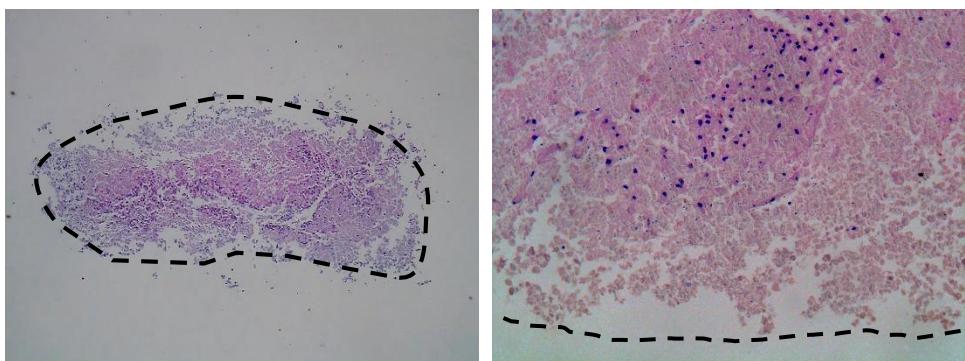
Day 5



Day 10



Day 20



弱拡大像

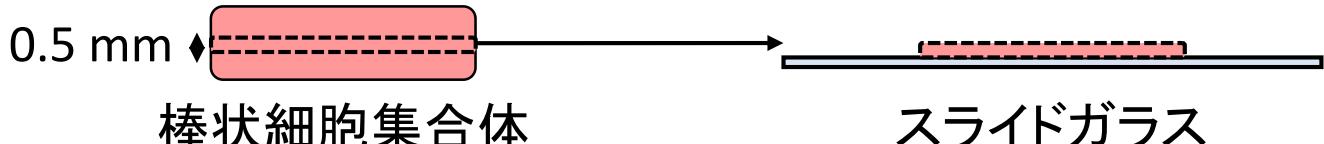
強拡大像

図 7. 棒状細胞集合体のHE染色像

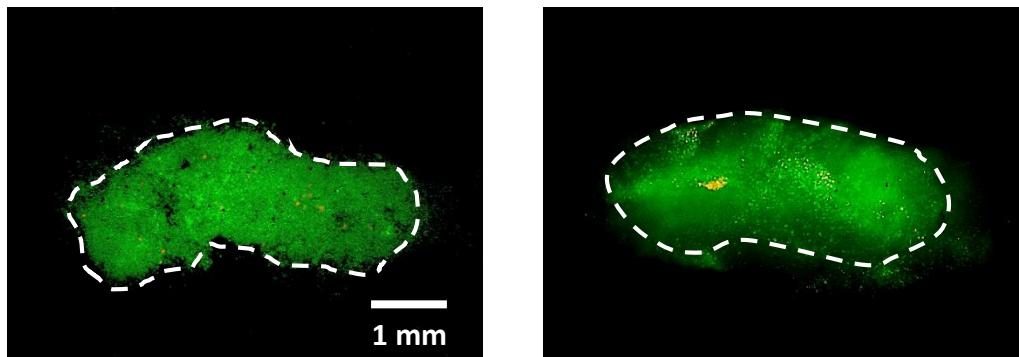
----- 細胞集合体の外縁

A

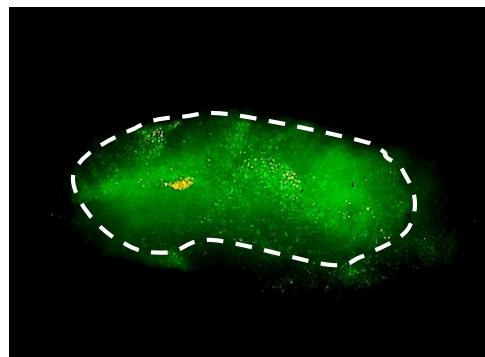
長軸水平方向と平行に中央部をメスで切り出し



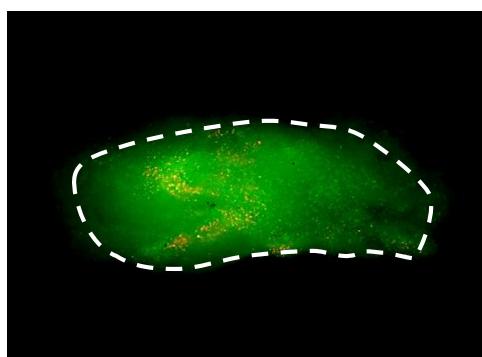
B



Day 0



Day 5



Day 10



Day 20

図8. 棒状細胞集合体のLive/Dead染色像

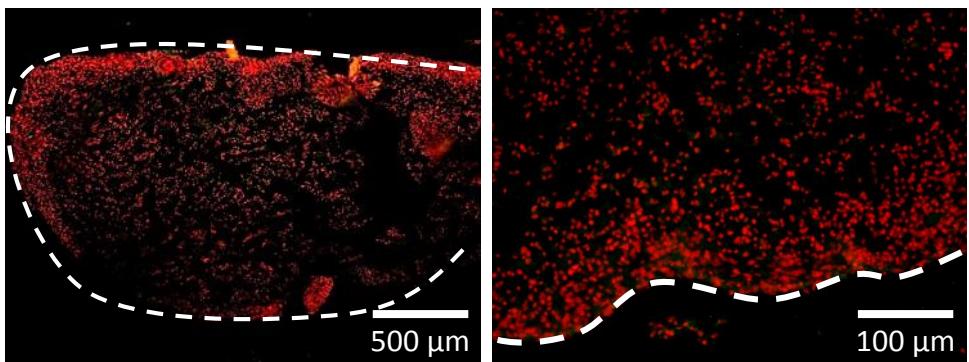
A : Live/Dead染色用試料の切り出し方法

B : Live/Dead染色像

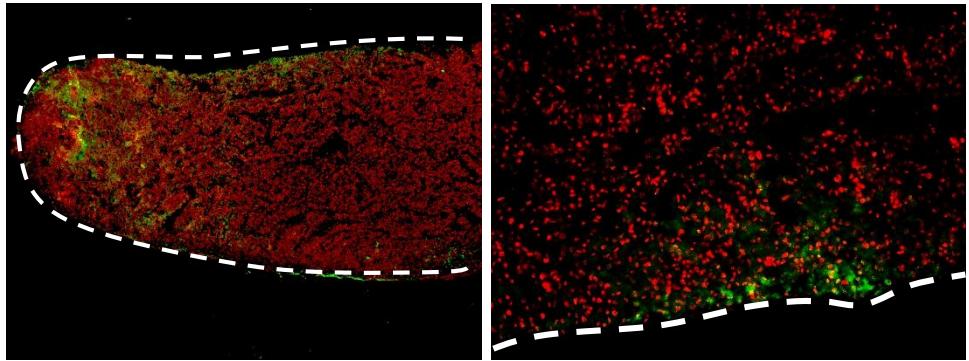
緑：生細胞、赤色：死細胞

----- 細胞集合体の外縁

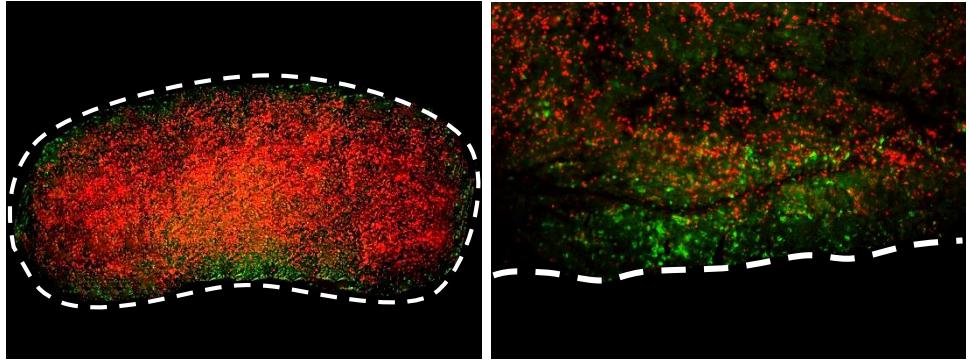
Day 0



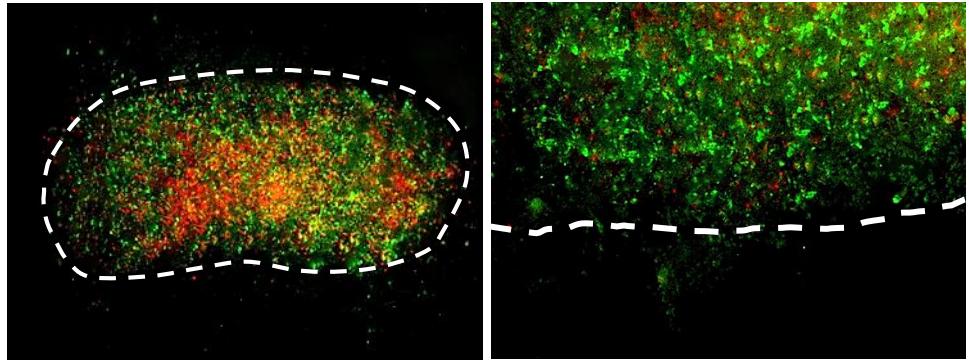
Day 5



Day 10



Day 20



弱拡大像

強拡大像

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

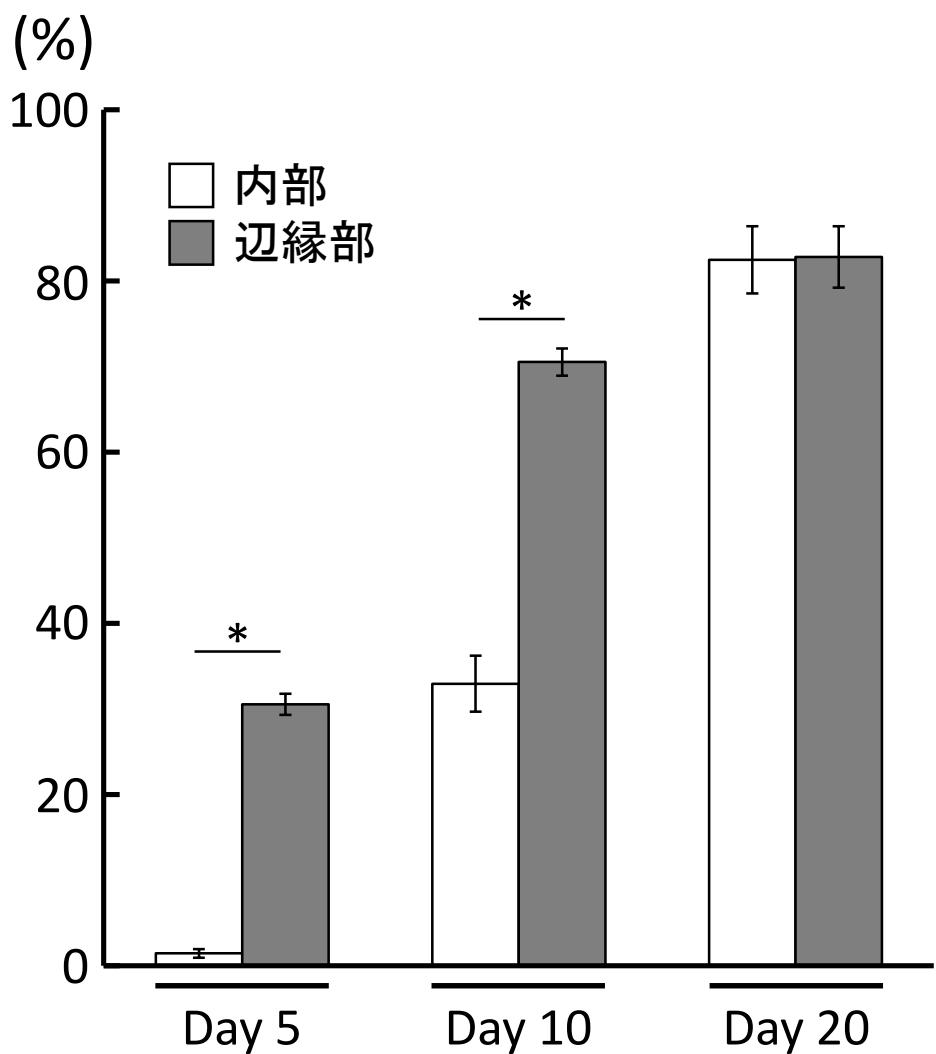
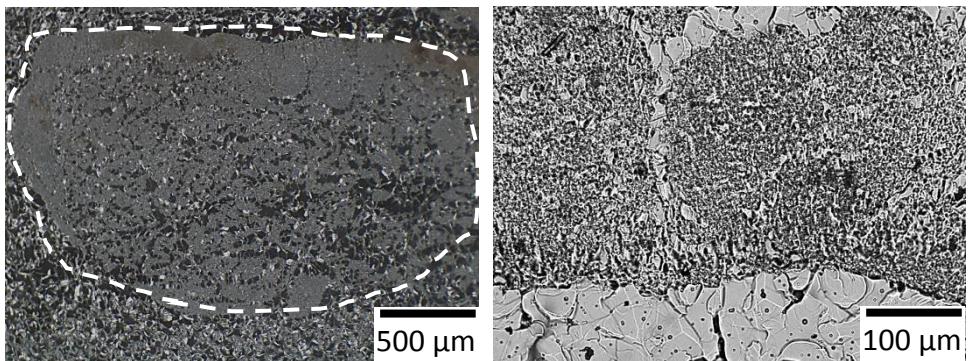


図10. 免疫蛍光染色像におけるDSPP発現領域の定量評価

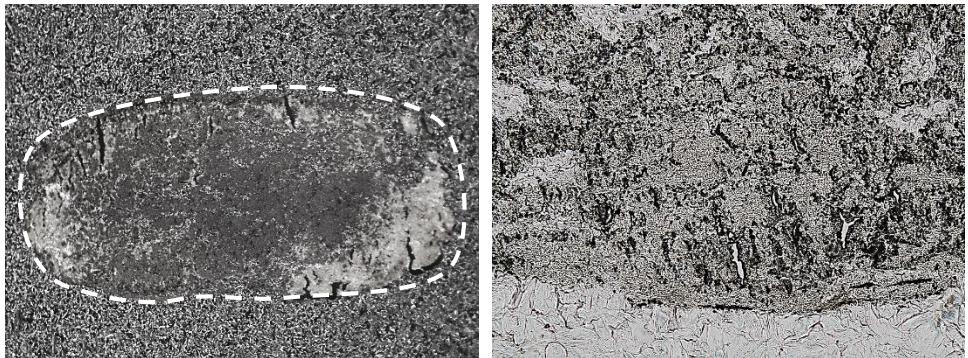
(n = 4, Paired *t*-test, * $p < 0.05$)

エラーバーは標準偏差を示す

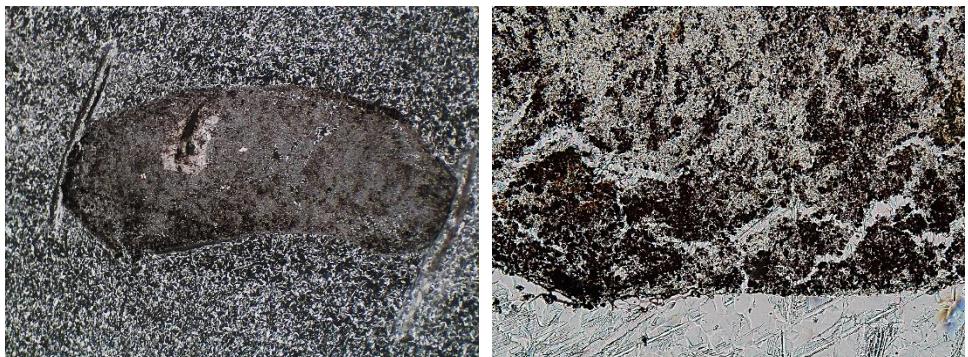
Day 0



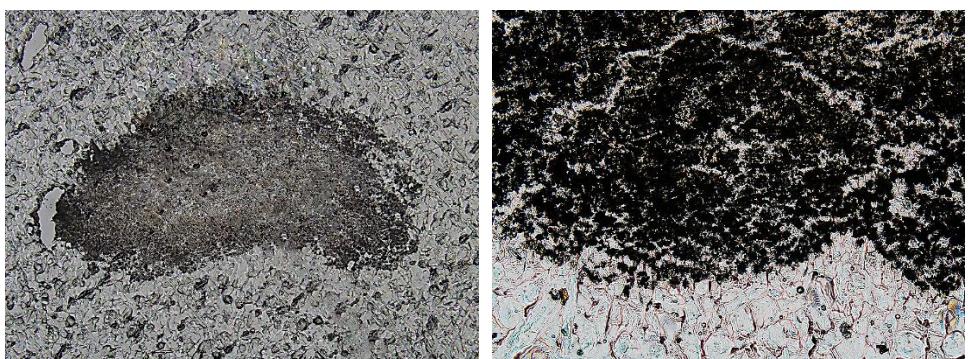
Day 5



Day 10



Day 20



弱拡大像

強拡大像

図11. 棒状細胞集合体のvon Kossa染色像



細胞集合体の外縁

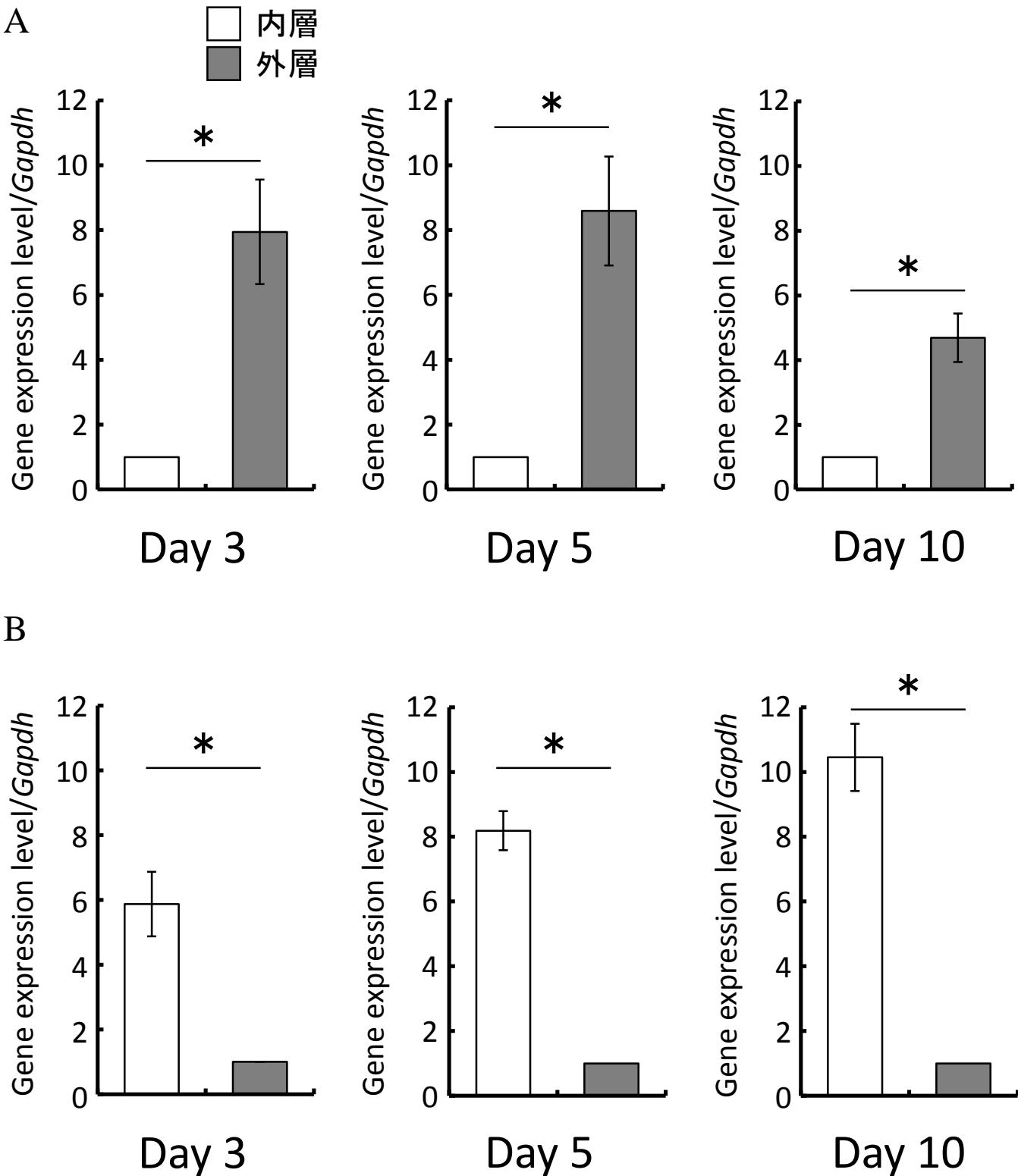
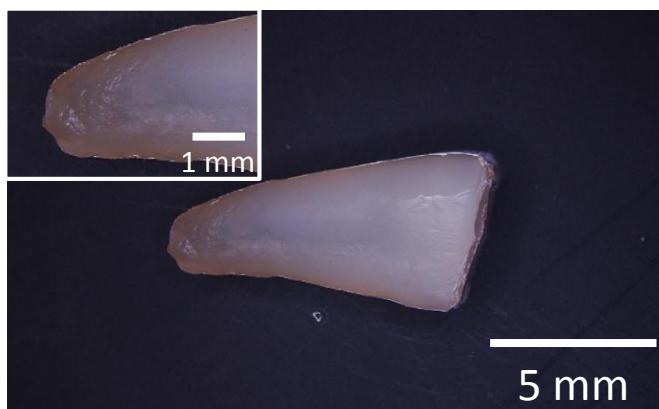


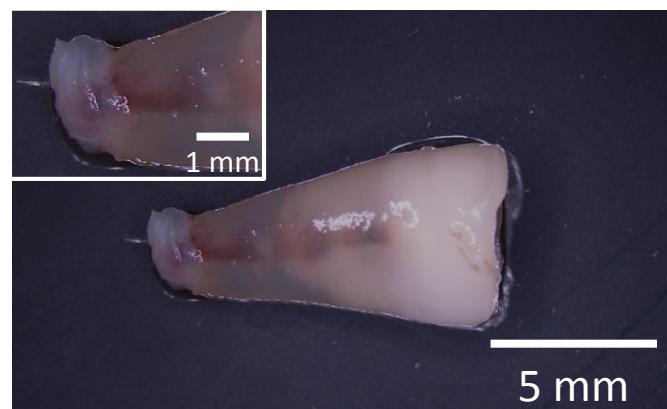
図12. リアルタイムPCRによる*Dspp*と*Nanog*の発現

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



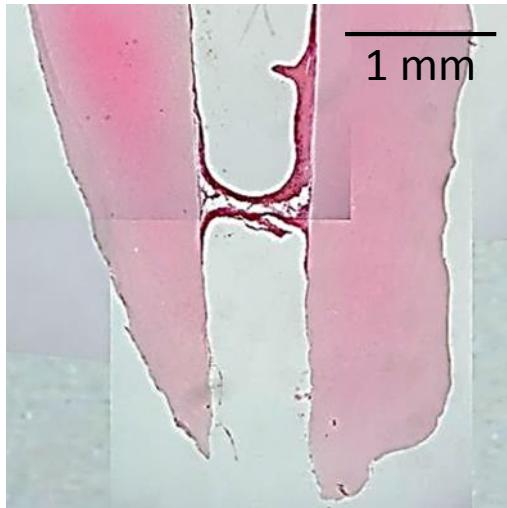
コントロール群



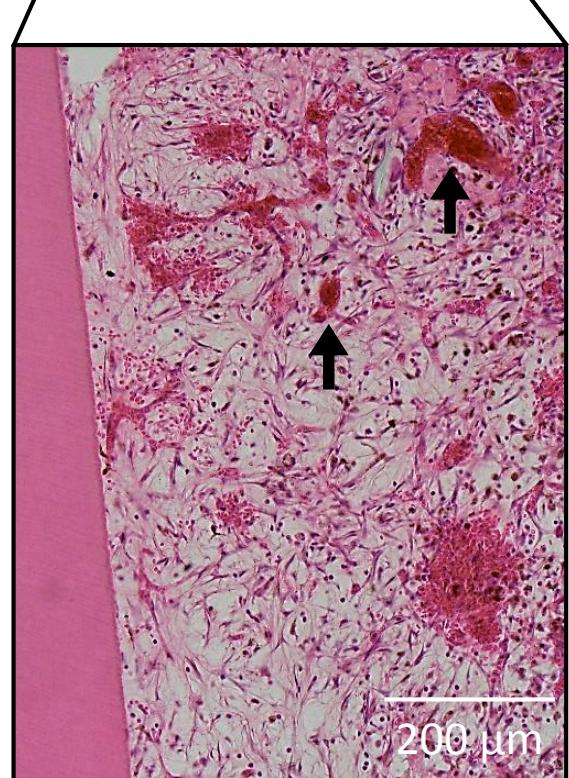
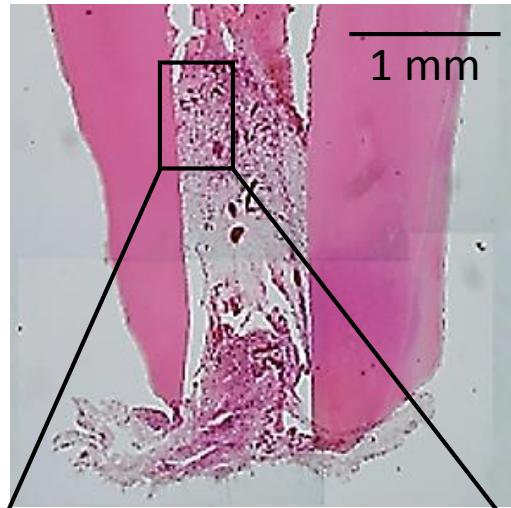
移植群

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 1 4. 埋入試料のHE染色像

➡ 血球成分を含む血管様組織

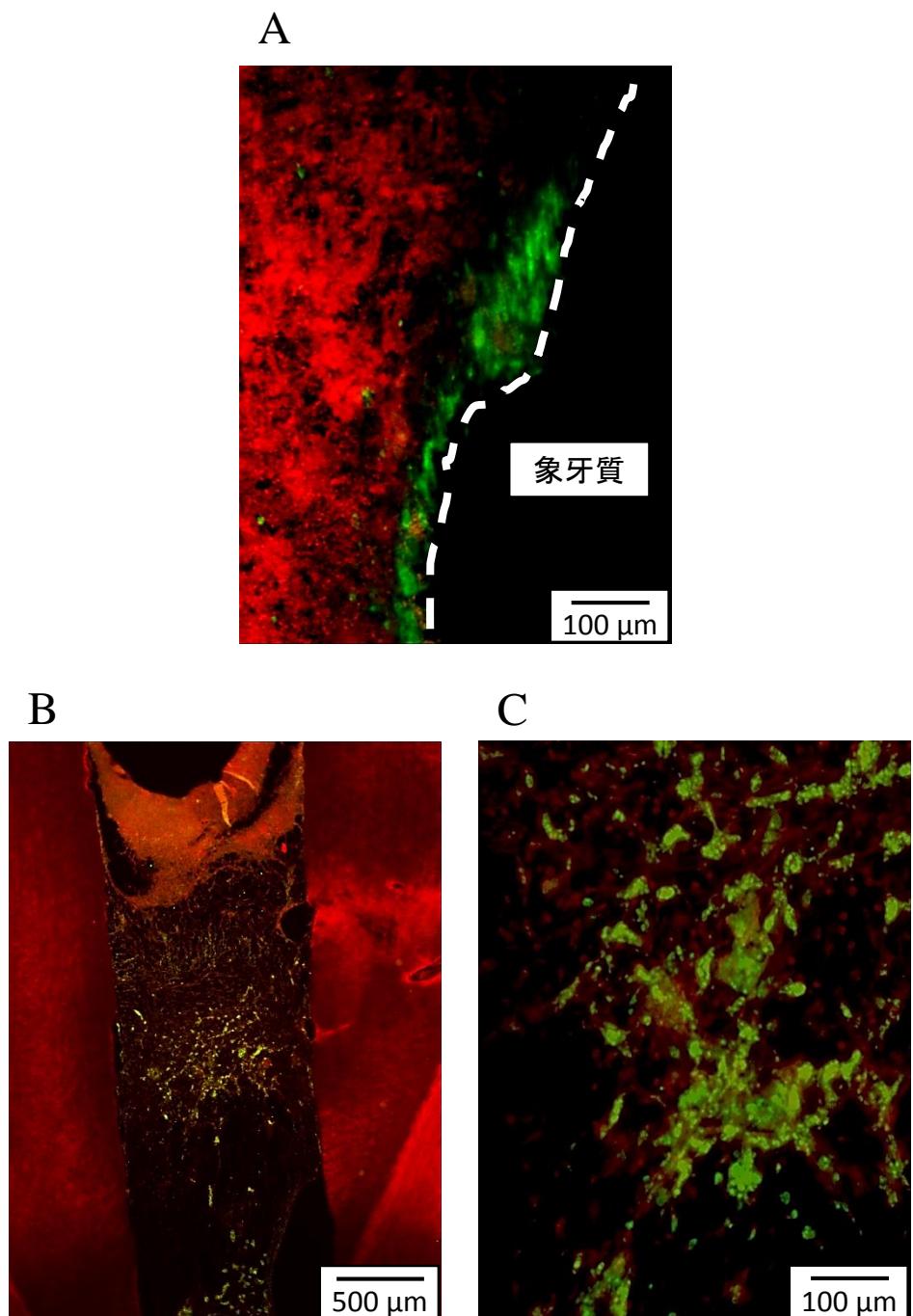


図15. 移植群の免疫蛍光染色像

A : DSPP抗体による染色像と核染色像の重ね合わせ像

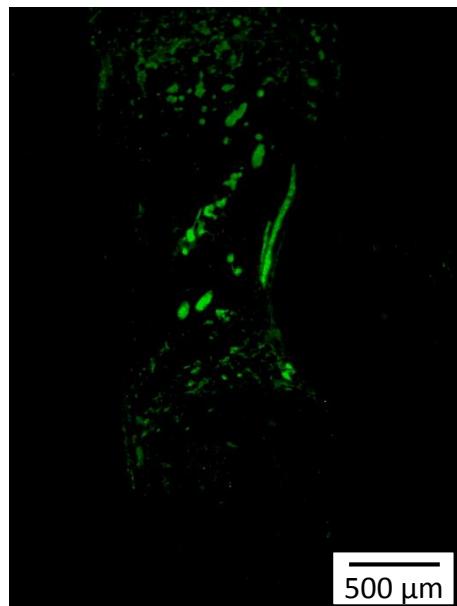
B : STRO-1抗体による染色像と核染色像の重ね合わせ像（弱拡大像）

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）

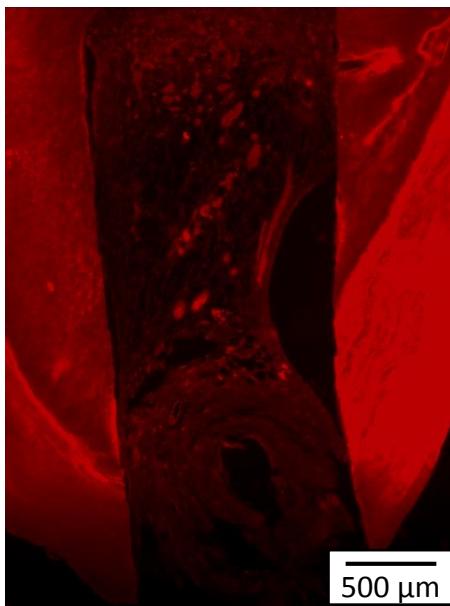
----- 移植体/象牙質境界

緑：陽性細胞
赤：細胞核

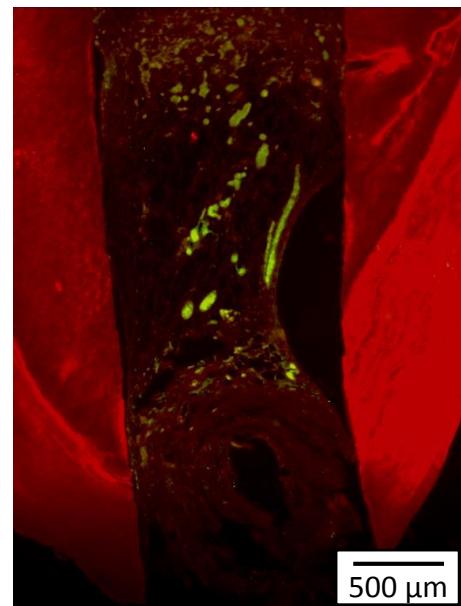
A



B



C



D

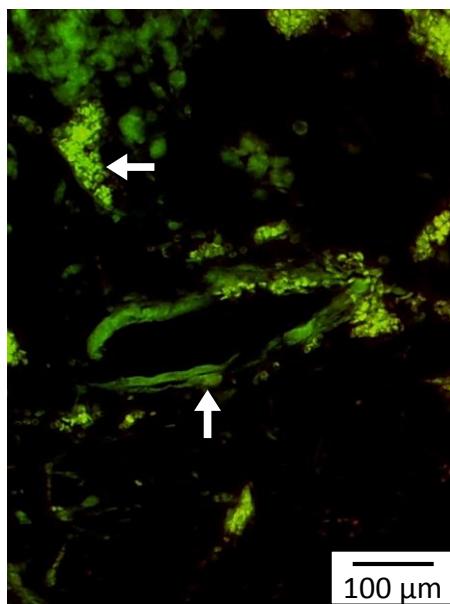


図16 移植群の免疫蛍光染色像

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



管腔様構造