

平成 29 年 7 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20408

研究課題名(和文)低酸素培養下におけるヒト歯髄幹細胞の有用性の検討

研究課題名(英文) Examination of the usefulness of human dental pulp stem cells under hypoxic culture

研究代表者

吉澤 祐 (YOSHIZAWA, Yuu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：60746931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：初期培養の成功率が当研究室では低く、コンタミネーションが問題となった。これらは患者から採取する際の口腔内に暴露されるといった問題点が浮き彫りになり、骨髄や体内から採取する方法より細心の注意を払うことが求められることが判明した。しかし、分離、培養に成功した場合は、多分化能は証明でき、歯髄組織から分離したこれらの多分化能を有した細胞は、これからの歯科領域での再生療法の臨床応用に対して一定の有用性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The success rate of first culture was low rate in our laboratory, and contamination became most of problems. These are highlighting the problem of being exposed to the oral cavity at the time of collection from the patient, and it turned out that it was required to pay close attention to the method of collecting from the bone marrow or the body. However, in the case of successful separation and culture, the multipotential ability can be proved, and these pluripotent cells isolated from the dental pulp tissue are more stable against clinical application of regenerative therapy in the future dental field. It was suggested that there is usefulness.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯髄幹細胞 再生療法 低酸素培養

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の背景としては、近年、歯科領域においても幹細胞を用いた再生療法が注目を集めており、再生医療を目的とした様々な細胞ソースが提案されている。

iPS細胞やES細胞といった万能細胞から、間葉系幹細胞といったある程度分化の方向性が定まった細胞まで様々な細胞が利用・研究されている。

本研究では、細胞ソースとして歯科臨床にて採取が容易で、かつ幹細胞の分取効率も高いとされるヒト歯髄幹細胞に注目した。

### (1) 歯髄幹細胞を選択した背景

再生療法に用いる細胞ソースとして現在はiPS細胞が最も注目を集めている。しかし、本研究では、感染症に対して侵襲の少ない不用歯(智歯、矯正治療時の小臼歯)の抜去によって歯髄組織が得られ、また、処理が比較的簡易と思われる細胞として歯髄組織より分離した多分化能を有する歯髄幹細胞を用いることにした。

歯髄組織は幹細胞含有率が高く、幹細胞マーカーの発現が高い細胞が多く、また、幹細胞遊走能、増殖能が高く、MMP-3 分泌能や抗炎症、抗アポトーシス効果が高いという特徴があり、効率よく幹細胞を誘導可能と考えられた。

### (2) 低酸素環境を活用した背景

低酸素環境を活用した背景としては、身体の組織中に存在する幹細胞は多能性を維持するために、ニッチと呼ばれる微小環境下に存在していることから、酸素分圧が幹細胞の機能維持に影響を与えていると考えられたのである。実際に、低酸素環境下ではiPS細胞の樹立効率が改善されたとの報告がある(Yoshidaら、2009)。

肝細胞は低酸素状態では通常酸素濃度よりも、未分化状態をより維持しているとの報告がなされ(Hungら、2012) また、ES細胞では、低酸素環境によって細胞分化の制御に参与していることが報告されている(Forristerら、2010)。低酸素状態ではHIFと呼ばれるタンパク質が誘導・産生され、このHIFにはHIF-1αのサブユニットが存在し、その働きについては、いまだ未解明な部分も多い。この為、本研究では、ヒト歯髄幹細胞の低酸素環境下でのHIFの働きについても検討を行うこととした。

### (3) 骨芽細胞分化へのMTA 応用の背景

口腔環境において、再生療法を行う際には早期の治癒促進が必要不可欠であるが、実際の臨床応用の際には、創傷治癒を如何に促進させるかが問題となっている。

組織中へカルシウムイオンを徐放し、同時にアルカリ性を示すMTAは、歯内療法分野において注目を集めている材料の一つであり、これまで、マウス由来iPS細胞とMTAを共培養することで、骨芽細胞への分科促進の可能性を発表している(吉澤ら、2012)。

これまで歯科用材料と比べて、優れた封鎖性があり水分が介在することで硬化していく特徴を有し、また、骨誘導能があることも知られている。

以上のことから、本研究は、歯髄幹細胞の幹細胞としての優位性を、低酸素環境下で最大限発揮させると同時に、MTAという創傷治癒を促進するセメントと共培養することで、骨芽細胞への分化促進の効率化を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、この再生療法を歯科分野にも応用させ、再生療法に用いる細胞ソースとしての歯髄幹細胞(多分化能を持つ細胞を便宜的に上記の様に呼称する)に注目し、その有用性を確認することである。

細胞の培養条件にはこれまでは通常酸素濃度での培養が多かったが、ヒト歯髄幹細胞の低酸素状態での増殖、及び分化時の挙動について、体内の環境により近い条件での培養を歯髄幹細胞においても応用することが目的である。

また、さらに臨床応用時には歯槽骨の再生が必要となる。この場合、MTAを創傷治癒促進剤として用いることを想定し、MTAをヒト歯髄幹細胞との共培養を行うことにした。MTAとの共培養下における増殖、分化能の検討を行う。具体的には、骨分化誘導時の評価を1型コラーゲン、Osteocalcin、Runx2の発現についてPT-PCR法にて遺伝子発現を、WesternBlot法にてタンパク質の発現を検証することとした。

## 3. 研究の方法

ヒト歯髄組織よりメンブレン(共同研究施設)

設である長寿医療センターより提供されている)を用いて、ヒト歯髄から幹細胞を分取する。

分離した歯髄幹細胞を用いて、ヒト歯髄幹細胞の維持培地として、ヒト血清 10%、AA 1%添加 DMEN を使用し、低酸素培養を 5%O<sub>2</sub>、通常培養を 20%O<sub>2</sub> に濃度設定して、低酸素条件培養下での分化能、増殖能を通常酸素下培養と比較を行った。

#### 4. 研究成果

ヒトの歯牙より歯髄組織を分離する際のコンタミネーションを防ぐ方法の検討、及び低酸素条件における培養と通常の培養条件での増殖能の比較を行うことができた。

歯髄幹細胞を用いた基礎的データの採取を、抜歯したヒト下顎第3大臼歯より歯髄組織を分離、国立長寿医療センターより提供されている、膜分取キットにて遊走能を有する細胞の分離を行い、培養条件の最適化を行った。

分離した細胞を用いて、低酸素下での培養と通常酸素濃度下での培養を比較した結果、細胞の増殖自体は低酸素条件の方が、増殖効率がよい傾向が示唆された。

しかし、歯髄組織から多分化能を有する細胞の分離そのものの成功率自体が低く、この分離の成功率を上げる条件を試験することに難航し、研究期間のほとんどを使用することとなった。

細菌のコンタミネーションを防ぐ手法は現在、当研究室では、確立途上である為、広く用いられている消毒法に改良を加えて基礎研究を行った。

ただ、ヒト歯髄幹細胞の分離、培養はサンプル数自体が少ない状況であった為、そのデータを増やしていくことが困難であった。

今後、ヒト歯髄幹細胞を再生療法に活用するためにも、分離途中でのコンタミネーションをいかに防いでいくかは、重要な課題となる。

採取部位が骨髄といった体内から直接採取可能な部位とは異なり、外界と直結している口腔内では歯牙の抜去後に口腔内の細菌やウイルスに曝露しやすい可能性が高く、現状では、初期培養での成功率の低下に繋がっており、この改善について今後引き続き研究を行っていく。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

無し

〔学会発表〕(計 0 件)

無し

〔図書〕(計 0 件)

無し

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

無し

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

無し

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

無し

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
吉澤 祐 (YOSHIZAWA, Yuu)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・

助教  
研究者番号：60746931

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し