

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11861

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞により作製した3次元細胞組織体による次世代型再生医療技術の開発

研究課題名(英文) Development of 3D tissue construct fabricated from dental pulp stem cell

研究代表者

館原 誠晃 (Tatehara, Seiko)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90380089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療への応用に向けて歯髄幹細胞により3次元細胞組織体(3D-TCs)の作製を行った。この3D-TCsは歯髄幹細胞を骨分化および血管内皮細胞誘導培地にて3次元培養することで作製したspheroidを構築して作製した。この3D-TCsは細胞、細胞が産生した細胞外基質と石灰化基質により構成されていたが骨組織様構造は示さなかった。しかし、3D-TCsをラット下顎骨欠損部に移植すると骨組織の再生が促進された。以上の結果より、3D-TCsは骨組織再生療法の有用性が示唆された。今後、3D-TCsによる骨形成の機序の解明と共に骨組織構造に類似した3D-TCsの簡便で効率的な作製法の開発を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、医療廃棄物となる抜去智歯の歯髄組織に存在する幹細胞により、今までに存在しなかった効果的な骨組織再生療法の開発を行った。特に、歯髄幹細胞のみで3次元構築を可能とし、さらに血管内皮細胞分化誘導培地による単純な3次元培養を加えるのみで3次元細胞組織体の作製を可能とし、さらにこの細胞組織体が骨組織の再生を促進する点は、従来から使用されている生体材料による異物反応や骨置換の遅延に対する問題を解決する可能性が示唆された。また、骨疾患や先天的骨欠損を有する患者に対して新たな治療法の足懸かりになると思われた。

研究成果の概要(英文)：The propose of this study is to fabricate the 3-dimension tissue-constructs (3D-TCs) from Dental pulp stem cells (DPSCs) which were isolated from human extracted wisdom teeth. The fabrication-method of 3D-TCs has been invented through various culture technique, 3D-TCs were fabricated by assembling some spheroids, which were formed through the 3-dimension culture of DPSCs in the bone differentiation medium or the endothelial cell differentiation medium. 3D-TCs were composed of cells, extracellular matrix, and calcified matrix, but didn't show like bone tissue structure. 3D-TCs were implanted into the bone defects of rat mandibular, and the bone regeneration were promoted in the implanted areas 8 weeks after implantation. From these results, 3D-TCs might be useful for bone regeneration medicine. We will elucidate the mechanism how 3D-TCs leads bone regeneration and develop effective and easy fabrication methods of 3D-TCs with like bone tissue structure.

研究分野：口腔外科・口腔内科

キーワード：再生医療 歯髄幹細胞 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織欠損や臓器機能不全に対する治療法としては、遊離組織移植や臓器移植が主流であるが、細胞治療や組織工学などの再生医療技術向上に伴い、徐々に再生医療に移行しつつある。現在、応用されている再生医療としては、細胞を移植する方法や細胞と足場材料(scaffold)を移植する方法がある。しかし、細胞のみの移植では移植床に細胞が留まることができず効果を発揮できない。また scaffold を用いた治療では、移植部の線維化や感染などを生じる報告もあり、長期的予後に不安がある。これらの問題点を克服するため、多くの研究者が scaffold free の移植体の作製に取り組んでいる。その最も良い成績が得られている方法が、細胞シート工学を応用した治療で、現在では安定した組織再生や臓器機能の回復が得られるようになってきた。しかし、細胞シートにも欠点があり、細胞シートの作製に必要な細胞を正常組織から採取する必要があること、また 3 次元的な組織欠損の再生に制限があることなどがある。研究代表者らは、まず細胞シートの細胞供給源として医療廃棄物である抜去歯の歯髄組織内に存在する幹細胞である歯髄幹細胞に着目した。歯髄幹細胞は、臨床応用されている骨髄間葉系幹細胞や脂肪幹細胞と同様の多分化能とこれらの幹細胞より高い細胞増殖能を有する特徴があり、再生医療における細胞供給源として期待されている。研究代表者らは、この歯髄幹細胞を培養することにより歯髄幹細胞シートを作製して、骨および軟骨組織の再生への有用性について検討してきた。この scaffold-free な歯髄幹細胞シートは、豊富な細胞外マトリックス、細胞、細胞自身が産生する成長因子により構成されており、組織工学の 3 要素(足場、細胞、成長因子)を十分に備えていた。また、歯髄幹細胞シートにより骨、軟骨組織を再生することも可能であったが、これまでの細胞シートの報告同様に 3 次元的な組織再生は困難であった¹⁾。近年、3 次元組織再生および臓器再生に対して scaffold-free な *in vitro* 3 次元細胞組織構造体(3D tissue construct)の開発が進んでおり、次世代の再生医療技術(biofabrication)として注目されている。この 3D tissue construct は、細胞周囲の 3 次元環境を再現できるため再生医療の移植体としてだけでなく、モデル組織や臓器として *in vitro*での機能解析や薬剤の毒性検査などへの応用にも期待されている。最も新しい 3D-tissue construct 作製技術には、細胞集塊(spheroid)を 3 次元に構築する方法や細胞シートを積層する方法など様々な手法がある。その内の 1 つが、様々な細胞種(血管内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、間葉幹細胞など)の spheroid を剣山の針に刺して 3 次元に積層する方法である。実際に、この方法により血管の作製に成功しており、一部では臨床応用に向けて研究が進んでいる²⁾。本研究では、この技術を応用して歯髄幹細胞を様々な細胞に分化させて作製した spheroid を積層することにより 3D-tissue construct を作製し、この construct による組織再生能を検討するとともに 3D-tissue construct による再生医療技術基盤を構築することを目的とした。

2. 研究の目的

組織欠損や臓器機能不全に対する治療は、移植療法から細胞を利用した再生医療に移行しつつある。さらには 3 次元の組織欠損においては、細胞と足場材料(Scaffold)による治療から scaffold free の 3 次元構造体による再建方法も開発されている。研究代表者らは、歯髄幹細胞により血管構造を有する scaffold free の 3 次元細胞組織体(3D-tissue construct)を作製し、この細胞組織体による再生医療技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

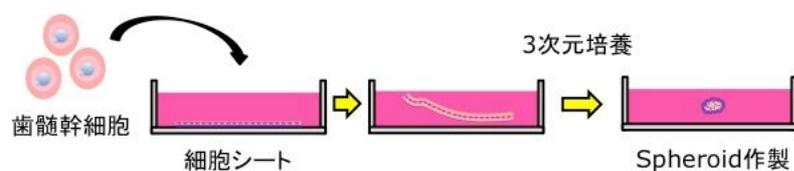
(1) ヒト歯髄幹細胞の分離・培養およびその特性解析

本研究は本学歯学部倫理審査委員会の承認（承認番号：901）下に行われた。3D tissue construct の構成成分となる歯髄幹細胞を抜去歯の歯髄組織から分離・培養し、その特性について検討を行った。まず、研究の趣旨を説明し、同意頂けた健康な患者の智歯抜歯後に医療廃棄物となる抜去歯より歯髄組織を採取した。酵素処理法（Type I collagenase と dispase solution）後に得られた細胞を基本培地（FBS, penicillin と streptomycin 含有 -MEM）にて培養を3継代まで行った³⁾。細胞は研究で使用するまで液体窒素下に凍結保存した。

分離した細胞を 1.0×10^6 cells/tube に分注し、間葉系幹細胞のマーカー（CD146, CD105, CD90, CD73）および造血系幹細胞マーカー（CD34, CD45, CD14, HLA-DR）の1次抗体にて反応させた後に Cell Sorter SH800 Series（Sony）にて陽性細胞率を解析した^{3, 4)}。さらに分離した細胞を骨分化誘導培地、軟骨誘導培地および脂肪誘導培地にて培養を行い、Alizarin Red-S 染色、Alcian blue 染色、Oil red O 染色、RT-PCR 法（Osteocalcin, Runx2, Alkaline phosphatase, LPL, PPAR 2, Aggrecan, collagen II, SOX9 発現）、免疫組織化学染色（Aggrecan）にて分化能を検討した⁴⁾。

(2) 歯髄幹細胞により spheroid の作製

歯髄幹細胞にて Spheroid の作製を行った。Bone like spheroid（骨様 spheroid: BS）の作製においては、歯髄幹細胞を培養皿に播種し、基礎培地にて3週間培養した後に培養皿より細胞シートを剥がして浮遊させた。この細胞シートを骨誘導培地にてさらに1週間3次元培養を行うことにより BS を作製した⁵⁾。Cartilage like spheroid（軟骨様 spheroid: CS）においては、歯髄幹細胞を1週間基礎培地にて培養後、軟骨誘導培地にてさらに2週間培養して軟骨細胞シートを作製した。この軟骨細胞シートを軟骨誘導培地にて1週間3次元培養することにより CS を作製した。Angioid like spheroid（血管様 spheroid: AS）は、歯髄幹細胞を1週間基礎培地にて培養後、血管内皮細胞誘導培地にてさらに2週間培養することにより細胞シートを作製し、同培地に3次元培養することにより AS を作製した。これらの spheroid の特性については、各種染色法、免疫細胞染色、免疫組織化学的手法により各種関連タンパク質の発現について確認した。



Designed by Y. Takebe

図1. Spheroid の作製

(3) 3D tissue construct の構築法の検討

基礎培地にて培養して作製した spheroid (CS) を用いて細胞組織体の3次元構築を行った。CS 4個を6-0 ナイロン糸にて数珠繋ぎ円盤構造として各種培養液（基礎培地、骨誘導培地、血管内皮細胞誘導培地）にて3日間-1週間培養を行い、最も適した3次元構築法の検討を行った。

(4) 3D tissue construct による骨組織再生能の評価

免疫不全ラットの下顎骨枝部に直径 4 mm 大の骨欠損を形成し、同部に上記 3 で作製した CS、BS、AS、AS と BS の混合 (AS BS mix) を移植した。コントロールとしては何も移植しなかった。移植後 8 週目にラットを屠殺して、骨欠損部の骨形成能をマイクロ CT および組織学的に評価を行った (図 2)。

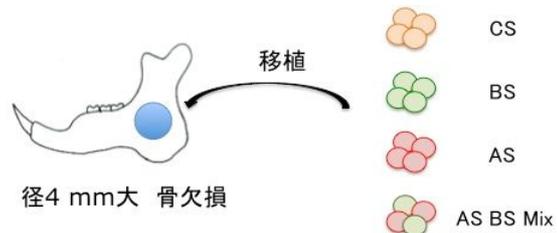


図 2. 3D tissue construct の移植法

(5) 3D tissue construct による長幹骨構造の構築法の検討

オリジナル spheroid (OS)、骨様 spheroid (OS) および血管様 spheroid (AS) を様々な組み合わせで数珠状に針に刺し、基礎培地、骨誘導培地および血管誘導培地にて 5 日間培養を行い、その形態の変化を確認した。

4. 研究成果

(1) 採取した歯髓幹細胞の特性

酵素処理後 1 週間後より線維芽細胞様細胞が出現してきた (図 3)。この分離・培養した細胞は間葉系幹細胞のマーカである CD73, CD90, CD105, CD146 に陽性を示し、造血細胞マーカである CD34, CD45, CD14 および HLA-DR には陰性であった (図 3)。また、この細胞を骨誘導培地にて 3 週間培養すると、Alizarin Red-S にて染色される石灰化基質を形成し、加えて RT-PCR にて Osteocalcin, Runx2, Alkaline phosphatase の発現量は増加した。さらに軟骨誘導を行うと Alcian blue 染色に陽性を示し、Aggrecan, collagen II, SOX9 の mRNA が発現した。免疫組織化学染色にて Aggrecan (軟骨基質タンパク) を発現した²⁾。脂肪誘導により Oil red O 染色法にて赤色に染色される脂肪滴が形成した。また LPL, PPAR 2 の mRNA が発現した。これらの結果から採取した細胞は間葉系幹細胞であることを確認した。

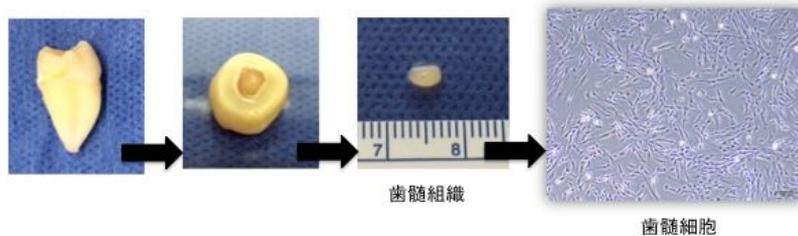


図 3. 歯髓幹細胞の分離培養

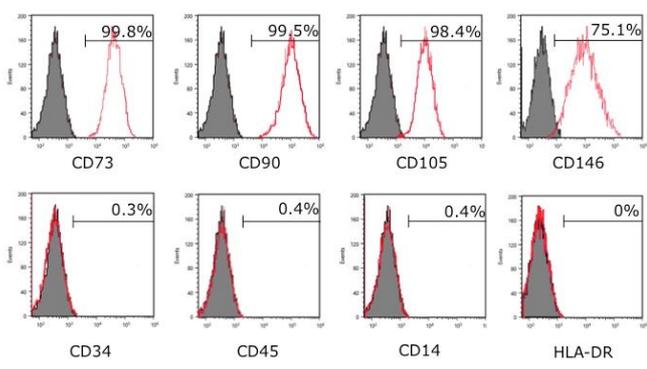


図 4. ヒストグラム

(2) 歯髓幹細胞より作製した spheroid の特性

各 spheroid は約 1 mm の比較的大きな球体を示した。組織学的に観察すると、spheroid は細胞と細胞の産生した細胞外マトリックスにて構成されていた。各 spheroid は、細胞

とI型コラーゲン (Col I : 赤色蛍光) が主体となり、BSは骨関連タンパク (オステオカルシン:OCN 赤色蛍光)の発現がみられ、石灰化基質の産生も認められた (図5)。CSでは、Alcian blue 染色にて陽性となり、免疫組織化学的染色においては Aggrecan に陽性を示した。AS については、明らかな血管様構造は認められなかったが、CD34 の発現が軽度認められた。

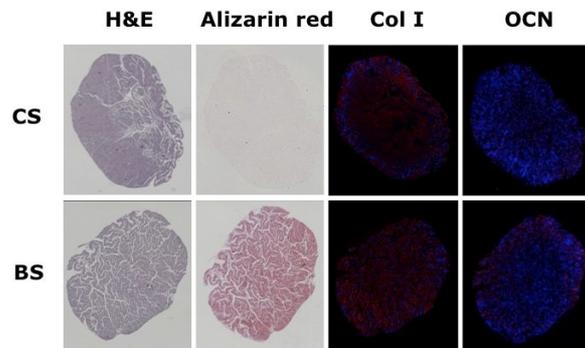


図5 . CS と BS の組織学的評価

(3) 3D-tissue construct の作製法の検討

基礎培地および骨誘導培地にて spheroid を数珠にして3-7日間培養したが、各 spheroid は結合せずに3次元構造を呈さなかった。一方、血管内皮誘導培地にて約5日間培養すると各 spheroid は結合し、円盤状の3次元構造を呈した。

(4) 骨形成能の有無

各 3D-tissue construct (OS, BS 単独、AS 単独、AS と BS 混合) をラット下顎骨欠損部に移植した。移植8週後、AS、AS と BS 混合では、骨欠損部はほぼ治癒していた。組織学的に観察すると欠損部の周囲に一部 3D-tissue construct の細胞塊が残存していた。CS では全く骨形成は認められず、3D-tissue construct の細胞塊は欠損部に存在していた。また、BS 単独移植では、骨欠損部に石灰化組織が存在するが、骨組織とは異なり象牙質に近い構造を示した。この結果から、骨再生においては、血管に関連する組織が必要であることが示唆された。

(5) 3D tissue construct による長幹骨構造の構築法

BS と AS の混合を留置針に刺して1週間培養することにより長幹骨様構造の作製の試作を行った。各 spheroid は結合して tube 状形態を示した。組織学的には、細胞、細胞外基質および石灰化基質により構成されており、spheroid の組織学的構造と変化がなかった。さらにラット皮下にこの tube 構造体を移植したが、移植後4週で皮下組織内に tube 構造体が消失した。これは、ラットの免疫機構により吸収されたと考えられた。本技術による骨組織構造の作製に限界が示唆され、さらなる作製技術を模索する必要がある。

<引用文献>

1. Tatehara S. Application of Dental Pulp Stem Cells for Tissue Engineering. The 66th Kongress & Praxisfuhrungsseminar der DGMKG (2016.6.3, Hamburg)
2. Itoh M, et al. :Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae. PLoS One. 2015 Sep 1; 10(9): e0136681.
3. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):5807-12.
4. Takebe Y, Tatehara S, Fukushima T, Tokuyama-Toda R, Yasuhara R, Mishima K, Satomura K. Cryopreservation Method for the Effective Collection of Dental Pulp Stem Cells. Tissue Eng Part C Methods. 2017 May;23(5):251-261.
5. Fukushima T, Tatehara S, Takebe Y, Toda-Tokuyama R, Satomura K. Dental Pulp Stem Cell-Derived, Scaffold-Free Constructs for Bone Regeneration. Int J Mol Sci. 2018 Jun 22;19(7). pii: E1846.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tatsuhiko Fukushima, Seiko Tatehara, Yusuke Takebe, Reiko Tokuyama-Toda, Kazuhito Satomura	4. 巻 19
2. 論文標題 Dental Pulp Stem Cell-Derived, Scaffold-Free Constructs for Bone Regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1846 ~ 1846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19071846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Seiko Tatehara, Yusuke Takebe, Susumu Tadokoro, Tatsuhiko Fukushima, Kazuhito Satomura
2. 発表標題 A Scaffold Free Tissue Construct Derived From Dental Pulp Stem Cell For Bone Regeneration
3. 学会等名 24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福島龍洋, 館原誠晃, 竹部祐生亮, 井出信次, 戸田麗子, 里村一人
2. 発表標題 骨再生におけるヒト歯髄幹細胞を用いた3次元細胞組織体の作製
3. 学会等名 第71回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井出 信次 (Ide Shinji) (00611998)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	梅木 泰親 (Umeki Hirochika) (10552408)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710)	
研究 分 担 者	里村 一人 (Satomura Kazuhito) (80243715)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	