

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学 位 論 文

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

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

堅田 千裕

目次

I 緒言	4
II 材料と方法	9
1. 細胞集合体の作製	
1) pNIPAAm ゲルモールドの設計と作製	
2) DPSC 由来細胞集合体の作製	
2. 細胞集合体の <i>in vitro</i> 血管内皮細胞分化誘導	10
1) 細胞集合体の血管誘導培養	
2) 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) 蛍光ビーズによるイメージング	
3) 血管内皮細胞分化誘導した DPSC 集合体の表現型の評価	
(1) 免疫蛍光染色	
(2) 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	15
1) 埋入用抜去歯の準備	
2) 埋入実験	

3) 実体顕微鏡観察	
4) マイクロ CT 解析	
5) 組織学的評価	
4. 統計学的解析	18
III 結果	19
1. 細胞集合体の <i>in vitro</i> 血管内皮細胞分化誘導	
1) 細胞集合体の血管誘導培養	
2) 細胞集合体の内部構造観察	19
(1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色	
(2) Live/Dead 染色	
(3) 蛍光ビーズによるイメージング	
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	20
(1) 免疫蛍光染色	
(2) リアルタイム PCR	
2. 歯髄再生用材料としての <i>in vivo</i> での評価	22
1) 実体顕微鏡観察	
2) マイクロ CT 解析	

3) 組織学的評価	
IV 考察	25
V 結論	32
VI 謝辞	33
VII 参考文献	34
VIII 図表	48

I 緒言

平成 30 年度の統計によると、わが国においては、歯周病、う蝕、ならびに破折が歯を喪失する主要な原因であるとされているが、歯髓の状態別では、無髓歯においてより喪失率が高いと報告されている¹⁻⁴。特に、失活歯の破折は抜歯という結果に直結することが多く、歯の生存率に関わる深刻な問題である。

Randow ら⁵の研究では、無髓歯は有髓歯の 2 倍以上の荷重レベルまで痛みを感じないことが明らかとなっており、歯髓の除去によって咬合力を感知する能力が低下することが、失活歯に破折が生じやすい一因であると考えられる。また、歯髓を失った歯では、う蝕や根尖性歯周炎の発症リスクが増加する⁶⁻¹⁰ため、より抜歯に至りやすいと言える。

歯髓保存の近年の動向として、露髓の回避を意図した段階的う蝕除去（歯髓温存療法）への評価の高まりが挙げられる¹¹⁻¹⁴。しかしながら、う蝕または外傷などにより歯髓が外部環境に曝され、さらに感染が生じることで歯髓を保存できなくなった場合、抜髓処置を含めた歯内療法が行われることとなる。一般的に、従来の歯内療法は、根管内の感染した歯髓および感染源である細菌を除去したのちに、ガッタパーチャポイントや糊剤を用いて根管内を緊密に充填することで生体内外の交通を遮断することを目的としている¹⁵⁻¹⁹。こういった根

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²⁰⁻²⁴が、抜髄によって失われた歯髄の機能を再生することはできない。

歯髄には、炎症や免疫応答の担い手であるマクロファージや樹状細胞が豊富に分布し、これらが病原物質の流入に拮抗している^{25,26}。また、歯髄には神経線維が密に分布しており、外来刺激に対する警告を痛みとして発することができる²⁷⁻²⁹。さらに、歯髄内部に存在する歯髄幹細胞(Dental Pulp Stem Cells: DPSC)は硬組織形成能を有し、象牙質を形成することで外来刺激に対する物理的バリアを構築する^{30,31}。したがって、無髄歯に歯髄を再生させることは、これら歯の防御修復機構を再生させることにつながり、歯の寿命を延ばすうえで大きな意義がある。

Tissue Engineering (組織工学) とは、生体機能を備えた人工組織や人工臓器を作り出す手法に関する学問領域のことであり、この概念は、1993年に、医師である Joseph P. Vacanti と、生体工学者である Robert Langer によって提唱された³²。細胞、足場(スキャフォールド)、成長因子という三つの素材を適切に組み合わせることで、生体内あるいは生体外で臓器や組織を意図的に創製できるという考えに基づいており、再生医療を実現する有効な手段の一つとして考えられている³³⁻⁴⁰。近年、歯科領域にもこの組織工学の概念が導入され、歯髄再生医療の実現に向けて多くの組織工学的手法を応用した試みがなされるように

なった⁴¹⁻⁵⁰。例えば、Huangら⁴⁷は、歯由来の細胞と poly-D, L-lactide/glycolide 共重合体のスキャフォールドを組み合わせ、水平にスライスした 6~7 mm 厚さのヒト歯根に填入し、重症複合免疫不全 (Severe Combined Immunodeficiency : SCID) マウスの背部皮下に埋入したところ、スライス歯根内に象牙質様組織および歯髄様組織が形成されたと報告している。また、Nakashimaら^{48,49}は、DPSC、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た。その後、同研究グループは本手法を用いた臨床研究を行い、第三大臼歯あるいは小臼歯から採取した自己由来 DPSC を用いることで、ヒト無髄歯に歯髄電気診で反応を認める歯髄様組織を再生させることができたと報告している⁵⁰。

ところで、上述した報告では、そのすべてにおいて、細胞が生存、増殖する場として生分解性スキャフォールドが用いられているが、外因性物質であるスキャフォールドは、生体内で感染や炎症を引き起こす可能性が指摘されている⁵¹⁻⁵⁶。そこで、Sasaki と Imazato らのグループは、スキャフォールドフリーの細胞のみからなる歯髄幹細胞集合体を *in vitro* で作製し、これを無髄歯の根管内に移植するという、スキャフォールドを用いない新たな歯髄再生技術の確立を目指した研究を行ってきた^{57,58}。そして、温度応答性高分子 Poly N-isopropylacrylamide (pNIPAAm) ゲルモールドを用いることで、ヒト由来 DPSC

のみからなる三次元細胞集合体を *in vitro* で作製でき、さらに、作製した細胞集合体が無髄歯根管において歯髄再生能を発揮することを示してきた⁵⁷。しかし、この方法では、根管内すべてを満たす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ケースがかなりの頻度で認められるという問題が残っていた。これは、永久歯の歯根長が10 mm以上あるのに対し、根管内への血流の供給が、1 mm以下という小さな根尖口からのみであることによると考えられる。すなわち、根尖口のみからの血管形成では、移植した細胞集合体の中心部まで酸素や栄養が到達せず、その結果、集合体を構成する DPSC が壊死したことで、根管内の一部に組織が形成されない部位が発生したものと考えられた。したがって、歯根全体に歯髄を再生させるためには、根尖からの血流を素早く根管内部まで導き、移植した細胞を生存させることが必要不可欠であると言える。

以上のようなことから、あらかじめ血管網構造をもつ細胞集合体を *in vitro* で構築して根管内に移植すれば、宿主から集合体内部へ迅速に血流が供給され、より確実な歯髄再生を達成できるのではないかと着想した。そこで本研究では、まず、DPSC 集合体を血管内皮細胞へ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
評価することを目的とした。

II 材料と方法

1. 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、直径 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、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) でエポキシ樹脂を用いて造形した。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、ペルオキシ二硫酸アンモニウム (Nakalai、京都)、およびテトラメチルエチレンジアミン (Nakalai) を加えた溶液をこの鋳型に流し込み、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、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 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline : PBS、Thermo Fisher、MA、USA) に 48 時間浸漬することで内部のエタノールを除去し、実験に供した。

2) DPSC 由来細胞集合体の作製

細胞増殖用培地 (Growth Medium : GM) として 20% Fetal Bovine Serum (FBS、Japan Bio Serum、広島)、1% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) 含有の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM、Wako) を使用し、成人第三大臼歯由来の DPSC (Lonza、Basel、Switzerland) を 37°C、5%二酸化炭素環境下にて 100 mm Culture Dish を用いて培養した。100%コンフルエントを確認してからさらに 5 日間培養を行った後、セルスクレイパー (Corning、NY、USA) を用いてシート状になった細胞を回収し、滅菌ピンセットで把持して、pNIPAAm ゲルモールドに填入した。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 15 分間静置して膨張させ、モールドから DPSC 集合体を取り出した。

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

前述のようにして作製した DPSC 集合体を血管内皮細胞へ分化誘導するため、血管内皮細胞用培地である EGM-2MV BulletKit (Lonza) に血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGF) (50 ng/mL、Recombinant Human VEGF₁₆₅、R&D SYSTEMS、MN、USA) を添加した血管内皮細胞分化誘導培地

(Endothelial Differentiation Medium : EM) を用いて最長 20 日間まで培養した (EM 群)。

まず、培養による細胞集合体の形態変化を調べるため、経時的に実体顕微鏡観察を行い、得られた像から、画像解析ソフト (Image J、National Institutes of Health、MD、USA) を用いて細胞集合体の面積を計測した。GM で培養した細胞集合体をコントロール (GM 群) とした。試料数は各群 5 とした。

2) 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

ゲルモールドから取り出した直後 (培養 0 日目)、および 5、10、20 日間培養後の細胞集合体を 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、自動パラフィン包埋装置 (CT-Pro20、Genostaff、東京) を用いてパラフィン包埋した。次に、薄切切片作製装置 (2125RT、Leica、Wetzlar、Germany) にて、細胞集合体の長軸方向と平行に厚さ 5 μm の薄切切片を作製し、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、0.5% エオシン Y

(Wako) 溶液に 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 (No.15、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 (Thermo Fisher) を用いて、生細胞を Calcein AM、死細胞を Ethidium Homodimer-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、死細胞を 559 nm の波長で観察した。また、得られた画像から、画像解析ソフト (Image J) を用いて細胞集合体の断面における生細胞と死細胞の割合を算出した。

(3) 蛍光ビーズによるイメージング

細胞集合体内に管腔様構造が形成されているか否かを観察するために、デキストランビーズを用いて蛍光イメージングを行った。EM あるいは GM で最長 20 日間培養した細胞集合体を、PFA に 48 時間浸漬して固定した後、PBS で洗浄し、FITC-デキストラン (150 kDa、Sigma-Aldrich) を 128 倍に希釈した PBS

に浸漬した。続いて、試料をシーソーシェーカー (Bio Craft、東京) 上に静置し、室温で 24 時間保管後、長軸方向と平行に中央部分 (厚さ 0.5 mm) を外科用メス (No.15) で切り出し、蛍光顕微鏡 (TE2000) を用いて 490nm の波長で観察した。

3) 血管内皮細胞分化誘導した DPSC 集合体の表現型の評価

(1) 免疫蛍光染色

培養 0、5、10、20 日目の DPSC 集合体を、PFA を用いて 48 時間固定した後、パラフィン包埋し、長軸方向と平行に厚さ 5 μm の薄切切片を作製した。切片の脱パラフィン処理を行い、蒸留水で 2 回洗浄後、1 mg/mL Trypsin (Sigma-Aldrich) を 37°C 環境下で 60 分間作用させた。さらに、PBS で洗浄後、0.3% TritonX-100 (Alfa Aesar、Lancashire、UK)、および 0.1% ウシ血清アルブミン (Nacalai tesque、京都) を添加した PBS に室温で 30 分浸漬し、Monoclonal mouse anti-human CD31 抗体 (M0823、Dako、CA、USA) を抗体希釈用緩衝液 (Agilent、CA、USA) で希釈 (1/50) した溶液を 4°C で一晩作用させた。その後、洗浄緩衝液 (Dako) で 10 分間洗浄し、二次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen、CA、USA) を抗体希釈用緩衝液で希釈 (1/250) した溶液を、遮光しながら室温で 1 時間作用させた。続いて、洗浄緩衝液で 10 分間洗浄し、

Hoechst33342 (Invitrogen) を用いて細胞核の染色を行った。染色した試料は水溶性封入剤 (VECTASHIELD、Funakoshi、東京) を用いて封入した。同様の方法で、Monoclonal mouse anti-human smooth muscle actin (SMA) 抗体 (sc-53142、Santa Cruz Biotechnology、TX、USA)、および Monoclonal mouse anti-human Stro-1 抗体 (sc-47733、Santa Cruz Biotechnology) を用いた免疫蛍光染色を行った。染色した試料は蛍光顕微鏡 (TE2000) を用いて観察した。

(2) リアルタイム PCR

培養 5、10、20 日目の細胞集合体を PBS で 2 回洗浄後、外層 (表層から 0.5 mm の領域) と内層 (中心部半径 0.5 mm の領域) に外科用メス (No.15) で切り分けた。次に、それぞれの層を構成する DPSC について、血管内皮細胞マーカーである *VEGFA*、*C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL1)*、および幹細胞マーカーである *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 μ L 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 5.0 μ L の Stop Solution を加えたものをサンプルライセートとした。10 μ L のサンプルライセートに、25 μ L の 2X RT Buffer、2.5 μ L の 20X RT Enzyme Mix、12.5 μ L 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 μ L の 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 (*VEGFA*、*CXCL1*、*Nanog*、*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase : GAPDH*、Applied Biosystems)、4.0 μ L 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。集合体外層の DPSC の遺伝子発現量の平均値を 1 とし、内層の細胞の遺伝子発現量を相対値として求めた。試料数は 4 とした。

3. 歯髄再生用材料としての *in vivo* での評価

血管誘導を施した細胞集合体の無髄歯根管内における歯髄再生能を評価することを目的として、ヒト抜去歯の根管内に細胞集合体を填入し、SCID マウスの背部皮下腔への埋入実験を行った。なお、本実験は、大阪大学大学院歯学研究所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

ヒト抜去単根管歯を IsoMet (Buehler、IL、USA) で切断し、根尖から 12 mm の長さの歯根を得た。根尖部も含め、ステンレス K-file (MANI、栃木) 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ーン (NISHIKA、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 で保管した (図 1A)。

2) 埋入実験

EM で 10 日間培養した細胞集合体を、3-1) で準備した根管内に填入し、歯冠側 3.0 mm の部位までをケイ酸カルシウムセメント (ProRoot MTA、Dentsply、OK、USA) で封鎖して埋入用試料とした (Vasculature-Induced 群 ; VI 群)。6 匹の 6 週齢オス SCID マウス (日本クレア、東京) に対し、1.0 mg/mL ドミトール (塩酸メデトミジン、日本全薬工業、福島)、5.0 mg/mL ドルミカム (ミダゾラム、アステラス製薬、東京)、5.0 mg/mL ベトルファール (酒石酸ブトルファンール、Meiji Seika ファルマ、東京) を混合した三種混合麻酔薬を腹腔内投与し、剃毛後、両側背部に外科用メス (No.15) を用いて 15 mm の切開を加えた。そして、細胞集合体を填入した試料を背部皮下腔に埋入し、創面を絹糸 (ネスコーチャー、アルフレッサファーマ、大阪) で縫合した (図 1B)。なお、GM で 10 日間培養した細胞集合体をヒト根管内に填入し、同様にして SCID マウスに埋入した試料をコントロール群とした。試料はマウスの左右背部皮下腔にそ

れぞれ 1 つずつ埋入し、試料数はそれぞれ 6 とした。埋入実験の概要を図 1C に示す。

3) 実体顕微鏡観察

埋入 6 週間後に炭酸ガス安楽死装置（夏目製作所、東京）を用いて、マウスを二酸化炭素の吸入によって屠殺し、その後、背部皮下腔より取り出した試料を 10%中性緩衝ホルマリン液（Wako）に 48 時間浸漬することで固定処理を行った。その後、試料を PBS で 2 回洗浄し、実体顕微鏡（SMZ745T）を用いて観察した。

4) マイクロ CT 解析

実験動物用 3D マイクロ X 線コンピュータ断層撮影装置（マイクロ CT、R_mCT2、リガク、東京）を用いて、管電流 90 kV、管電圧 80 μ A、有効視野 10 mm の条件で撮影し、埋入した試料の内部構造を観察した。また、得られたマイクロ CT 画像から、骨解析計測ソフトウェア（TRI/3D-BON、RATOC、東京）を用いて三次元画像解析を行い、根管内に形成された歯髄様組織の体積割合を算出した。

5) 組織学的評価

埋入試料を、固定処理後にモールス液 (Wako) に 2 週間浸漬することで脱灰し、自動パラフィン包埋装置 (CT-Pro20) を用いてパラフィン包埋した。そして、歯軸と平行に厚さ 8 μm の薄切切片試料を作製し、2) - (1) と同様の方法で HE 染色を施した。染色した試料は、光学顕微鏡 (CLIPSE Ci) を用いて観察した。

また、作製した薄切切片に対して、Monoclonal mouse anti-human CD31 抗体 (M0823)、Monoclonal mouse anti-human Stro-1 抗体 (sc-47733) および Monoclonal mouse anti-human dentin sialophosphoprotein (DSPP) 抗体 (sc-73632、Santa Cruz Biotechnology) を用いて、3) - (1) と同様の方法で免疫蛍光染色を施した。さらに、CD31 の免疫蛍光染色画像を用いて、CD31 陽性細胞で形成された血管の単位面積当たりの数について定量評価を行った。試料数はそれぞれ 4 とした。

4. 統計学的解析

Live/Dead 染色の結果については One-way ANOVA, Turkey's HSD test、また、リアルタイム PCR、歯髓様組織の体積割合、および歯髓様組織内の血管数については 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. 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

pNIPAAm ゲルモールドから取り出した直後(培養 0 日目)、および EM で 5、10、20 日間培養した細胞集合体の実体顕微鏡像を図 2A に示す。培養 0 日目で長径約 7 mm、短径約 3 mm であった DPSC 集合体は、EM 群、GM 群のいずれにおいても、培養 7 日まで主に長径方向の収縮が認められ、7 日後には、EM 群で $65.3 \pm 3.1\%$ に、GM 群で $64.7 \pm 6.1\%$ に大きさが減少した(図 2B)。培養 7 日目を以降は、わずかに減少する傾向はあるものの、細胞集合体の大きさや形態が維持され、EM 群と GM 群間でも大きさに有意差を認めなかった。

2) 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 日目の細胞集合体、および EM で 5、10、ならびに 20 日間培養した細胞集合体の HE 染色の結果を図 3 に示す。培養期間を通して、細胞集合体の外層に細胞が密に存在している様子がみられた。一方、細胞集合体の中心部は、培養 0 日目では疎な構造を呈していたが、培養期間が長くなるにつれ、密な構造に変化することが分かった。

(2) Live/Dead 染色

Live/Dead 染色の結果、細胞集合体は主に生細胞によって構成されており、集合体の辺縁部のみに死細胞が局在していることが分かった (図 4A)。細胞集合体内の生細胞の割合は、培養 0 日目で $98.7 \pm 1.2\%$ 、5 日目で $98.6 \pm 1.2\%$ 、10 日目で $97.5 \pm 1.4\%$ で有意差が認められなかったが、培養 20 日目では $95.1 \pm 2.2\%$ となり、0 日目、5 日目と比較して有意に低下した (図 4B)。

(3) 蛍光ビーズによるイメージング

培養 0 日目および 5 日目の細胞集合体において、GM 群および EM 群ともに蛍光ビーズの局在は認められなかった (図 5)。一方、培養 10 日目の EM 群においては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。しかし、GM 群ではビーズの集積や管腔様構造は観察されなかった。

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

(1) 免疫蛍光染色

CD31 陽性細胞は、培養 0 日目ではわずかに認められる程度であったが、培養時間の経過とともに増加し、10 日目には集合体全体に観察されるようになり、さらに、培養 20 日目の集合体外層の細胞に CD31 の強い発現が確認された (図 6)。また、強拡大での観察では、培養 10 日目から CD31 陽性細胞が管腔様構造を形成し、培養 20 日目には、外層において明瞭な管腔様構造の形成が認められた (図 7)。

SMA の免疫蛍光染色の結果においても、CD31 の結果と同様に、培養 10 日目および 20 日目に、集合体外層の細胞において SMA の強い発現が認められた。また、培養 20 日目には、SMA 陽性細胞が集合体外層で網目状構造を形成している様子が観察された (図 8)。

一方、間葉系幹細胞マーカーである Stro-1 の免疫蛍光染色では、作製直後の細胞集合体に陽性細胞が存在していることが分かった。また、20 日間の分化誘導後の集合体内においても陽性細胞は存在していたが、培養期間が長くなるにつれて、集合体外層の Stro-1 陽性細胞は減少した (図 9)。

(2) リアルタイム PCR

血管内皮細胞マーカーである *VEGFA* については、集合体外層を構成する細胞の発現量を 1 とした場合、集合体内層の細胞は、培養 5 日目に 0.22 ± 0.05 、

10 日目に 0.27 ± 0.02 、20 日目に 0.31 ± 0.06 の発現量を示し、20 日間の培養期間を通して、集合体外層の細胞が内層の細胞と比較して有意に高い値を示した (図 10)。また、*CXCL1* についても、集合体内層での発現量は、外層の発現量を 1 とすると、培養 5 日目で 0.026 ± 0.001 、10 日目で 0.14 ± 0.02 、20 日目で 0.32 ± 0.05 であり、20 日間の培養期間を通して、集合体内層の細胞と比較して、外層の細胞において有意に高い発現が認められた (図 11)。

一方、幹細胞マーカーである *Nanog* の発現量は、集合体外層での発現量を 1 とした場合、内層では、培養 5 日目で 1.82 ± 0.61 、10 日目で 3.00 ± 0.61 を示し、培養 10 日目までは、集合体内層の細胞は外層の細胞と比較して有意に高かった。しかし、培養 20 日目では、集合体内層の発現量は 1.17 ± 0.16 となり、集合体内層と外層の細胞間で *Nanog* の発現量に有意差は認められなかった (図 12)。

2. 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

取り出した試料の実体顕微鏡観察像を図 13 に示す。コントロール群では埋入前の試料と比較して根尖部の色調に変化はなかったが、VI 群は根尖部が赤色を呈しており、血液成分を含む組織が形成されている様子が観察された。

2) マイクロ CT 解析

6 週間埋入後に摘出した試料をマイクロ CT で観察した結果、コントロール群では根管内に組織が形成されていない領域が存在したが、VI 群では根管全体を満たすように組織が形成されていた (図 14A, B)。マイクロ CT 画像から構築した三次元画像を用いて、根管内に形成された歯髄様組織の体積割合を算出したところ、コントロール群では $74.7 \pm 12.5\%$ (中央値 67.4%)、VI 群では $92.4 \pm 6.2\%$ (中央値 94.0%) であり、VI 群はコントロール群と比較して有意に高かった (図 14C)。

3) 組織学的評価

脱灰試料の薄切切片を HE 染色した結果、コントロール群および VI 群のいずれにおいても、根管内に形成された歯髄様組織は線維性の疎性結合組織様の構造を呈していた。しかし、VI 群では内径 $10 \mu\text{m}$ 未満の明瞭な管腔様構造が観察された (図 15)。

免疫蛍光染色の結果から、コントロール群および VI 群いずれにおいても、形成された歯髄様組織内にヒト CD31 陽性細胞からなる血管の形成が認められた (図 16A, D)。また両群ともに、Stro-1 陽性細胞については、根管内に形成された歯髄様組織の中央部で多く認められ、象牙質に近接する部位では観察され

なかった（図 16B, E）。一方、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は、両群ともに DSPP 陽性細胞が局在していることがわかった（図 16C, F）。

さらに、CD31 抗体を用いた染色の拡大像では、CD31 陽性細胞からなる血管内部に宿主由来の血球細胞の存在が認められた（図 17A）。CD31 陽性細胞からなる血管の単位面積当たりの数は、GM 群で $906.2 \pm 134.4/\text{mm}^2$ 、EM 群で $1101.1 \pm 77.3/\text{mm}^2$ であり、EM 群は GM 群と比べて有意に多かった（図 17B）。

IV 考察

間葉系幹細胞は、骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの中胚葉由来組織を構成する細胞への分化能と自己複製能を持ち、組織再生に重要な役割を果たす⁵⁹。そのなかでも神経堤に由来する DPSC は、受容体型チロシンキナーゼの一つである VEGF レセプター (VEGFR) -1 を高発現しており、血管内皮細胞に容易に分化することが知られている⁶⁰⁻⁶³。VEGFR-1 のリン酸化は VEGF によって誘導され、それにより発生した VEGF シグナルは、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) / Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 経路を活性化させることで、DPSC の分化を誘導する^{64,65}。さらに、VEGF シグナルを受けた DPSC は、三次元培養系で網目状構造形成能を示し、CD31^{66,67} や SMA⁶⁸⁻⁷¹ を発現する血管内皮細胞に分化することが明らかとなっている^{45,72,73}。

ところで、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おり⁷⁴⁻⁷⁷、生体組織が本来有する自己組織化能を *in vitro* において発揮することが知られている⁷⁸⁻⁸¹。Landry ら⁸¹ は、新生仔ラットから分離した肝細胞を細胞非接着性培養皿で培養することでスフェロイドを作製し、3 週間培養したところ、スフェロイド内に肝細胞索および胆管様構造が形成されることを見出した。また、DPSC 集合体を用いた過去の研究⁵⁷において、石灰化基質産生を促進する培地で集合

体を培養したところ、集合体外層を構成する DPSC のみが石灰化基質を産生し、集合体中心部の細胞は幹細胞性を維持することが報告されている。すなわち、DPSC 集合体の部位によって細胞の表現型が変化し、DPSC 集合体が自己組織化能を有するとされている。そこで、VEGF を添加した培地を用いることで、細胞集合体を構成する DPSC を血管内皮細胞に分化誘導することが可能であり、さらに自己組織化能によって細胞集合体内に血管様構造が形成されるのではないかと着想し、本研究を開始した。

作製した細胞集合体を移植体として用いるためには、集合体を構成する細胞が生存していることが重要である⁸²。そこで、細胞集合体を長期培養した後、集合体を構成する細胞の生死について検討した。分化誘導培地を用いて DPSC 集合体を培養したところ、培養 7 日目以降は、大きさや形状に大きな変化は認められず、また、HE 染色の結果から集合体辺縁部に細胞が密に存在していた。これは、細胞集合体内部と比較して、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たためであると考えられた。また、Live/Dead 染色の結果から、培養 20 日目においても集合体を構成する DPSC の 95%以上が生存していることが明らかとなった。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細胞死が誘導されることが分かっており^{55,83-86}、さらに、DPSC 集合体を用いた研究⁵⁷においても、血管内皮細胞分化誘導を施

してない集合体中心部では死細胞が約 15%も存在することが報告されている。本研究での高い細胞生存率は、DPSC 集合体を血管内皮細胞に分化誘導することで、集合体内に血管網様構造が形成されたため、分化誘導を施してない集合体と比較して、培地が内部まで浸透しやすい環境であったからであると考えられる。一方、血管内皮細胞に分化誘導した集合体の表層に死細胞が観察された。生体組織の恒常性維持のメカニズムとして、細胞が密集した部位において、増殖速度や能力の低い細胞は細胞死によって排除されることが分かっている⁸⁷⁻⁸⁹。このことから、集合体外層に細胞が密に存在したことで、一部の細胞に細胞死が誘導されたのではないかと思われた。

次に、細胞集合体内部における管腔様構造の形成を FITC 蛍光デキストランビーズを用いて検討したところ、培養 10 日目の EM 群において蛍光ビーズの集積が一部領域で観察され、さらに培養 20 日目では、集合体外層に明瞭な管腔様構造を認めた。蛍光ビーズは、腫瘍内の血管形成過程の観察や薬剤分散速度の評価の際に用いられている⁹⁰⁻⁹²。本研究においては、直径約 85Å のデキストランビーズを用いており、集合体内の細胞が密な部位に比べて、疎な領域に粒子が多く集積したため、集合体内に形成された管腔様構造を描出できたものと考えられた。

血管内皮細胞分化誘導を施した集合体の免疫蛍光染色の結果から、培養期間が増加するにつれて CD31 および SMA 陽性細胞が増加し、集合体外層で管腔様構造や網目状構造を形成していることが示された。一方、間葉系幹細胞マーカーである *Nanog* については、培養 10 日目まで、集合体内層の DPSC に多く発現していることが分かった。したがって、集合体中心部に存在する DPSC は幹細胞性を維持しているものの、集合体外層の DPSC が血管内皮細胞へ分化することで、管腔様構造を形成したものと考えられた。これらのことから、DPSC 集合体を血管内皮細胞へ分化誘導することで、血管網構造をもった細胞集合体を *in vitro* で構築できることが示された。

血管内皮細胞へ分化誘導した細胞集合体が管腔様構造を形成することが *in vitro* の実験系で明らかとなったため、次のステップとして、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埋入する実験を行った。本実験では、集合体外層の DPSC が血管内皮細胞に分化しており、かつ集合体内層で細胞が幹細胞性を維持していることが明らかとなった、EM で 10 日間培養した細胞集合体を用いた。歯髄は、象牙芽細胞層、細胞希薄層、細胞稠密層、および疎性結合組織からなる中心部の四層に分けられ、血管のみならず線維性結合組織、神経線維やリンパ管などを豊富に含んでいる⁹³。このような複雑な構造を再生させるためには、線維芽細胞や神経細胞、さらには象牙芽細胞のソース

となりうる細胞が必要不可欠であると考え、未分化 DPSC を包含する細胞集合体を移植体として利用した。

埋入実験の結果、VI 群ではコントロール群と比較して血管豊富な歯髄様組織が有意に多く形成されており、さらに、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多くの血管が認められた。本研究で用いたヒト CD31 抗体は、マウス由来の CD31 に交差反応を示さないものであり、CD31 陽性細胞で形成される血管内に血球の存在を認めたことは、DPSC が構築した管腔様構造と宿主の血管が吻合したことを意味している。

スフェロイドの中心部では、酸素分圧が低下することで低酸素誘導因子 (HIF-1 α) の発現が亢進することが知られている^{94,95}。また、HIF-1 α の発現が亢進した細胞では VEGF の転写活性が促進し、周囲の血管内皮細胞を刺激することで血管新生が誘導されることが報告されている^{96,97}。本実験の細胞集合体中心部に存在する細胞も同様に低酸素状態にあると考えられ、VI 群およびコントロール群ともに、集合体内部は血管新生が促進される環境であると推察される。一方、細胞は HIF-1 α を発現させることで、解糖系における嫌氣的解糖作用によって ATP を産生し、低酸素環境によって低下した ATP 産生量を補償する⁹⁸⁻¹⁰⁰。しかし、低酸素環境に加えて、細胞に栄養も供給されない場合には、この解糖作用が機能せず、ATP 産生量の低下により細胞死が引き起こされる^{101,102}。細胞

の増殖や代謝には、酸素だけでなく栄養の供給も重要であり、VI群では血流供給が速やかに行われたため血管新生を促進する環境を維持できたが、コントロール群では低栄養により細胞死が誘導され、歯髄様組織の形成量が減少したものと考えられた。

形成された歯髄様組織の組織学的検討の結果、根管壁象牙質に近接した部位に、象牙芽細胞分化マーカーである DSPP^{46,103,104} を発現する細胞が局在していた。象牙質に含まれる bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) や transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) といった液性因子は、DPSC の象牙芽細胞分化にとって重要な役割を果たすことが明らかとなっている¹⁰⁵⁻¹⁰⁷。このことから、根管壁の象牙質と接する DPSC が、象牙質に含まれる液性因子の影響を受けることで象牙芽細胞へと分化したものと考えられる。また、幹細胞マーカーである Stro-1^{108,109} を発現する細胞も観察され、幹細胞性を維持した DPSC が、埋入 6 週間後においても形成組織の中心部で生存していることが示された。

以上の結果から、*in vitro* で血管網構造を誘導した DPSC 集合体を用いることで、血管新生が根尖孔のみから発生する無髄歯根管内という環境下においても、集合体内部に血液成分や栄養を迅速に供給することが可能であり、血管内皮細胞分化誘導した DPSC 集合体が歯髄様組織を効率的に再生する生体材料として応用できる可能性が示唆された。しかしながら、本研究の結果のみでは、DPSC

集合体によって形成された歯髄様組織が無髄歯根管内において歯髄として機能するかどうかについては言及することができない。歯髄には血管のみならず神経線維も多く含まれており、本研究において形成された歯髄様組織内に神経網が構築されているかについて検討する必要がある。DPSC は外胚葉性間葉である神経堤由来の細胞であり、神経細胞への分化能を有している^{43,61,110}。本研究において、動物実験に用いた集合体内に幹細胞マーカーである Stro-1 陽性の細胞が存在していたことから、無髄歯根管内に神経が形成されている可能性も考えられ、この点についてはさらなる検討が必要である。また、本研究では、細胞集合体の歯髄再生能を異所性移植によって評価したが、今後は、歯根周囲が顎骨に囲まれた根管内において歯髄再生能を発揮できるか否かについて検討を行っていく予定である。

V 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。

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 講師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 参考文献

1. 8020 推進財団. 2005. 永久歯の抜歯原因調査報告書.
2. 8020 推進財団. 2018. 第 2 回 永久歯の抜歯原因調査報告書.
3. Caplan DJ, Cai J, Yin G, White BA. 2005. Root canal filled versus non-root canal filled teeth: A retrospective comparison of survival times. *J Public Health Dent.* 65(2):90–96.
4. Ajay Sharma L, Sharma A, Dias GJ. 2015. Advances in regeneration of dental pulp—a literature review. *J Investig Clin Dent.* 6(2):85–98.
5. Randow K, Glantz PO. 1986. On cantilever loading of vital and non-vital teeth. An experimental clinical study. *Acta Odontol Scand.* 44(5):271–277.
6. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. 2010. Tooth survival following non-surgical root canal treatment: A systematic review of the literature. *Int Endod J.* 43(3):171–189.
7. Andreasen JO, Ahrensburg SS, Tsilingaridis G. 2012. Root fractures: The influence of type of healing and location of fracture on tooth survival rates - An analysis of 492 cases. *Dent Traumatol.* 28(5):404–409.
8. Rud J, Andreasen JO, Jensen JE. 1972. Radiographic criteria for the assessment of healing after endodontic surgery. *Int J Oral Surg.* 1(4):195–214.
9. Rud J, Andreasen JO, Jensen JE. 1972. A follow-up study of 1,000 cases treated by endodontic surgery. *Int J Oral Surg.* 1(4):215–228.
10. Mao JJ, Kim SG, Zhou J, Ye L, Cho S, Suzuki T, Fu SY, Yang R, Zhou X. 2012. Regenerative endodontics: Barriers and strategies for clinical translation. *Dent Clin North Am.* 56(3):639–649.

11. Mukherjee P, Patel A, Chandak M, Kashikar R. 2017. Minimally invasive endodontics a promising future concept: A review article. *Int J Sci Study*. 5(1):245–251.
12. Wolters WJ, Duncan HF, Tomson PL, Karim IE, McKenna G, Dorri M, Stangvaltaite L, van der Sluis LWM. 2017. Minimally invasive endodontics: A new diagnostic system for assessing pulpitis and subsequent treatment needs. *Int Endod J*. 50(9):825–829.
13. Gluskin AH, Peters CI, Peters OA. 2014. Minimally invasive endodontics: Challenging prevailing paradigms. *Br Dent J*. 216(6):347–353.
14. Hayashi M, Fujitani M, Yamaki C, Momoi Y. 2011. Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation-A systematic review. *J Dent*. 39(2):95–107.
15. Al-Afifi NA, Abdullah M, Al-Amery SM, Abdulmunem M. 2016. Comparison between gutta-percha and resin-coated gutta-percha using different obturation techniques. *J Appl Biomater Funct Mater*. 14(3):e307–e313.
16. Washio A, Morotomi T, Yoshii S, Kitamura C. 2019. Bioactive glass-based endodontic sealer as a promising root canal filling material without semisolid core materials. *Materials (Basel)*. 12(23):3967.
17. Hauman CH, Love RM. 2003. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: A review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J*. 36(3):147–160.
18. Michanowicz AE, Michanowicz JP, Michanowicz AM, Czonstkowsky M, Zullo TP. 1989. Clinical evaluation of low-temperature thermoplasticized injectable gutta-percha: A preliminary report. *J Endod*. 15(12):602–607.

19. Peng L, Ye L, Tan H, Zhou X. 2007. Outcome of root canal obturation by warm gutta-percha versus cold lateral condensation: a meta-analysis. *J Endod.* 33(2):106–109.
20. de Chevigny C, Dao TT, Basrani BR, Marquis V, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. 2008. Treatment outcome in endodontics: The Toronto study--phase 4: Initial treatment. *J Endod.* 34(3):258–263.
21. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. 2007. Outcome of primary root canal treatment: Systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J.* 40(12):921–939.
22. Friedman S, Mor C. 2004. The success of endodontic therapy--healing and functionality. *J Calif Dent Assoc.* 32(6):493–503.
23. Pirani C, Chersoni S, Montebugnoli L, Prati C. 2015. Long-term outcome of non-surgical root canal treatment: A retrospective analysis. *Odontology.* 103(2):185–193.
24. Polycarpou N, Ng YL, Canavan D, Moles DR, Gulabivala K. 2005. Prevalence of persistent pain after endodontic treatment and factors affecting its occurrence in cases with complete radiographic healing. *Int Endod J.* 38(3):169–178.
25. Sakurai K, Okiji T, Suda H. 1999. Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: An immunohistochemical study. *J Dent Res.* 78(10):1596–1608.
26. Heyeraas KJ, Berggreen E. 1999. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10(3):328–336.

27. Yoshihara K, Yoshihara N, Iwaku M. 2003. Class II antigen-presenting dendritic cell and nerve fiber responses to cavities, caries, or caries treatment in human teeth. *J Dent Res.* 82(6):422–427.
28. Byers MR, Närhi MV. 1999. Dental injury models: Experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10(1):4–39.
29. Olgart L. 1996. Neural control of pulpal blood flow. *Crit Rev Oral Biol Med.* 7(2):159–171.
30. Kaneko T, Arayatrakoollikit U, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. 2013. Immunohistochemical and gene expression analysis of stem-cell-associated markers in rat dental pulp. *Cell Tissue Res.* 351(3):425–432.
31. Goldberg M, Smith AJ. 2004. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15(1):13–27.
32. Langer R, Vacanti JP. 1993. Tissue engineering. *Science.* 260(5110):920–926.
33. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. 2000. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 21(23):2347–2359.
34. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. 2011. *Mater Today.* 14, 88–95.
35. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. 2004. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 4(8):743–765.
36. Lee KY, Mooney DJ. 2001. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev.* 101(7):1869–1879.

37. Schmidt CE, Leach JB. 2003. Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng.* 5:293–347.
38. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. 2003. Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 21(4):157–161.
39. Temenoff JS, Mikos AG. 2000. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials.* 21(5):431–440.
40. Hutmacher DW. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 21(24):2529–2543.
41. Dissanayaka WL, Zhu L, Hargreaves KM, Jin L, Zhang C. 2014. Scaffold-free prevascularized microtissue spheroids for pulp regeneration. *J Dent Res.* 93(12):1296–1303.
42. Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. 2018. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J.* 51(4):405–419.
43. Li X, Ma C, Xie X, Sun H, Liu X. 2016. Pulp regeneration in a full-length human tooth root using a hierarchical nanofibrous microsphere system. *Acta Biomater.* 35:57–67.
44. Suzuki T, Lee CH, Chen M, Zhao W, Fu SY, Qi JJ, Chotkowski G, Eisig SB, Wong A, Mao JJ. 2011. Induced migration of dental pulp stem cells for *in vivo* pulp regeneration. *J Dent Res.* 90(8):1013–1018.
45. Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. 2013. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater.* 29(1):97–102.

46. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. 97(25):13625–13630.
47. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. 2010. Stem/progenitor cell-mediated *de novo* regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model. Tissue Eng Part A. 16(2):605–615.
48. Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M. 2011. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105(+) stem cells with stromal cell-derived factor-1. Tissue Eng Part A. 17(15-16):1911–1920.
49. Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, Utunomiya S, Nakamura H, Matsushita K, Nakashima M. 2013. A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. Stem Cells Trans Med. 2(7):521–533.
50. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, Matsushita K. 2017. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: A pilot clinical study. Stem Cell Res Ther. 8(1):61.
51. Chen FM, Liu X. 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. Prog Polym Sci. 53:86–168.
52. Garg T, Goyal AK. 2014. Biomaterial-based scaffolds--current status and future directions. Expert Opin Drug Deliv. 11(5):767–789.
53. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. 2013. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. Eur Cell Mater. 26:120–132.

54. Murray PE. 2012. Constructs and scaffolds employed to regenerate dental tissue. *Dent Clin North Am.* 56(3):577–588.
55. Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, Koizumi Y, Takimoto K, Suzuki N, Saito M, Suda H. 2014. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 59(3):310–317.
56. Yildirim L, Seifalian AM. 2014. Three-dimensional biomaterial degradation-material choice, design and extrinsic factor considerations. *Biotechnol Adv.* 32(5):984–999.
57. Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, Katata C, Hayashi M, Imazato S. 2018. Pulp regeneration by 3-dimensional dental pulp stem cell constructs. *J Dent Res.* 97(10):1137–1143.
58. Sasaki JI, Katata C, Abe GL, Matsumoto T, Imazato S. 2019. Fabricating large-scale three-dimensional constructs with living cells by processing with syringe needles. *J Biomed Mater Res A.* 107(4):904–909.
59. Huang GT, Gronthos S, Shi S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 88(9):792–806.
60. Sharpe PT, Young CS. 2005. Test-tube teeth. *Sci Am.* 293:34–41.
61. Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin LJ, Samaranayake LP, Zhang CF. 2015. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration *in vivo*. *Tissue Engineering Part A.* 21(3–4):550–563.

62. Janebodin K, Zeng Y, Buranaphatthana W, Ieronimakis N, Reyes M. 2013. VEGFR2-dependent angiogenic capacity of pericyte-like dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 92(6):524–531.
63. Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, Montanari M, Tazzari PL, Ricci F, Pasquinelli G, Orrico C, Grossi A, Prati C, Bagnara GP. 2009. Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 22(3):699–706.
64. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. 1999. Vegf activates protein kinase c-dependent, but ras-independent raf-mek-map kinase pathway for dna synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene.* 18(13):2221–2230.
65. Bento LW, Zhang Z, Imai A, Nör F, Dong Z, Shi S, Araujo FB, Nör JE. 2013. Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J Dent Res.* 92(1):51–57.
66. 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. 2011. Vascular endothelial growth factor enhances *in vitro* proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 25(1):57–69.
67. Muller WA. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24(6):327–334.
68. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. 2002. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: *in vitro* analysis. *Circ Res.* 90(11):1189–1196.

69. Imamura H, Ohta T, Tsunetoshi K, Doi K, Nozaki K, Takagi Y, Kikuta K. 2010. Transdifferentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into the smooth muscle cell lineage mediated by transforming growth factor-beta1. *Atherosclerosis*. 211(1):114–121.
70. Kim JH, Kim GH, Kim JW, Pyeon HJ, Lee JC, Lee G, Nam H. 2016. *In vivo* angiogenic capacity of stem cells from human exfoliated deciduous teeth with human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cells*. 39(11):790–796.
71. Peters EB, Liu B, Christoforou N, West JL, Truskey GA. 2015. Umbilical cord blood-derived mononuclear cells exhibit pericyte-like phenotype and support network formation of endothelial progenitor cells *in vitro*. *Ann Biomed Eng*. 43(10):2552–2568.
72. Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. 2009. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 20(5–6):435–440.
73. Lian X, Bao X, Al-Ahmad A, Liu J, Wu Y, Dong W, Dunn KK, Shusta EV, Palecek SP. 2014. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling. *Stem Cell Reports*. 3(5):804–816.
74. Zhang W, Zhuang A, Gu P, Zhou H, Fan X. 2016. A review of the three-dimensional cell culture technique: Approaches, advantages and applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 11(4):370–380.
75. Lin RZ, Chang HY. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. 3(9–10):1172–1184.

76. Sambale F, Lavrentieva A, Stahl F, Blume C, Stiesch M, Kasper C, Bahnemann D, Scheper T. 2015. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *J Biotechnol.* 205:120–129.
77. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. 2013. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 31(2):108–115.
78. Lee SH, Inaba A, Mohindroo N, Ganesh D, Martin CE, Chugal N, Kim RH, Kang MK, Park NH, Shin KH. 2017. Three-dimensional sphere-forming cells are unique multipotent cell population in dental pulp cells. *J Endod.* 43(8):1302–1308.
79. Sasaki J, Asoh TA, Matsumoto T, Egusa H, Sohmura T, Alsberg E, Akashi M, Yatani H. 2010. Fabrication of three-dimensional cell constructs using temperature-responsive hydrogel. *Tissue Eng Part A.* 16(8):2497–2504.
80. Sasaki J, Matsumoto T, Egusa H, Matsusaki M, Nishiguchi A, Nakano T, Akashi M, Imazato S, Yatani H. 2012. *In vitro* reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct. *Integr Biol (Camb).* 4(10):1207–1214.
81. Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R, Marceau N. 1985. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol.* 101(3):914–923.
82. Masaki H, Kato-Itoh M, Takahashi Y, Umino A, Sato H, Ito K, Yanagida A, Nishimura T, Yamaguchi T, Hirabayashi M, Era T, Loh KM, Wu SM, Weissman IL, Nakauchi H. 2016. Inhibition of apoptosis overcomes stage-related compatibility barriers to chimera formation in mouse embryos. *Cell Stem Cell.* 19(5):587–592.

83. Xiao L, Tsutsui T. 2013. Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: Stem cells in the core. *J Cell Biochem.* 114(11):2624–2636.
84. Cesarz Z, Tamama K. 2016. Spheroid culture of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2016:9176357.
85. Xiao L, Kumazawa Y, Okamura H. 2014. Cell death, cavitation and spontaneous multi-differentiation of dental pulp stem cells-derived spheroids *in vitro*: A journey to survival and organogenesis. *Biol Cell.* 106(12):405–419.
86. Anada T, Fukuda J, Sai Y, Suzuki O. 2012. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials.* 33(33):8430–8441.
87. Clavería C, Giovinazzo G, Sierra R, Torres M. 2013. Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature.* 500(7460):39–44.
88. Martín FA, Herrera SC, Morata G. 2009. Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development.* 136(22):3747–3756.
89. Villa Del Campo C, Clavería C, Sierra R, Torres M. 2014. Cell competition promotes phenotypically silent cardiomyocyte replacement in the mammalian heart. *Cell Rep.* 8(6):1741–1751.
90. Chetprayoon P, Matsusaki M, Akashi M. 2015. Three-dimensional human arterial wall models for *in vitro* permeability assessment of drug and nanocarriers. *Biochem Biophys Res Commun.* 456(1):392–397.
91. Jain RK, Munn LL, Fukumura D. 2013. Measuring angiogenesis and hemodynamics in mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013(4):354–358.

92. Chetprayoon P, Matsusaki M, Yokoyama U, Tejima T, Ishikawa Y, Akashi M. 2016. Use of three-dimensional arterial models to predict the *in vivo* behavior of nanoparticles for drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 55(14):4461–4466.
93. Gotjamanos T. 1969. Cellular organization in the subodontoblastic zone of the dental pulp. I. A study of cell-free and cell-rich layers in pulps of adult rat and deciduous monkey teeth. *Arch Oral Biol.* 14(9):1007-1010.
94. Kuang R, Zhang Z, Jin X, Hu J, Shi S, Ni L, Ma PX. 2016. Nanofibrous spongy microspheres for the delivery of hypoxia-primed human dental pulp stem cells to regenerate vascularized dental pulp. *Acta Biomater.* 33:225–234.
95. Shimizu K, Kusamori K, Nishikawa M, Mizuno N, Nishikawa T, Masuzawa A, Katano S, Takahashi Y, Takakura Y, Konishi S. 2013. Poly(N-isopropylacrylamide)-coated microwell arrays for construction and recovery of multicellular spheroids. *J Biosci Bioeng.* 115(6):695–699.
96. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* 105(2):659–669.
97. Rey S, Semenza GL. 2010. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 86(2):236-242.
98. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(13):5680-5684.
99. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 30(4):393-402.

100. Semenza GL. 2011. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med.* 365(6):537-547.
101. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. 2010. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 40(2):294–309.
102. Kim BJ, Forbes NS. 2007. Flux analysis shows that hypoxia-inducible-factor-1-alpha minimally affects intracellular metabolism in tumor spheroids. *Biotechnol Bioeng.* 96(6):1167–1182.
103. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. 2007. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod.* 33(6):703–708.
104. Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R, Ueda M. 2006. 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.* 27(20):3766–3781.
105. Huang GT, Shagranova K, Chan SW. 2006. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin *in vitro*. *J Endod.* 32(11):1066–1073.
106. Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV. 1990. *In vivo* morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J Biol Buccale.* 18(2):123–129.
107. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nör JE, Sloan AJ, Smith AJ. 2006. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials.* 27(14):2865–2873.
108. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. 2007. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 13(4):767–773.

109. Yu CY, Boyd NM, Cringle SJ, Alder VA, Yu DY. 2002. Oxygen distribution and consumption in rat lower incisor pulp. *Arch Oral Biol.* 47(7):529–536.
110. Li D, Zou XY, El-Ayachi I, Romero LO, Yu Z, Iglesias-Linares A, Cordero-Morales JF, Huang GT. 2019. Human dental pulp stem cells and gingival mesenchymal stem cells display action potential capacity *in vitro* after neuronogenic differentiation. *Stem Cell Rev Rep.* 15(1):67–81.