

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17274

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来未分化幹細胞における低酸素培養の影響

研究課題名(英文) Effects of dental pulp stem cells from deciduous teeth under hypoxia

研究代表者

河合 咲希 (Kawai, Saki)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70707067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究において、低酸素状態で培養された乳歯歯髄由来細胞において、通常培養と比較して低酸素培養において未分化マーカー遺伝子の有意な発現増強を認め、脂肪細胞への分化を確認した。本研究では骨芽細胞分化の検討を行ったが、低酸素培養は有意な影響を与えなかった。近年非熱的大気圧プラズマ(Non-thermal Atmospheric Pressure Plasma:NTAPP)は再生医療に関する報告がある。そこでNTAPPが乳歯歯髄由来細胞に対して細胞増殖能、未分化能を増強すると仮説を立て検討を行った。その結果NTAPP刺激は乳歯歯髄由来細胞において細胞増殖、未分化能を増強することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞は象牙芽細胞や骨芽細胞、軟骨細胞などへの分化能を有しており、その供給源として乳歯歯髄由来細胞は身体的に苦痛を伴うことなく採取できることから応用が検討されているが、歯髄中に含まれる幹細胞は0.4～0.8%と非常に少なく、幹細胞を利用するにはその多分化能や増殖能の維持・増強が必要である。今回の研究により、低酸素培養と同様に、非熱的大気圧プラズマ照射を行った乳歯歯髄由来細胞の細胞増殖、未分化能を増強する事が示唆された。このことは、幹細胞を用いた再生医療に必要なより多くの細胞数を確保でき利用できる細胞が増えるなど、今後さらに検討を行うことでさらなる再生医療のための効率的な方法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In my past study, hypoxia didn't affect cell proliferations of deciduous teeth (SHEDs) and it increased the gene expression of Oct3/4, sox2 and c-Myc, and enhanced adipogenic differentiation under hypoxia. These results suggested that hypoxia enhances the differentiation ability of SHEDs.

In this study, I examined the osteoblast differentiation but the hypoxia did not have an influence with the meaning for it.

Recently, the non-thermal atmospheric pressure plasma(NTAPP) was reported about the regenerative medicine. I created the hypothesis that NTAPP can increase differentiation ability, and examined cell proliferation of SHEDs and the gene expressions of undifferentiation markers. As a result, it was suggested that the NTAPP enhances cell proliferation and undifferentiated ability in SHEDs.

研究分野：小児歯科

キーワード：乳歯 歯髄 再生

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の利用は近年の再生医療研究において注目されている。歯科領域では、その供給源として歯髄細胞の利用が検討されており、なかでも乳歯歯髄幹細胞は身体的に苦痛を伴うことなく採取でき、骨髄由来幹細胞に比べて高い増殖能を持ち、永久歯歯髄由来細胞と比較して増殖能や分化能に優れていることから再生医療への応用が期待されている。しかし、歯髄中に含まれる幹細胞は 0.4~0.8%と非常に少なく、幹細胞を利用するにはその多分化能や増殖能の維持・増強が必要である。さらに幹細胞は象牙芽細胞や骨芽細胞、軟骨細胞などへの分化能を有しており、乳歯歯髄由来の幹細胞においても様々な細胞への分化能の研究が進められている。そして私は、乳歯歯髄幹細胞を再生医療に利用するため、その培養方法の検討を行うために研究を進めてきた。

過去にグリコーゲンシンターゼキナーゼ3に特異的な薬理的阻害剤である 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) はマウス・ヒト ES 細胞において未分化能を維持することが報告されている。(Sato N, et al.: Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004 10:55-63.)。BIO は未分化能の維持だけでなく、心筋細胞増殖の強化や、神経分化など、他の影響も示すことから様々な疾患において薬理的に可能性を秘めている。私はこれまでに、BIO がヒト乳歯歯髄由来細胞の未分化能を維持することを明らかにした (Effect of 6-bromoindirubin-3'-oxime on human deciduous tooth dental pulp stem cells. Kawai S, et al.: *Oral Therapeutics And Pharmacology*, 31(3):87-95:2012.)。また、幹細胞は通常 20%酸素で培養されているが、幹細胞に適した生理的酸素分圧は 1~2%であるといわれており、最近の研究において、低酸素状態で培養することにより、歯髄由来細胞や歯根膜由来細胞において、その幹細胞特性を維持できることが報告されている (Zhou Y, et al.: The effect of hypoxia on the stemness and differentiation capacity of PDLC and DPC. *Biomed Res Int* 2014(2014), Article ID 890675)。また、ヒト智歯より採取された歯髄由来細胞における研究では、低酸素培養時に歯根膜由来細胞と比較して高い ALP 活性が確認されたとの報告があり、高齢者より採取した歯髄由来細胞においても、低酸素培養を行うことで骨、象牙芽細胞への分化能が維持されたと報告されている。乳歯歯髄由来細胞が再生医療において注目されていながら、低酸素培養における研究は永久歯歯髄細胞を用いたそれと比較して少ない。低酸素培養でヒト乳歯歯髄由来細胞の幹細胞特性の維持や他の細胞への分化が可能であると考えられる。私は、通常培養下で乳歯歯髄由来細胞が永久歯歯髄由来細胞より増殖能が高いこと、未分化マーカーである遺伝子 (Oct3/4、Sox2) 発現増強、さらに低酸素培養下にて通常培養下と比較して Oct3/4、Sox2 の遺伝子発現増強および脂肪細胞への分化を確認している (Kawai S, et al.: Differentiation ability of dental pulp cells of deciduous teeth under hypoxia. *Journal of Oral Tissue Engineering*. DOI: <https://doi.org/10.11223/jarde.15.65>)。

ヒト乳歯歯髄由来細胞の未分化能を維持できる BIO を添加し低酸素状態で培養することで、さらなる未分化能の増強ができれば、さらに再生医療への研究や臨床へ貢献できる。そこで、本研究では、BIO 刺激乳歯歯髄由来細胞を低酸素状態で培養することにより、さらなる未分化能の増強が可能であるという仮説をもとに、細胞増殖能測定や、リアルタイム RT-PCR により検討を行う予定であった。

2. 研究の目的

乳歯歯髄は他の組織と比較して採取による侵襲が少なく、加齢に伴う遺伝子変異が少ない。また、硬組織に覆われているため外環境に起因した遺伝子変異を生じにくいなどの利点から再生医療の幹細胞ソースとして適している。さらに、乳歯歯髄由来細胞は骨髄由来幹細胞に比べて高い増殖能を持ち、永久歯歯髄由来細胞と比較して増殖能や分化能に優れている。また幹細胞は象牙芽細胞や骨芽細胞、軟骨細胞などへの分化能を有しており、乳歯歯髄由来の幹細胞においても様々な細胞への分化能の研究が進められている。そして、永久歯歯髄由来細胞を低酸素培養を行うことで骨、象牙芽細胞への分化能が維持されたと報告されている。低酸素培養が細胞増殖能、未分化能を増強する事も確認している。

さらに、近年、非熱的大気圧プラズマ (Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma: NATTP) の利用が創傷治癒、再生医療に関して報告がされている。低酸素培養と同様に、NATTP 照射が乳歯歯髄由来細胞の細胞増殖能や未分化能を増強させる可能性がある。

今回の研究により、低酸素状態での培養や NATTP 照射した乳歯歯髄由来細胞が増殖能、分化能を維持でき、さらに様々な細胞への分化が可能であれば、乳歯歯髄由来細胞の再生医療へのさらなる可能性を広げることができる。細胞増殖能、未分化能の増強ができれば、さらにそこで低酸素状態において分化能や増殖能に優れている乳歯歯髄由来細胞の多

分化能や増殖能の維持が可能であることを確認することが目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄細胞の採取および培養

乳歯および永久歯歯髄細胞は実験に関して十分に説明し本人や保護者の同意を得た後、乳歯は歯根が2/3以上残存するう蝕のない乳歯、永久歯は矯正治療や咬合誘導等の理由によって抜去されるう蝕のない永久歯より採取する。採取に関してはすでに、大阪歯科大学において医の倫理委員会の承認（大歯医倫理110713号）を得ている。採取した歯髄組織をフラスコに附着させ増殖してきた細胞を初代歯髄由来細胞とし、その後、10cm ディッシュで細胞を培養する。本研究には3-7継代した細胞を用いた。さらに、All Cells(Alameda, CA, USA)より購入したヒト乳歯歯髄由来細胞も本研究に使用し、採取してきた細胞と同様に培養を行い、3-7継代した細胞を実験に用いた。培養には -minimum essential medium supplemented(-MEM)へ10% fetal bovine serum (Life technologies. Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL penicillin (Life technologies), 100 µg/mL streptomycin (Life technologies), および2 mM L-glutamine (Life technologies)を添加したものを使用した。

・低酸素培養：マルチガスインキュベータ(MCO-5M(UV)/5M; SANYO Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)を使用した。

・NTAPP 照射：NTAPP は、大気圧マルチガスプラズマジェット源 (Plasma Concept Tokyo Co.)アルゴンガス (2.7L/min :sml) 照射距離20mmで行った。

(2) 細胞生存率の測定

細胞生存率の検討はMTS assayにより行った。

・低酸素培養細胞：96well plateにヒト乳歯歯髄由来細胞を 4×10^3 /wellで播種し、通常培養(20%酸素下)下および、低酸素状態(2%)にて1~5日間培養を行った後、CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA)を添加し1時間後、マイクロプレートリーダー (Spectra MaxM5; Molecular Devices Inc., Downingtown, PA, USA)にて460nm、690nmの吸光度を測定し、細胞増殖能の検討を行った。

・NATTP 照射細胞：24 well プレートに細胞を 2×10^4 個/mlで播種し、37°C 5%CO₂下で4日間培養を行った後、NTAPP 照射を行った。照射時間を10, 20, 30, 40秒間、それぞれの照射時間について照射回数を1, 2, 3回(1回/1時間)とした。照射後、37°C 5%CO₂下で3日間培養し、MTS 試薬を添加後低酸素培養と同様に検討を行った。

(3) 遺伝子発現変動

・NATTP 照射細胞：24 well プレートに細胞 2×10^4 個/mlを播種し、37°C 5%CO₂下で4日間培養後、NTAPP 照射を行った。37°C 5%CO₂下で3日間培養後にReal Time PCRを行った。プライマーはOct3/4 (Hs01654807_s1)、指標としてGAPDH(Hs02758991_g1) (全て Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)を使用した。

(4) 低酸素培養されたヒト乳歯歯髄由来細胞の骨芽細胞への分化能の検討

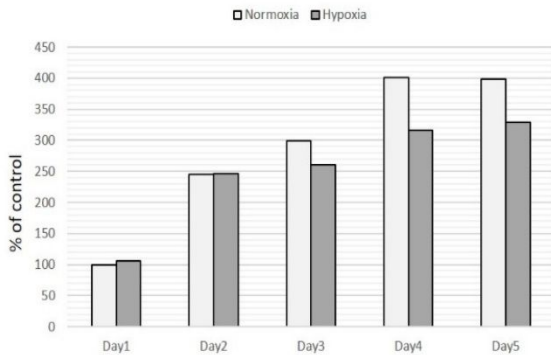
低酸素培養を行ったヒト乳歯歯髄由来細胞における他の細胞への分化能を検討するために、本研究では骨芽細胞分化への検討を行った。

6well plateに細胞を播種し2日後から骨芽細胞分化誘導培地(R&D)にて分化を開始し、21日間分化誘導した。培地は2~3日毎に交換した。2日間低酸素培養後通常培養を行った群(HN)そのまま21日間低酸素培養下で分化を行った群(HH)細胞の播種から通常培養を行った群(NN)について細胞形態の観察および骨芽細胞分化マーカーであるALP発現を定量した。

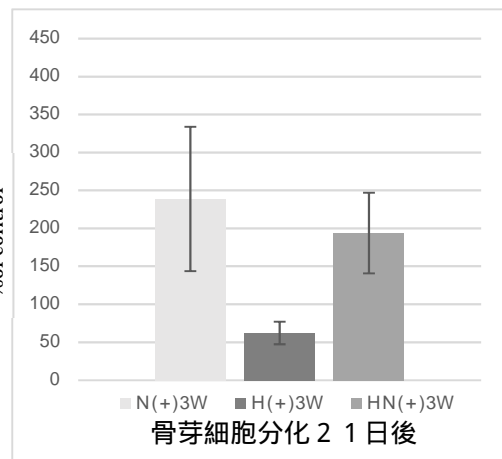
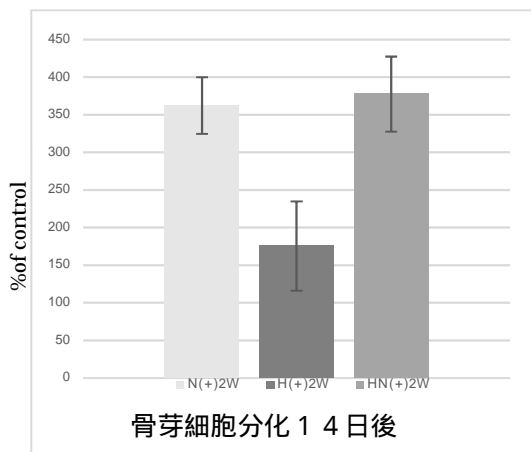
4. 研究成果

(1) 低酸素培養の細胞増殖能への影響

1～5日間の低酸素培養および通常培養した乳歯歯髓由来細胞において、細胞増殖能の有意な差は認められなかった。



(2) 低酸素培養の骨芽細胞分化検討



アルカリフォスファターゼ発現について、NNと比較して、HHは有意にALP発現が減少していた。HNに関しては、14日間分化においては増加がみられたが、有意な差はなくALP発現は通常培養下と同様に見られた。

(3) NATTP照射細胞の細胞増殖能検討

NATTP照射時間20秒、照射回数3回の群において最も有意な細胞増加が認められた。(n=3)

(4) NATTP照射細胞の遺伝子発現変動

NATTP照射細胞において、未分化マーカー遺伝子であるOct3/4遺伝子発現増加が認められた。

以上の結果より、本研究では、乳歯歯髓由来細胞の1～5日間の低酸素培養は細胞増殖能に影響を与えず、低酸素培養は骨芽細胞分化には有意な影響を与えないことがわかった。骨芽細胞への分化はさらなる条件検討が必要であると考えられる。

さらに、NATTP照射は照射時間20秒3回照射で乳歯歯髓由来細胞に有意な細胞増加がみられ、未分化マーカー遺伝子の一つであるOct3/4の発現増加がみられたことより、未分化能増強の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Aoki Sho, Harada Kyoko, Kawai Saki, Abe Yoko, Nagata Sachiko, Imataki Rie, Arita Kenji	4. 巻 30
2. 論文標題 Expression of Heat Shock Proteins in Response to Mild Short-term Heat Shock in Human Deciduous Dental Pulp Fibroblast-like Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 13 ~ 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.30.13	査読の有無 無
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0件

〔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
---------	---------