

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17029

研究課題名(和文)自己多層化DPSCシートを用いた無血清培養システムによる新規骨再生法の開発

研究課題名(英文)Development of self-multilayered cell sheets for bone regeneration.

研究代表者

望月 真衣 (Mochizuki, Mai)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：90821934

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)：本研究は、歯髄幹細胞(DPSC)を用いた安全な細胞治療を目指して、無血清培養下で形成される「自己多層化細胞シート」による新規骨再生法の開発を目的とした。本研究成果によって無血清培養条件の最適化を達成した自己多層化細胞シートは、ピンセットで把持できるほどの優れた操作性と強度を有し、さらにin vitroとin vivoにおいて高い硬組織形成能を示した。特許出願も完了した全く新しい細胞シート技術に基づく自己多層化細胞シートは、安全かつ効果的な硬組織再生医療に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的な再生医療に対する期待の高まりにともない、細胞を用いた再生医療は安全性と有効性が求められ、さらに治療技術の高い再現性を備えた医療提供が望まれる。

本研究は、異種血清を含まない無血清培養下で歯髄幹細胞(DPSC)を培養して、短時間で効率的に自己多層化細胞シートを形成する新技術を開発した(特許出願中)。さらに、優れた操作性と強度を有する自己多層化細胞シートは、高い硬組織形成能を示した。

本研究成果から、自己多層化細胞シートによる安全かつ効果的な硬組織再生医療が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a novel cell sheet engineering method known as the “self-multilayered cell sheets” using dental pulp stem cells (DPSCs), for safe and efficient bone regeneration therapy. The self-multilayered cell sheets were synthesized by optimizing the serum-free culture conditions. The cell sheets had optimal strength and were easily manipulated by forceps. Moreover, they had the ability to form hard tissues in vitro and in vivo. Our novel cell sheet engineered technology will contribute to the safe and effective hard tissue regenerative medicine using DPSCs.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 無血清培養 自己多層化 細胞シート 硬組織再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた再生医療が進むなか、間葉系幹細胞(MSCs)の一種である歯髄幹細胞(DPSCs)は、再生医療に有用な細胞ソースである【1】。申請者は以前、無血清培養において歯髄からの幹細胞の分離と大量培養に成功した。一方で、この無血清培養は、過度な培養を続けると多層化して細胞死をまねき、細胞数の減少を引き起こすことがわかった。この問題を解決するために申請者は、細胞の足場となる培養皿のコートニング基材に着目し、複数の細胞外マトリックスを検討した結果、type 1 collagen (COL) を選択した。COL コートニングした無血清培養 (COL - 無血清培養) では、DPSCs は活発な増殖を維持し、多層化した後も細胞死を生じることなく、従来の無血清培養より約 2 倍の細胞数を獲得することに成功した (図 1)。くわえて、多層化した DPSCs は、増殖能や多分化能を有する幹細胞特性と正常な染色体構造を維持して、がん化・腫瘍化は見られなかった【2】。さらに面白いことに、COL - 無血清培養

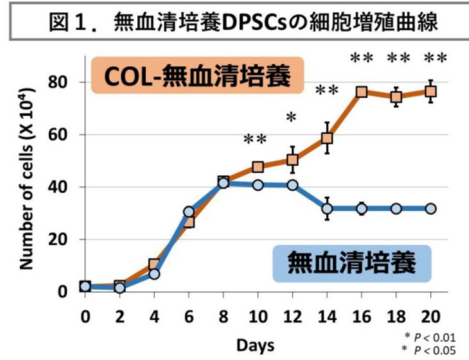


図 1. 無血清培養 DPSCs の細胞増殖曲線  
COL-無血清培養の DPSCs は、通法培養の約 2 倍の増殖を示す。  
Mochizuki M et al. *Stem Cell Res Ther.* 11: 267, 2020.

の DPSCs は、細胞自身が豊富なコラーゲンを産生して多層化する“自己多層化”を示すことが明らかとなった【3】。そこで申請者は、自己多層化を誘導する DPSCs のコラーゲン産生能が、三次元的な骨芽細胞分化にも効果的か否かに着目した。一般に、骨芽細胞は MSCs から分化し、コラーゲンやオステオカルシンなどの骨基質タンパクを合成・分泌して骨組織の石灰化に関わることが知られている。したがって、COL - 無血清培養下では、自己多層化により細胞シートを形成した DPSCs、すなわち『自己多層化細胞シート』は、コラーゲンが主要な基質を構成する骨組織にとって、新たな骨再生技術になると考えた。

## 2. 研究の目的

申請者がこれまでに報告した無血清培養法は、ヒト抜去歯からの歯髄幹細胞 (DPSCs) の分離から培養の全ての過程で異種血清に触れることなく、きわめて安全な培養法で大量の幹細胞を獲得できる。さらに、COL - 無血清培養した DPSCs は、骨基質となるコラーゲンを豊富に産生した『自己多層化細胞シート』を自律的に形成するため、特別な生体材料を用いることなく簡便で操作性に優れた細胞シートとして治療応用が可能となる。

本研究は、COL - 無血清培養法によって作製された『自己多層化細胞シート』の骨分化機構を明らかにし、安全性と有効性を備えた新規骨再生法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

COL - 無血清培養下で自己多層化する DPSCs を活用した新たな骨再生技術を開発するには、短期間、かつ高い再現性で自己多層化細胞シートを形成することにくわえ、自己多層化した DPSCs の効率的な骨形成細胞への分化が重要である。

そこで本研究では、以下に示す 2 つの戦略を立て実行した。

### (1) 細胞移植に適した自己多層化細胞シートの作製

従来の COL - 無血清培養法では、培養 14 日目から多層化を示し、細胞数は 16 日目で最大になるが、臨床的にはより短い期間で自己多層化するのが望ましい。そこで、培養期間の短縮を図りつつ、移植時の操作性に優れた自己多層化細胞シートの作製条件を検討した。はじめに、播種細胞数と培養期間を評価する成長曲線評価を行い、自己多層化細胞シートの評価は一般染色と免疫染色を含む組織学的解析、フローサイトメーターによる表面抗原解析を行った。

### (2) In vitro / in vivo における自己多層化細胞シートの硬組織再生評価

自己多層化細胞シートを骨分化誘導し、アリザリンレッド染色により石灰化ノジュールを評価した。さらに自己多層化細胞シートで骨補填材を被包し、免疫不全マウスの皮下に移植した。移植物は、一般組織染色と免疫染色により新生硬組織形成の解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) COL-無血清培養条件の最適化

自己多層化細胞シート作製に最適な無血清培養条件を確立するため、播種細胞数および培養期間を評価した。結果として、 $1 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup>の細胞を播種し、培養 10 日目に各種コラーゲンの豊富な産生を認める培養条件が最適であった(図2)。最適化された自己多層化細胞シートは細胞死を認めず、さらに十分な厚みと強度を示して高い操作性を有する細胞シートであることが明らかとなった(図3)。また表面抗原解析から、自己多層化した DPSCs は type collagen 特異的な integrin 2 の持続的な発現を維持していることわかった(図4)。

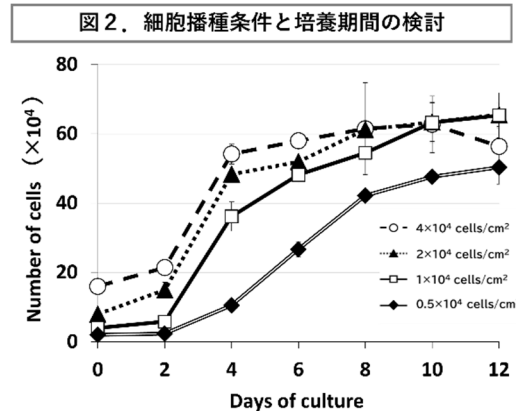


図3. 最適化された『自己多層化DPSCs』は十分な厚みを有し、死細胞を認めない

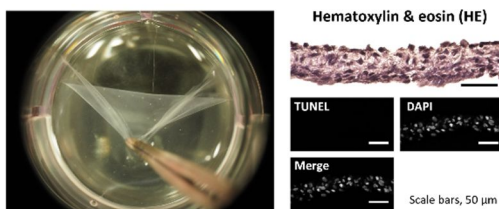
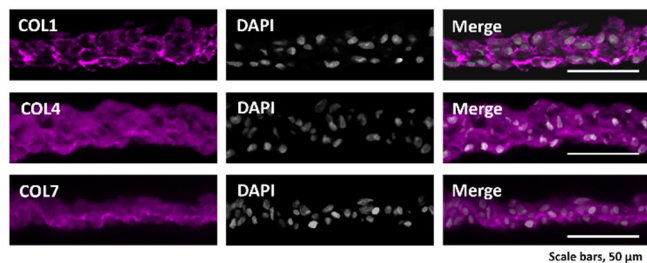


図4. 自己多層化DPSCsは豊富なコラーゲン産生を認める



##### (2) 自己多層化細胞シートの硬組織形成評価

In vitro 解析では、骨分化誘導により自己多層化細胞シートは巨大な石灰化ノジュールを形成した。また、免疫不全マウスの皮下移植によって、自己多層化細胞シートは大量の新生硬組織を形成して腫瘍化は認めなかった。

以上の知見から、DPSCs が特定の培養条件によって効率的に自己多層化して細胞シートを形成できる、新たな細胞シート作製技術の開発に成功した。さらにこの自己多層化細胞シートは、従来には見られなかった高い機械的強度を有してピンセットで把持することが可能なため、移植物の作製が簡便で操作性も良く、術者に問わず再現性の高い細胞治療が可能となる。本研究で得られた成果は、DPSCs を用いた安全かつ効果的な硬組織再生医療に貢献する。

#### < 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* 101(2):121-32, 2013.
- 【2】 Mochizuki M and 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 Research & Therapy* 9(1):25, 2018.
- 【3】 Mochizuki M, Sagara H, Nakahara T. Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture. *Stem Cell Research & Therapy* 11(1):267, 2020.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Xiao Li, Mochizuki Mai, Wang Dongliang, Shimamura Naohiro, Sunada Katsuhisa, Nakahara Taka	4. 巻 658
2. 論文標題 Types of cell culture inserts affect cell crosstalk between co-cultured macrophages and adipocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 10~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.03.068	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 該当する
1. 著者名 Wang Dongliang, Shimamura Naohiro, Mochizuki Mai, Nakahara Taka, Sunada Katsuhisa, Xiao Li	4. 巻 12
2. 論文標題 Enzyme-Digested Edible Bird's Nest (EBND) Prevents UV and arid Environment-Induced Cellular Oxidative Stress, Cell Death and DNA Damage in Human Skin Keratinocytes and Three-Dimensional Epithelium Equivalents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 609~609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox12030609	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 該当する
1. 著者名 Xiao Li, Mochizuki Mai, Fan Yumei, Nakahara Taka, Liao Feng	4. 巻 35
2. 論文標題 Enzyme-digested Colla Corii Asini (E'jiao) suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory changes in THP-1 macrophages and OP9 adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 885~895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-022-00694-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Xiao L, Mochizuki M, Fan Y, Nakahara T, Liao F	4. 巻 35(3)
2. 論文標題 Enzyme-digested Colla Corii Asini (E'jiao) suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory changes in THP-1 macrophages and OP9 adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human cell	6. 最初と最後の頁 885-895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-022-00694-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Arimura Y, Shindo Y, Yamanaka R, Mochizuki M, Hotta K, Nakahara T, Ito E, Yoshioka T, Oka K	4. 巻 16(5)
2. 論文標題 Peripheral-neuron-like properties of differentiated human dental pulp stem cells (hDPSCs).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0251356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/ journal.pone.0251356	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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 複数の間葉系幹細胞による自己多層化細胞シートの作製評価
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 ヒト歯髄幹細胞による自己多層化細胞シートの無血清培養条件の最適化とその応用Establishment and application of self-multilayered cell sheets using human dental pulp stem cells under xeno-free culture conditions
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 自己多層化した歯髄由来の間葉系幹細胞による新規骨再生法の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 「自己多層化」歯髄幹細胞シートを用いた安全かつ臨床的な新規骨再生法の開発
3. 学会等名 第66回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月真衣, 中原 貴
2. 発表標題 無血清培養における歯髄幹細胞の自律的多層化メカニズムの解明と臨床的培養法の確立
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月真衣
2. 発表標題 I型コラーゲンはゼノフリー無血清培養下で安全かつ有効的にヒト歯髄幹細胞を増殖促進する Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture
3. 学会等名 令和3年度日本歯科大学歯学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 多層細胞構造物及びその製造方法	発明者 中原 貴、望月真衣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-064720	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------