The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯髄幹細胞集合体の血管内皮細胞分化誘導による歯髄様組織の構築
Author(s)	堅田, 千裕
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76294
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　（　堅田　千裕　）	
論文題名	歯髄幹細胞集合体の血管内皮細胞分化誘導による 歯髄様組織の構築

論文内容の要旨

【緒言】

これまで我々のグループは，*in vitro*で構築した人工歯髄様組織を無髄歯根管内に移植することで歯髄再生を達成する，新たな歯髄再生医療技術の確立を目指した研究に取り組んできた．そして，ヒト歯髄幹細胞（DPSC）のみからなるスキャフォールドフリーの細胞集合体を作製することに成功し，このDPSC集合体が人工歯髄様組織として機能することを報告してきた．しかし，作製したDPSC集合体を用いても，無髄歯根管内を完全に満たすような歯髄組織を再生できるとは限らず，根管内の一部に空洞が形成されてしまうことがあるという問題が残されていた．これは，根管内への血流供給が直径1 mm以下の根尖口からのみに限られるため，組織再生が効率よく行われないことが要因であると考えられる．そこで，あらかじめ血管網構造をもつDPSC集合体を*in vitro*で構築して根管内に移植すれば，血管新生を促し，より確実な歯髄再生を効率的に実現できるのではないかと着想した．

本研究では， DPSC集合体を血管内皮細胞分化誘導することによる構造と表現型の変化について検討し，歯髄幹細胞集合体に血管網を誘導する技術を確立した後，分化誘導したDPSC集合体の歯髄再生用材料としての有用性を動物実験により評価した．

【材料と方法】

1．細胞集合体の作製

ヒト第三大臼歯由来DPSCを，DMEMに20% FBSと1% Penicillin/Streptomycinを加えた細胞増殖用培地を用いて100 mm培養皿で培養し，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．セルスクレイパーを用いてDPSCをシート状に回収し，温度応答性高分子ゲルで作製したモールド（12 mm×3 mm×3 mm）に填入して2日間培養後，周囲温度を低下させてモールドを拡張することで棒状のDPSC集合体を得た．

2．細胞集合体の*in vitro*血管内皮細胞分化誘導

1）細胞集合体の血管誘導培養

DPSC集合体の血管内皮細胞分化誘導には，内皮細胞用培地（EGM-2 MV）に血管内皮細胞増殖因子（VEGF，50 ng/mL）を添加した分化誘導培地を用いた．

2）細胞集合体の内部構造観察

細胞集合体を分化誘導培地で最長20日間まで培養し，実体顕微鏡を用いて経時的な形態変化を観察した．また，細胞集合体を構成するDPSCの生存率を評価するため，Live/Dead染色を行い，蛍光顕微鏡で観察した．さらに，同様に培養した試料から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）染色を施すことで内部構造の経時的な変化を観察した．また，細胞集合体内における管腔様構造の形成を評価するために，分化誘導培地で培養したDPSC集合体をFITC蛍光デキストランビーズ（150 kDa）を添加したリン酸緩衝生理食塩水に浸漬し，蛍光顕微鏡で観察した．

3）血管内皮細胞分化誘導したDPSC集合体の表現型の評価

DPSC集合体を分化誘導培地で最長20日間培養し，パラフィン包埋薄切切片を作製後，血管内皮細胞分化マーカーであるCD31とSMA，間葉系幹細胞マーカーであるStro-1の免疫蛍光染色を行い，これらマーカーの局在を蛍光顕微鏡で観察した．さらに，細胞集合体の外層および内層を構成するDPSCの血管内皮細胞分化を検討するために，幹細胞マーカーである*Nanog*，血管内皮細胞マーカーである*VEGFA*と*CXCL1*のmRNA発現量をリアルタイムPCR法によって定量評価した．

3．歯髄再生用材料としての*in vivo*での評価

分化誘導培地で10日間培養することでDPSC集合体に血管網構造を形成し，これをヒト抜去歯根管内に填入した後，免疫不全マウス背部皮下に埋入した．移植6週間後に試料を摘出し，実体顕微鏡およびマイクロCTを用いて観察を行った．さらに，脱灰試料からパラフィン包埋薄切切片を作製し，HE染色およびCD31とStro-1，象牙芽細胞マーカーであるDSPPの免疫蛍光染色を行うことで根管内に形成された組織を観察した．対象群として，細胞増殖用培地で培養した，分化誘導を施していないDPSC集合体を用いた．

【結果および考察】

1．細胞集合体の*in vitro*血管内皮細胞分化誘導

1）細胞集合体の血管誘導培養

DPSC集合体を分化誘導培地で培養すると，集合体の体積は培養7日目までは減少するものの，それ以降は大きさが維持されることが分かった．

2）細胞集合体の内部構造観察

Live/Dead染色の結果から，20日間の培養期間を通して，DPSC集合体を構成する細胞が生存していることが分かった．また,HE染色の結果から，集合体の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．蛍光ビーズを用いたイメージングでは，培養10日目に集合体外層に蛍光ビーズの集積を認め，さらに，培養20日目の試料では明瞭な管腔様構造が形成されている様子が観察された．

3）血管内皮細胞分化誘導した細胞集合体の表現型の評価

免疫蛍光染色の結果，作製直後（培養0日目）のDPSC集合体では，CD31とSMAは発現していなかったが，培養10日目および 20日目には，CD31とSMAがともに集合体外層の細胞に強く発現していた．さらに，免疫蛍光染色の拡大像から，血管内皮細胞マーカーを発現している細胞が，集合体最外層で管腔様構造を形成している様子が観察された．一方，リアルタイムPCRの結果，培養10日目までの集合体において，集合体内層を構成するDPSCは外層の細胞と比較して*Nanog*を有意に高く発現していたが，培養20日目では，集合体内層と外層の細胞で*Nanog*発現量に有意な差は認められなかった．また，*VEGFA*および*CXCL1*のmRNA発現量については，20日間の培養期間を通して，集合体外層の細胞が有意に高い値を示した．これらの結果から，DPSC集合体を血管内皮細胞分化誘導することで，細胞集合体の外層を構成するDPSCが血管内皮細胞へ分化し，管腔様構造を形成したものと考えられた．

2．歯髄再生用材料としての*in vivo*での評価

マイクロCT観察およびHE染色の結果から，血管網構造を有するDPSC集合体を填入した根管内部では，血管網構造をもたない集合体を填入した場合と比較して，形成された歯髄様組織の根管内に占める体積割合が有意に大きいことが分かった．また，免疫蛍光染色の結果から，血管網構造を有するDPSC集合体を填入した試料において，形成された歯髄様組織内にCD31，Stro-1，さらにはDSPP陽性の細胞が観察された．さらに,CD31陽性細胞で形成された血管内部には宿主由来の血球細胞の存在が認められ，DPSCが構築した血管と宿主の血管が吻合していることが示された．これらのことから，管腔様構造を有するDPSC集合体を無髄歯根管内に填入することで，集合体内部への血流供給が効率的に行われ，歯髄様組織の形成が促進したものと考えられた．

【結論】

本研究において，細胞集合体を構成するDPSCを血管内皮細胞へ分化誘導することで，血管網様構造をもった細胞集合体を*in vitro*で構築することに成功した．また，動物実験により，この細胞集合体を無髄歯根管内に填入すると，確実な歯髄様組織の形成が可能であることが明らかとなった．本研究で作製した血管網様構造をもつDPSC集合体は，効率的な歯髄再生を可能にする移植体として応用可能であり，新規の歯髄再生医療を実現させるうえで有用であることが示唆された．

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　　堅田　千裕　　）			
論文審査担当者		（職）	氏　　名
	主 査	教　授	今里　聡
	副 査	教　授	鵜澤　成一
	副 査	准教授	波多　賢二
	副 査	講　師	宇佐美　悠

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯髄幹細胞集合体に血管網を誘導する技術を確立し、歯髄再生用材料としてのその有用性を評価したものである。

本研究の結果、細胞集合体を構成する歯髄幹細胞を血管内皮細胞へ分化誘導することで、血管網様構造をもった細胞集合体を *in vitro* で構築できることが明らかとなった。また、動物実験により、この細胞集合体を無髄歯根管内に填入すると、確実な歯髄様組織の形成が可能であることが示された。

以上の研究成果は、血管内皮細胞分化誘導した細胞集合体が、効率的な歯髄再生を可能にする移植体として応用可能であり、新規の歯髄再生療法を実現するうえで有用であることを示すものである。よって、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。