

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04383

研究課題名(和文) 血管網と神経網を有する人工歯髄様組織の創製と歯髄再生治療への応用

研究課題名(英文) Fabrication of artificial dental pulp-like tissue containing vascular and nerve networks for dental pulp regenerative medicine

研究代表者

今里 聡 (Imazato, Satoshi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：80243244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、人工歯髄様組織を根管内に移植する新たな歯髄再生療法を考案し、歯髄幹細胞からなる三次元細胞集合体の作製法を確立することに成功した。本研究では、これまでのプロジェクトを発展させ、血管網あるいは神経網を有する高次の歯髄様組織を創製する技術の確立を目指した。本研究の結果、歯髄幹細胞の分化能を利用することで、血管構造や神経細胞を有する集合体が作製できることが明らかとなった。また、作製した集合体を移植することで短期間かつ確実に歯髄様組織を形成できることが分かった。本研究で作製した人工組織は、効率的な歯髄再生を可能にする移植体として応用でき、新規の歯髄再生医療を実現させるうえで有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄の再生医療技術開発は近年重視されている課題であり、とくに、歯髄を完全に除去した根管内に歯髄組織を再生する方法には大きな注目が集まっている。本研究では、血管構造あるいは神経細胞をもつ歯髄幹細胞集合体を作製することに成功しており、生体外で機能化した人工歯髄様組織を創製することにつながる知見が得られた。本研究の成果は、従来にない、より安全かつ効率的な歯髄再生療法の実現に大きく寄与するため社会的意義が大きい。また本研究では、生体外で作製した人工組織内に幹細胞由来の血管構造を形成することに成功しており、血管形成が重要な再生医療技術開発分野に大きなインパクトを与える学術的意義もある。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that scaffold-free three-dimensional (3D) cell construct could be formed and its availability for fabricating the artificial dental pulp-like tissue in vitro. In this study, attempt to form a functionalized biomimetic tissue which enable to regenerate dental pulp within the pulpless teeth in a short period was performed by using 3D cell constructs. It was revealed that 3D cell constructs with vascular-like structure or nerve-like cells were successfully fabricated by utilizing the differentiation ability of dental pulp stem cells (DPSCs). In addition, vascularized DPSC constructs promoted dental pulp regeneration compared with the use of undifferentiated DPSC constructs. Functionalized dental pulp-like tissue based on the 3D DPSC construct could be applied as a transplant and this artificial tissue is a promising biomaterial for achieving the tailor-made dental pulp regenerative medicine.

研究分野：生体材料学

キーワード：再生歯学 歯髄再生療法 組織工学 生体材料学 細胞集合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯髄の再生医療技術開発は近年重視されている課題であり、とくに、炎症などが原因で歯髄を完全に除去した根管に歯髄組織を再生する方法には大きな注目が集まっている。我々は、*in vitro* で作製した人工歯髄様組織を無髄歯根管内に移植する新たな歯髄再生療法を考案し、これまで、歯髄幹細胞 (DPSC) からなる scaffold-free の三次元細胞集合体の作製法、ならびに集合体を構成する細胞を象牙芽細胞へ分化誘導する技術の確立に成功した。さらに、DPSC 集合体をヒト抜去歯に移植すると、根管内に歯髄様組織を形成できることを明らかにしてきた (Itoh Y, *et al.* J Dent Res, 2018)。

一方、DPSC は発生学的に外胚葉性間葉組織である神経堤由来の細胞であり、近年の細胞生物学の発展によって、その特殊な分化能が明らかになっている。DPSC は血管内皮増殖因子 (VEGF) のレセプターを恒常的に発現しており、VEGF を含む増殖因子カクテルを添加した培地で DPSC を培養すると、他の間葉系幹細胞と比較して容易に血管内皮細胞へ分化することが知られている (Sasaki JI, *et al.* J Dent Res, 2020)。さらに、DPSC を N2B27 培地で培養することで、イオンチャネルを有する神経細胞を得られることが報告されている (Li D, *et al.* Stem Cell Rev Rep, 2019)。

これらを背景として、我々は DPSC が潜在的にもつ分化能を利用することで、血管網や神経網を有する高次の人工歯髄様組織を *in vitro* で創製できるのではないかと着想した。すなわち、DPSC 集合体に適切な分化誘導を施すことで、血管網や神経網が形成された人工歯髄様組織を作製することが可能であり、それを生体材料として応用することで効率的な歯髄再生医療が実現するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、血管網あるいは神経網を有する DPSC 集合体を *in vitro* で構築する技術を確立し、さらに動物への移植実験を行うことで高次の人工歯髄様組織を用いた新規の歯髄再生療法の実現可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) DPSC 集合体の血管内皮細胞分化誘導と内部構造観察

成人第三大臼歯由来 DPSC (Lonza) を用いて作製した集合体を EGM-2MV (Lonza) に VEGF (50 ng/mL) を添加した血管内皮細胞分化誘導培地を用いて最長 20 日間まで培養した。細胞集合体を構成する DPSC の生存率を検討することを目的として、培養 0、5、10、20 日目の各試料を長軸方向と平行に中央部分を切り出し、Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit を用いて染色した。次に、DPSC 集合体内に管腔様構造が形成されているか否かを観察するために、デキストランビーズを用いた蛍光イメージング解析を行った。上述と同様の試料に対して固定処理を行った後、FITC-デキストラン (Sigma-Aldrich) を含むリン酸緩衝生理食塩水に 24 時間浸漬した。その後、試料を長軸方向と平行に中央部分を切り出し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

また、血管内皮細胞分化誘導を施した DPSC 集合体の組織学的解析を行うために、最長 20 日間培養した集合体からパラフィン包埋薄切切片を作製し、血管内皮細胞分化マーカーである von Willebrand factor (vWF)、CD31、および間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 に対する免疫蛍光染色を行った。

2) DPSC 集合体の神経細胞分化誘導と内部構造観察

DPSC 集合体の神経細胞分化誘導には間葉系幹細胞神経分化誘導培地 (PromoCell) を用い、最長 20 日間培養した。まず、神経細胞分化誘導による細胞集合体の形態変化を調べるため、経時的に実体顕微鏡観察を行い、得られた像から画像解析ソフトを用いて大きさの変化を評価した。

次に、各試料からパラフィン包埋薄切切片を作製し、HE 染色およびニッスル染色、さらに神経細胞分化マーカーであるニューロフィラメントとグリア線維性酸性タンパク質に対する免疫蛍光染色を行い、集合体内に神経細胞が形成されているか観察した。また、神経細胞分化誘導 20 日後の集合体内にイオンチャネルを有する神経細胞が形成されているかについて、電気生理学的手法を用いた検討を行った。

3) 血管網を有する DPSC 集合体の歯髄再生能評価

血管誘導を施した DPSC 集合体の歯髄再生用移植材としての有用性を *in vivo* で検討することを目的として、ヒト抜去歯の根管に集合体を移植し、免疫不全マウスに埋入する実験を行った。具体的には、血管内皮細胞分化誘導培地で 10 日間培養した DPSC 集合体を、80 号まで拡大したヒト抜去単根管歯の根管に填入し、マウスの背部皮下腔へ埋入した。移植 6 週間後、マウスから試料を取り出し、マイクロ CT 解析および組織染色を行うことで根管内部に形成された歯髄様組織の組織学的検討を行った。また、通常培養培地で 10 日間培養した細胞集合体をヒト根管に填入し、同様の方法で免疫不全マウスに埋入した試料をコントロール群とした。

4. 研究成果

1) DPSC 集合体の血管内皮細胞分化誘導と内部構造観察

血管内皮細胞分化誘導を施した DPSC 集合体内部の細胞の生存について検討したところ、集合体は主に生細胞によって構成されていることが分かった(図1A)。細胞集合体内の生細胞の割合は、培養10日目までの試料では有意差が認められなかったが、培養20日目(95.1±2.2%)では有意に低下した。また、蛍光イメージング解析の結果、培養10日目で集合体外層に蛍光ビーズの集積を認め、さらに、培養20日目では明瞭な管腔様構造が形成されている様子が観察された(図1B)。これまでの研究で、分化誘導を施していない集合体中心部では死細胞が約15%も存在することが分かっており、これらの結果から、DPSC 集合体内に血管網様構造が形成されたことで、培地が内部まで浸透しやすい構造に改善されたものと考えられた。

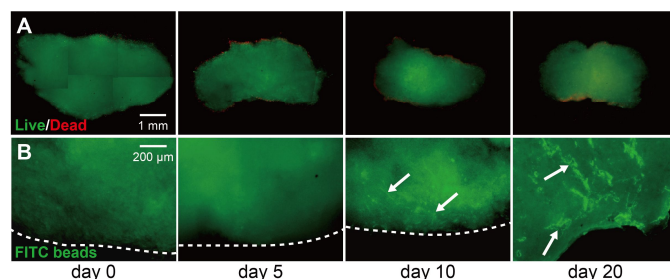


図1. 血管網を有する DPSC 集合体

(A) 血管内皮細胞分化誘導を施した集合体は主に生細胞(緑色)で構成されている。死細胞は赤色で示す。(B) 蛍光ビーズを集合体に導入することで内部に形成された管腔様構造を可視化した(矢印)。

血管内皮細胞分化誘導を施した DPSC 集合体の免疫蛍光染色の結果、vWF 陽性細胞は培養0日目ではわずかに認められる程度であったが、培養時間の経過とともに増加し、培養20日目の集合体外層の細胞に vWF の強い発現が確認された。また、強拡大での観察では、培養20日目に vWF 陽性細胞が集合体外層で網目状構造を形成している様子が観察された。CD31 の免疫蛍光染色の結果においても、vWF の結果と同様に、培養10日目および20日目に、集合体外層の細胞において CD31 の強い発現が認められた。また、培養20日目には、CD31 陽性細胞が管腔様構造を形成している様子が観察された。一方、STRO-1 の免疫蛍光染色の結果から、作製直後の細胞集合体は陽性細胞で構成されていることが分かった。また、20日間の分化誘導後の集合体内においても陽性細胞は存在していたが、培養期間が長くなるにつれて、集合体外層の STRO-1 陽性細胞が減少する様子が認められた。

2) DPSC 集合体の神経細胞分化誘導と内部構造観察

神経細胞分化誘導培地による長期培養で生じる DPSC 集合体の形態変化について検討したところ、集合体の体積が経時的に減少することが分かった。また、HE 染色およびニッスル染色の結果から、集合体は培養0日目では疎な構造であるが、培地20日目には線維束様の内部構造を呈すること、さらにはニッスル染色に陽性の細胞が経時的に増加することが明らかとなった。また免疫蛍光染色の結果から、細胞集合体内ではニューロフィラメントやグリア線維性酸性タンパク質に陽性の細胞も培養期間を通じて増加することが分かった。

次に、分化誘導を施した集合体のスライス片に対して全細胞パッチクランプ法を行ったところ、集合体を構成する細胞のなかにナトリウムチャンネルやカリウムチャンネルをもった細胞が存在することが明らかとなった。以上の結果から、神経細胞を有する DPSC 集合体を *in vitro* で創製できる可能性が示された。

3) 血管網を有する DPSC 集合体の歯髄再生能評価

マイクロ CT を用いて根管内に形成された組織を定量評価した結果、コントロール群と比較して、血管網を有する集合体を移植した群で根管内に有意に多くの歯髄様組織が形成されていることが分かった(図2A)。さらに、形成された歯髄様組織内に宿主の血球系細胞を含んだヒト CD31 陽性細胞からなる血管が形成されていること、および象牙質に近接する部位には象牙芽細胞様細胞が存在することが明らかとなった(図2B,C)。

本研究の結果、DPSC の分化能を応用することで、血管網や神経網を有する人工歯髄様組織を *in vitro* で創製することに成功した。また、血管網を有する歯髄様組織を応用することで短期間での歯髄様組織の形成が可能であることが明らかとなった。本研究で作製した高次の人工歯髄様組織は、効率的な歯髄再生を可能にする移植体として応用可能であり、新規の歯髄再生医療を実現させるうえで有用であることが示唆された。

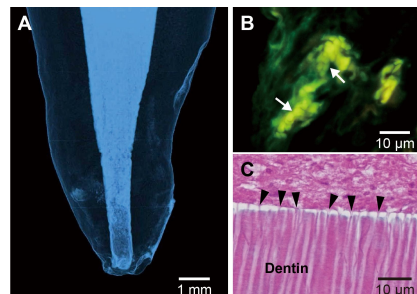


図2. DPSC 集合体の歯髄再生能

(A) マイクロ CT 像から根管内部に組織が形成されていることが分かる。(B) 宿主の血球(矢印)を含む CD31 陽性(緑色)の血管が形成されている。(C) 象牙細管に侵入する象牙芽細胞様細胞が観察できる(矢印)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Sasaki JI, Yoshimoto I, Katata C, Tsuboi R, Imazato S. | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 Freeze-dry processing of three-dimensional cell constructs for bone graft materials. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials | 6. 最初と最後の頁 958-964 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34448. | 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 - |
| 1. 著者名 Sasaki JI, Kiba W, Abe GL, Katata C, Hashimoto M, Kitagawa H, Imazato S. | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Fabrication of strontium-releasable inorganic cement by incorporation of bioactive glass. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Dental Materials | 6. 最初と最後の頁 780-788 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2019.02.019. | 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 - |
| 1. 著者名 Sasaki JI, Katata C, Abe GL, Matsumoto T, Imazato S. | 4. 巻 107 |
| 2. 論文標題 Fabricating large-scale three-dimensional constructs with living cells by processing with syringe needles. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A | 6. 最初と最後の頁 904-909 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.36613. | 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 - |
| 1. 著者名 Tsuboi R, Sasaki JI, Kitagawa H, Yoshimoto I, Takeshige F, Imazato S. | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Development of a novel dental resin cement incorporating FGF-2-loaded polymer particles with the ability to promote tissue regeneration. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Dental Materials | 6. 最初と最後の頁 641-648 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2018.01.007. | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, Katata C, Hayashi M, Imazato S. | 4. 巻 97 |
| 2. 論文標題 Pulp regeneration by three-dimensional dental pulp stem cell constructs. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dental Research | 6. 最初と最後の頁 1137-1143 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034518772260. | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Imazato S, Kitagawa H, Tsuboi R, Kitagawa R, Thongthai P, Sasaki JI. | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Non-biodegradable polymer particles for drug delivery: A new technology for "bio-active" restorative materials. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Dental Materials Journal | 6. 最初と最後の頁 524-532 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2017-156. | 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 - |

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 8件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sasaki JI. |
| 2. 発表標題 New approach for regenerative endodontics by transplantation of scaffold-free 3D DPSC constructs. |
| 3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堅田千裕, 佐々木淳一, 林 美加子, 今里 聡 |
| 2. 発表標題 血管内皮細胞分化を誘導した歯髄幹細胞集合体の歯髄再生能の評価. |
| 3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Abe G, Sasaki JI, Kohno T, Tsuboi R, Imazato S. |
| 2. 発表標題 Poly(lactic acid/caprolactone) bilayer membrane with slower degradation promotes bone formation in vivo. |
| 3. 学会等名 4th Meeting of the IADR/APR (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sasaki JI, Imazato S. |
| 2. 発表標題 New approach for pulp regeneration by transplantation of scaffold-free 3D constructs of human dental pulp stem cells. |
| 3. 学会等名 TERMIS World Congress 2018 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐々木淳一, 堅田千裕, 壺井莉理子, 今里 聡 |
| 2. 発表標題 歯髄幹細胞の血管内皮細胞分化におけるVE-cadherinの役割 |
| 3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 堅田千裕, 佐々木淳一, 林 美加子, 今里 聡 |
| 2. 発表標題 歯髄幹細胞集合体の血管内皮細胞分化誘導による管腔様構造の形成 |
| 3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Imazato S. |
| 2. 発表標題 New generation restorative materials with “bio-active” functions. |
| 3. 学会等名 2018 Seoul National University International Conference for Future Dentistry (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Imazato S. |
| 2. 発表標題 Approaches to achieve next generation restorative materials with “bio-active” functions. |
| 3. 学会等名 The 37th Annual Academic Session of the Korean Division of the IADR (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tsuboi R, Kitagawa H, Sasaki JI, Imazato S. |
| 2. 発表標題 Incorporation of small-sized FGF-2-loaded polymer particles into 4-META/MMA-TBB resin. |
| 3. 学会等名 96th General Session of the IADR (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 今里 聡. |
| 2. 発表標題 歯科用修復材料へのDDS機能の付与. |
| 3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会ジョイントシンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Imazato S. |
| 2. 発表標題 Advanced filler technologies to release bio-active components for restorative and preventive dentistry. |
| 3. 学会等名 CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 壺井莉理子, 北川晴朗, 佐々木淳一, 今里 聡. |
| 2. 発表標題 FGF-2担持ポリマー粒子を配合した4-META/MMA系接着性レジンの組織再生誘導能の評価. |
| 3. 学会等名 第70回日本歯科理工学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Imazato S. |
| 2. 発表標題 Non-biodegradable polymer particles for drug delivery to provide restorative materials with "bio-active" functions. |
| 3. 学会等名 NTU-JSDMD Joint Workshop 2017 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 佐々木淳一, 今里 聡 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 医歯薬出版株式会社 | 5. 総ページ数 15 |
| 3. 書名 歯科再生医学 (最先端歯科再生医療「歯髄・象牙質再生医療」) | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座（歯科理工学教室）
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~techno/>

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 | 佐々木 淳一 (Sasaki Jun-Ichi) (50530490) | 大阪大学・歯学研究科・講師 (14401) | |
| 研究分担者 | 松崎 典弥 (Matsusaki Michiya) (00419467) | 大阪大学・工学研究科・教授 (14401) | |

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 | | |
|---------|------------------------|--|--|
| 米国 | University of Michigan | | |
| 中国 | 香港大学 | | |
| 韓国 | Wonkwang University | | |