

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K24136

研究課題名(和文) 高密度培養と細胞塊培養を併用したヒト歯髄幹細胞の硬組織形成細胞への効率的分化誘導

研究課題名(英文) Efficient differentiation of human dental pulp stem cells into hard tissue forming cells using a combination of high density and spheroid cell culture method

研究代表者

野田 園子 (NODA, SONOKO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：70844322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒト歯髄幹細胞を培養することで、分化培地非存在下でも硬組織形成分化細胞へとコミットされることを利用し、さらに、足場を使わない三次元スフェロイド(細胞塊)培養を同時に行うことで分化培地および足場フリーの移植によって硬組織を形成することができるかどうかを検討することである。

歯髄幹細胞以外の口腔内由来間葉系幹細胞を歯髄幹細胞と同様の方式で分離し、歯髄、歯肉、歯根膜から幹細胞を得ることができたが、増殖能および石灰化能が安定していたのは歯髄由来の幹細胞であったため、歯髄由来幹細胞にて三次元培養を行い、マウス頭蓋骨にて骨の誘導があ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

歯髄幹細胞は不要な抜去歯から培養可能であるため、再生医療のソースとして注目されている。しかし、1本の歯牙から得られる組織量は少ないため、使用に際して培養培地と足場とが必要となる。培地に含まれる成分や足場は移植においてアレルギーの可能性や拒否反応の原因となる可能性が指摘されているが、本研究において従来骨再生に必要とされていた分化用の培地や足場を使用せずに高密度、スフェロイド(細胞塊)で歯髄幹細胞を培養することで石灰化能を高くもった細胞へと分化することが確認されたことで誘導培地や足場を使用せずに硬組織形成を誘導できる可能性を示唆し、歯髄幹細胞を用いた骨再生の実現に有益な結果を得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to utilize the fact that human dental pulp stem cells (hDPSCs) can be committed to hard tissue-forming cells in the absence of differentiation media, and to investigate whether osteogenic differentiation can be observed without differentiation media and scaffold by performing scaffold free three-dimensional spheroid culture.

And we can also investigate the cell source of stem cells. we can get stem cells not only from pulps but also from periodontal ligament and gingiva.

3D spheroid culture was performed with hDPSCs and bone induction was observed in vivo mouse skull implantation experiment.

研究分野：歯髄生物学

キーワード：歯髄幹細胞 高密度培養 スフェロイド培養

1. 研究開始当初の背景

歯科において、失われた骨組織を再生する治療法の確立が期待されている。欠損部に口腔組織から採取された間葉系幹細胞を移植し、硬組織を誘導する試みがなされているが、この際に化学物質を使用して分化誘導を行い、人工の足場材料を用いて移植を行うことが一般的となっている。しかし、化学物質や足場はアレルギーや炎症反応の原因となる可能性も報告されており、本研究課題はそのような背景を元に、分化培地と足場材料を使用せずに幹細胞を高密度で培養して三次元細胞塊とした間葉系幹細胞を移植するだけで効率的な硬組織形成が可能であるのかを検証するものである。また、抜去歯から得られる歯髄組織以外の組織である歯根膜組織や歯肉組織から幹細胞を分離することができるか、どの組織が硬組織再生を行う上で最適な幹細胞のソースとなるかを検討することとした。

2. 研究の目的

歯内・歯周領域において、失われた骨組織を修復する治療方法の確立が期待されている。歯槽骨再生においては、欠損部に間葉系幹細胞を移植し、硬組織をより効率的に誘導する試みも開始されている。この際、BMPをはじめとする成長因子あるいはアスコルビン酸、グリセロリン酸、デキサメサゾンといった化学物質を用いて、幹細胞を硬組織形成細胞へ分化誘導した上で移植するのが一般的である。さらに細胞移植の担体として、ポリ乳酸やコラーゲンといったスキャフォールドを使用する。しかし、移植後のアレルギー反応を含む炎症反応が惹起される可能性を排除するためには、成長因子あるいは化学物質を使用せず、スキャフォールドフリーで幹細胞を移植することが望ましい。本研究課題は以上の背景を元に、分化培地とスキャフォールドを使用せずに間葉系幹細胞を移植するだけで効率的な硬組織形成が可能か、という学術的疑問を解明すべく企画されたものである。また、1本の抜去歯牙から得られる歯髄組織は少ない上、石灰化が高度に起こっている歯牙からは歯髄組織が上手く採取できないこともある。抜去歯に付着する歯根膜組織や歯肉組織にも着目し、それらの組織から幹細胞を分離することができるか、またそれぞれの組織由来の幹細胞の特性の違いを検討することで、硬組織再生を達成するために最適な組織の検討と歯髄幹細胞の代替となるかどうか比較検討を行う必要があると考えた。

3. 研究の方法

抜去されたヒト健全智歯より得られる歯髄、歯根膜、付着している歯肉を用いた。組織をリベラーゼにより処理し、分解されなかった細胞塊をセルストレーナにて除去後、100mm ディッシュに播種した。細胞は抗生物質、抗真菌薬および10%FBS添加MEMを用いて5%二酸化炭素、湿度100%の環境下で3日おきに培地を交換しながら10-14日培養し、形成されたコロニーを幹細胞として回収した。幹細胞は、細胞密度50%以下で培養し、4-6回継代したものを実験に使用した。幹細胞を高密度(100000 cells/平方cm)で播種し4日間培養する。その後、分離した幹細胞(100000 cells)を低接着96-well ディッシュに播種し2日培養することで、細胞同士が接着する三次元培養を行い、スフェロイドを作成した。細胞増殖能をMTTアッセイにて計測した。使用する歯髄幹細胞は、間葉系幹細胞マーカー(CD44、CD73、CD90、CD105、CD146)発現をフローサイトメトリーにて確認した。作成したスフェロイドにおいて、アルカリフォスファターゼ(ALP)等の硬組織マーカーのmRNA発現を検討した。コントロールとして低密度(5000 cells/平方cm)で維持した群を使用した。ICRマウス頭蓋骨に形成した実験的骨窩洞(直径3mm)に作成したスフェロイドを移植し、経時的に骨形成をマイクロCTにて観察した。細胞を移植しない群を作成した。

4. 研究成果

歯髄組織(Pulp)だけでなく、歯根膜組織(PDL)歯肉組織(G)から幹細胞を分離することに成功した。この内、幹細胞性マーカーが高く維持されるのは歯髄由来の幹細胞であった。また、24,48,72時間後の細胞数を計測し、細胞増殖能について調査したが、も歯髄由来幹細胞が最も増殖能が高いことが分かった。(図1)今回は高密度で培養を行うことの有用性を主として検討するため、使用する幹細胞は増殖能の高い歯髄由来のもので限定し、歯髄幹細胞のみを用いて実験を行うこととした。

低密度、高密度で培養した後にスフェロイド培養した歯髄幹細胞(それぞれ低密度:SS群、高密度:DS群とする)をマウス頭蓋骨の実験的骨窩洞に移植した。SS群およびDS群どちらの群においても骨窩洞に新生骨の増殖が見られたが、両群の新生硬組

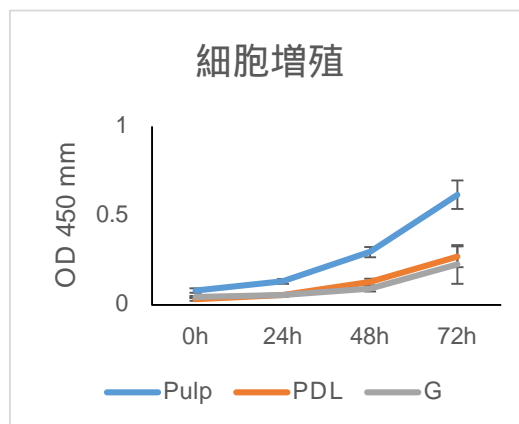


図1 採取組織別の幹細胞増殖

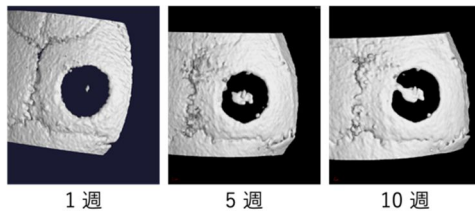


図2 マウス頭蓋骨窩洞へのスフェロイド移植後のマイクロCT画像

織量に有意な差は見られなかった。マイクロCTにて確認したマウス頭蓋骨窩洞と新生硬組織の図を示す。(図2)また、両群において幾つかのサンプルで硬組織のできない窩洞が存在した。これは、骨窩洞に対してスフェロイドが小さく、窩洞から動いてしまうという課題によるものと考えられた。スフェロイドの個数を増やすことで対応を検討したが、細胞数が著しく多くなるため現実的では無いと判断した。スフェロイドによる硬組織形成能を検討するためには今後、移植方法もしくは窩洞の大きさなどについて方法論の更なる検討が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------