

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06317・19K21403

研究課題名(和文)無血清培養における歯髄幹細胞の接着分子メカニズムの解明～臨床的細胞培養法の確立～

研究課題名(英文) Establishment of clinical culture method for human dental pulp stem cells under the xeno-free culture condition.

研究代表者

望月 真衣 (Mochizuki, Mai)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：90821934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ゼノフリー無血清培養下においてヒト抜去歯からの歯髄幹細胞の分離と大量培養に成功した。一方で、無血清培養下の歯髄幹細胞は過度な培養により多層化と細胞死が生じた。そこで本研究は、無血清培養による安全で効率的な臨床的培養法の確立に向け、歯髄幹細胞の接着形態に着目し、その細胞接着機構の解明を目的とした。本研究により、無血清培養下における歯髄幹細胞の多層化には、細胞の細胞外基質の分泌が関与している可能性が示唆された。さらに、無血清培養において培養シャーレのtype 1 collagen コーティングは、歯髄幹細胞の接着や増殖に有利にはたらし、多層化に伴う細胞死を回避することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん化リスクのないヒト歯髄幹細胞の再生医療応用に向け、細胞治療に有用な培養法の確立を目指し、無血清培養における効果的な歯髄幹細胞培養に貢献する知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that a xenogeneic serum-free culture medium (XFM) is preferable over fetal bovine serum-containing culture medium for ex vivo expansion of human dental pulp-derived stem cells (hDPSCs). However, we observed that cells grown in XFM frequently undergo apoptosis when they form multilayered cell structures upon reaching over-confluence. Therefore, we focused on optimizing the XFM culture system to avoid the undesirable death of hDPSCs. This study demonstrated that type 1 collagen coating of the cultureware promoted hDPSC adhesion and proliferation. Furthermore, this coating prevented cell death due to multilayered cell growth in XFM conditions. The results provide further insights into the safe and reliable handling of somatic stem cell cultures.

研究分野：発生・再生医科学

キーワード：無血清培養 歯髄幹細胞 間葉系幹細胞 細胞培養 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

我々は以前、抜去智歯から複数のヒト歯性幹細胞を分離し、ヒト腸骨骨髓由来幹細胞と同等の多分化能を示すことを明らかにした⁽¹⁾。特に歯髄幹細胞はヒト歯性幹細胞のなかでも細胞保存状態が良いことで知られ、抜歯治療は二次的侵襲もないことから、再生医療に有用な細胞源として期待されている。

歯髄幹細胞を含む間葉系幹細胞の培養では、ウシ胎仔血清を添加した培養が一般的である。しかし、ウシ胎仔血清は、プリオンやウイルス感染の危険性があることから、ウシ胎仔血清非添加(無血清)培養液 PRIME-XV[®] MSC Expansion XSFM を用いて、歯髄組織からの歯髄幹細胞の分離を試みたところ、細胞の初期接着に時間を要したものの初代培養に成功し、さらに長期の無血清培養による歯髄幹細胞の大量培養を可能とした⁽²⁾。その一方で、無血清培養の歯髄幹細胞は、オーバーコンフルエントまで培養すると多層化して顕著な細胞死が生じることがわかった。

くわえて、多層化した細胞を継代すると凝集塊を形成して細胞が増殖せず、著しい細胞増殖の破綻をきたすことがわかり、無血清培養の問題点が明らかとなった(図1)。

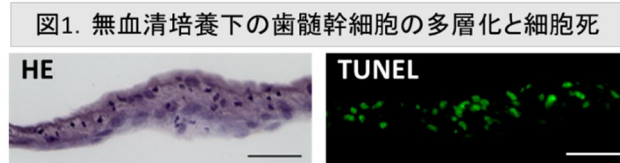


図1. 無血清培養下の歯髄幹細胞の多層化と細胞死
オーバーコンフルエントにより細胞が多層化を示し、多くの細胞死を認める。
Mochizuki M et al. *Stem Cell Res Ther* 9(1): 25, 2018.

したがって、歯髄幹細胞を用いた無血清培養では、過度な培養を避け、適切な時期に継代培養を行うことが必要となり、臨床的培養法の確立を要することが示された。

2. 研究の目的

本研究は、細胞死をもたらす多層化の原因が、無血清培養下で示す DPSCs の特異的な細胞接着に起因すると仮定し、無血清培養下での細胞接着機構のメカニズムを明らかにし、安全で予知性の高い臨床的細胞培養法の確立を本研究の目的とした。これらの知見から無血清培養の問題点を解決することで、DPSCs をより臨床応用に実用的な細胞として提供することができる。

3. 研究の方法

ヒト抜去歯から歯髄組織を採取し、酵素法にて歯髄幹細胞を分離した。培養液は、ウシ胎児血清非添加(無血清)培養液 PRIME-XV[®] MSC Expansion XSFM と、対照としてウシ胎児血清添加(血清添加) DMEM/F12 培養液を用いた。

無血清培養下における歯髄幹細胞は、「過度な培養による細胞の多層化とそれに伴う細胞死」と「多層化した細胞の継代による凝集塊の形成と細胞増殖の停止」により、細胞増殖の破綻が生じる。これらの主な理由は、培養シャーレへの細胞接着や細胞間の接着形態に起因すると考え、無血清培養において、以下の方法で細胞の接着における検討を行った。

(1) VS. 培養基材(シャーレ)との接着機構の解析

細胞の接着に寄与する要因として、“電荷”による培養シャーレの表面加工の影響を解析した。通常、血清は正電荷を帯びて細胞接着に有利に働くが、無血清培養では細胞接着が困難であり、我々も実際に初代培養時の初期接着の延長を経験した。そこで、負電荷および正電荷に帯電加工された培養シャーレを用い、無血清培養下における歯髄幹細胞の接着について検討した。さらに、一般的なコーティング基材であるタイプ コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ポリ D リジンを培養シャーレにコーティングし、細胞の接着について検討した。

(2) VS. 細胞外マトリックス(ECM)との接着機構の解析

多層化した歯髄幹細胞の ECM 産生能を検討するため、遺伝子発現解析、ならびにウェスタンブロット、免疫染色によるタンパク発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) VS. 培養基材（シャーレ）との接着機構の解析

無血清培養下における歯髄幹細胞は、「負電荷」に処理された培養基材で接着、増殖を示し、「正電荷」に処理された培養基材では、一時的な細胞接着は認められたものの、増殖は示さなかった。一方で、血清添加培養下では、すべての電荷処理条件で細胞が接着し、増殖を示した。以上より、無血清培養下における歯髄幹細胞は、電荷による影響を非常に受けやすいことが明らかとなった。

またコーティング基材による検討では、無血清培養下において、培養シャーレをタイプ コラーゲンでコーティングすると、他のコーティング基材にと比較して、早期に細胞が接着し増殖した（図2）。

さらに、無血清培養下においてタイプ コラーゲンコーティングは、歯髄幹細胞の増殖を促し、さらに多層化後も細胞死を回避し細胞数の減少に至らなかった。一方で、過去に報告した無血清培養法では、多層化を示したあと細胞数の減少を示した（図3）。

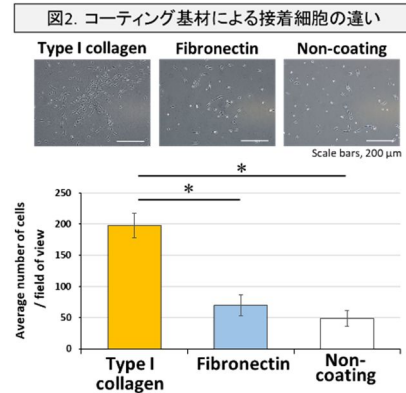
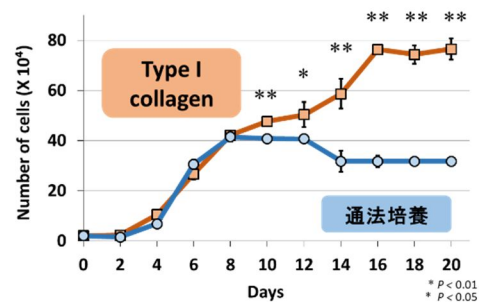


図3. Type I collagenコーティングによる歯髄幹細胞の増殖



(2) VS. 細胞外マトリックス（ECM）との接着機構の解析

無血清培養下における、タイプ コラーゲンコーティングによる細胞死の回避について調べるため、多層化した歯髄幹細胞の免疫組織学的解析を行った。すると、タイプ コラーゲンコーティングにより、多層化した歯髄幹細胞の周囲には均一なタイプ コラーゲンが発現していた。一方で、通法培養法では多層化の中間層でタイプ コラーゲンの発現が乏しく、細胞死を認めた。よって、タイプ コラーゲンの均一な産生が、細胞死を回避する可能性が示唆された。

さらに、タイプ コラーゲンコーティング上で培養された歯髄幹細胞は、多層化後の継代細胞においても間葉系幹細胞特性と正常な核型を維持していた。

以上より、タイプ コラーゲンコーティングは、無血清培養下においてオーバーコンフルエントにおける細胞死を防ぎ、間葉系幹細胞特性と正常細胞を維持してさらに多くの細胞数を獲得できることが明らかとなった。これらの知見は、再生医療に向けた実践的培養法に不可欠な知見を提供し、安全かつ予知性の高い臨床的細胞培養法の確立に有用である。

<引用文献>

- (1) Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*. 2013;101:121-32.
- (2) Mochizuki M, Nakahara T. Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 Type 1 collagenを用いたヒト歯髄幹細胞の臨床的培養法の確立
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 ゼノフリー無血清培養下における 型コラーゲンの影響～ヒト歯髄幹細胞の臨床的培養法の確立～ ; Effect of type 1 collagen under xeno-free culture condition for the establishment of the clinical culture method using human dental pulp stem cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 臨床的歯根再生に向けた歯根膜幹細胞の特性評価
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 無血清培養によるヒト歯髄幹細胞の大量培養に向けたI型コラーゲンの可能性～安全を約束する臨床的培養法の確立～
3. 学会等名 日本組織培養学会 第92回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mochizuki M, Nakahara T
2. 発表標題 Effects of type I collagen on human dental pulp stem cells grown in xenogeneic serum-free medium for establishment of a practical culture method
3. 学会等名 17th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月真衣
2. 発表標題 異種血清非存在下におけるヒト歯髄幹細胞の分離・同定とDMSOフリー凍結保存の検証～再生医療に向けた臨床的培養法の確立～
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 再生医療のための無血清培養およびフィブロネクチンコーティングによるヒト歯髄幹細胞の分離と同定
3. 学会等名 令和元年度日本歯科大学歯学会大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 再生医療に向けたヒト歯髄幹細胞における臨床的培養法の確立
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月真衣、中原 貴
2. 発表標題 ゼノフリー無血清培養におけるヒト歯髄幹細胞の細胞死の究明～臨床的培養法の確立に向けて～
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----