

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17183

研究課題名（和文）歯髄幹細胞の効率的回収と輸送中の歯髄組織培養を可能とする新規凍結保存法の開発

研究課題名（英文）Novel cryopreservation method for the effective collection of dental pulp stem cells and culturing dental pulp tissue over transport

研究代表者

竹部 祐生亮（Takebe, Yusuke）

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50807097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では歯髄組織片を多孔性メンブレンで挟み、培養したところ、組織辺縁への細胞集積が確認できた。また、細胞遊走のメカニズムに関して我々はSDF-1 (stromal derived factor-1)に着目し、組織片の免疫染色を行い、72時間培養した組織片でSDF-1が最も強く発現していることが確認できた。さらにSDF-1の中和抗体を用いて培養を行ったところ、組織片への細胞集積が遅れることも確認できた。さらに他の因子として、歯髄組織片よりタンパクを抽出し、マルチプレックスを用いて解析を行ったところ、GRO-、MCP-1の2つの因子が経時的に発現量が増加していることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、多孔性メンブレンで抜去歯より採取した歯髄組織片を挟むことで、輸送中も培養が可能となり、一般開業医などで採取後に、CPC(細胞培養加工施設)などへ輸送することによりオーダーメイドの再生医療の裾野の拡大が期待できる。また、細胞遊走のメカニズムについてもSDF-1 (stromal derived factor-1)、GRO-、MCP-1の関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In our study, dental pulp tissue fragments were placed between porous membranes and cultured, and cell migration at the tissue margins was observed. Next, we focused on SDF-1 (stromal derived factor-1) as a mechanism of cell migration, and immunostaining of the tissue fragments showed that SDF-1 was most strongly expressed in the tissue fragments cultured for 72 hours. Furthermore, when the tissue fragments were cultured with a neutralizing antibody against SDF-1, it was confirmed that the migration of cells in the tissue fragments was delayed. In addition, when proteins were extracted from the pulp tissue fragments and analyzed using multiplex assay, it was confirmed that the expression levels of two other factors, GRO- and MCP-1, increased over time.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 歯髄組織 凍結保存 間葉系幹細胞 再生医療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

医療廃棄物である抜去歯の歯髄組織内に間葉系幹細胞が存在することが確認されている。この細胞は dental pulp stem cells: DPSCs と呼ばれ、現在臨床応用されている骨髄および脂肪組織由来の幹細胞と同程度の分化能を有しながらそれらの幹細胞と比較して高い増殖能を持つこと、遺伝子変異の蓄積が少ないことから、最近、再生医療における重要な細胞ソースとして注目されるようになってきた。

先行研究にて、抜去歯より採取した歯髄組織片の培養を行うことで、組織辺縁に細胞が集積し、保存液が浸透することにより、解凍後に組織片からの outgrowth 能を保持したまま凍結保存が可能であることが確認できた。

### 2. 研究の目的

本研究では、輸送中の組織片培養を可能にするシステムを構築することにより、より再生医療の裾野が拡大されることが期待される。また、細胞遊走のメカニズムについても検討を行う。

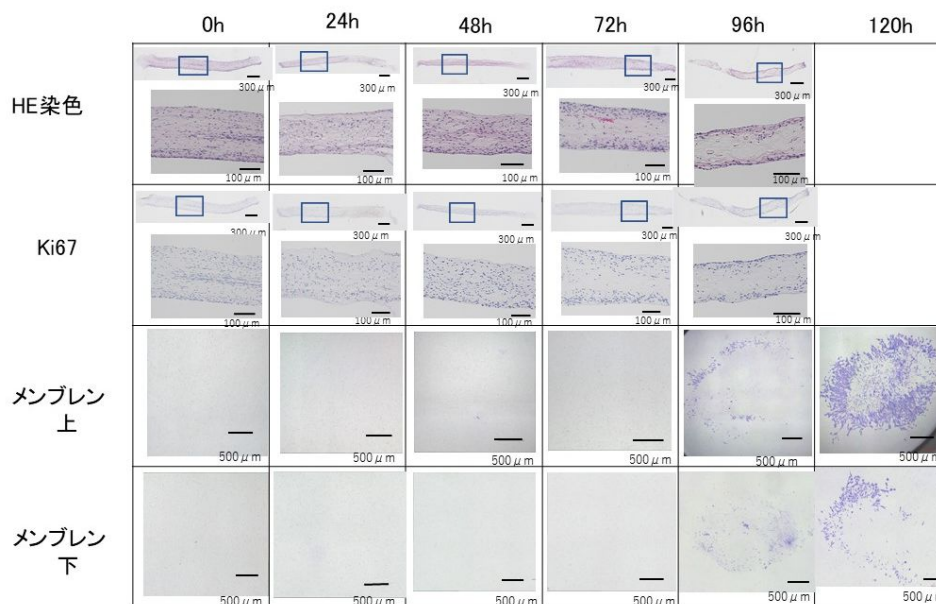
### 3. 研究の方法

鶴見大学歯学部附属病院で、研究内容に同意を得た患者の抜去歯より歯髄組織を採取。採取した歯髄組織片を細切し、メンブレン(ポアサイズ:0.4 $\mu$ m)で挟み、24、48、72、96時間培養を行う。使用するメディウムは -MEM、1%Penicillin-Streptomycin、10%FBS を用いる。採取直後の歯髄組織と各培養群の歯髄組織をパラフィン切片にして、H-E 染色を行い、組織片内の細胞の挙動を確認する。細胞遊走のメカニズムに関して SDF-1 (stromal derived factor-1)、細胞の偏在が細胞増殖によるものかを確認するために Ki67 で、それぞれ免疫組織化学染色を行う。さらに SDF-1 の中和抗体を添加して培養を行い、組織片内の細胞の挙動を確認する。

歯髄組織内での細胞動態に関与する可能性のある分子の検索を目的に、マルチプレックスによる網羅的解析を行う。

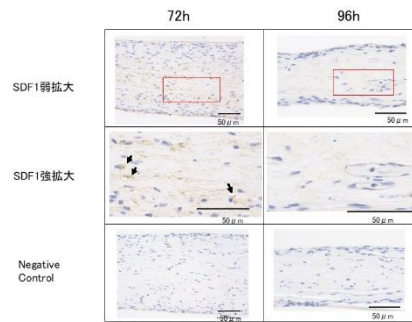
### 4. 研究成果

歯髄組織片を多孔性メンブレンで挟み、72時間培養した群は24時間、48時間培養群と比較して、組織辺縁での細胞集積が一番多く確認できた。また、96時間では、組織より細胞外へ遊走されていた。これらの結果から、72時間の組織培養が凍結保存に最も適していることが示された。

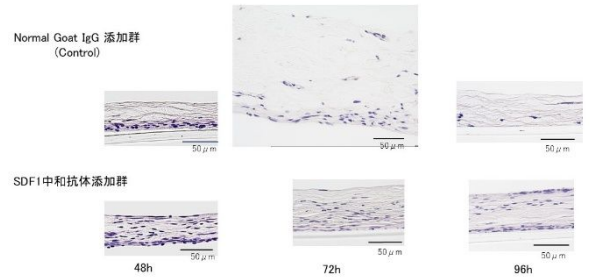


また、細胞遊走のメカニズムの検討結果では、72時間培養した組織片で SDF-1 が最も強く発現していることが確認できた。SDF-1 の中和抗体を添加して組織片培養を行ったところ、組織片への細胞集積が遅れることも確認できた。

## SDF1の発現



## SDF1中和抗体添加による歯髄組織片内の細胞動態への影響



マルチプレックスを用いたタンパクの発現量の解析を行ったところ、GRO- $\alpha$ 、MCP-1の2つの因子が経時的に発現量が増加していることが確認できた(未発表)。これら2つの因子はそれぞれ好中球、単球の走化性因子などとして知られているため、細胞の遊走促進因子の重要な候補であると考えられる。

本研究法により、輸送期間を利用した歯髄組織培養と歯髄幹細胞の効率的回収が可能であることが示された。またそのメカニズムとして、SDF-1等に制御された歯髄組織内の細胞の遊走が関与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅原茉愛、戸田（徳山）麗子、竹部祐生亮、伊地知耕平、遊道俊雄、里村一人
2. 発表標題 歯髄幹細胞の効率的回収と輸送を可能とする新規凍結保存法の開発
3. 学会等名 第32回日本口腔内科学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------