

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23106

研究課題名(和文)血管網と神経網を有するハイブリッド型人工歯髄のin vitro創製

研究課題名(英文) Fabrication of DPSC constructs with vascular and neural network for Efficient Pulp Regeneration

研究代表者

堅田 千裕 (Katata, Chihiro)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20876677

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)：本研究では、歯髄幹細胞(DPSC)のみからなる集合体を無髄歯根管内に移植することで歯髄再生を達成する、新たな歯髄再生技術の確立を目指した。本研究の結果、DPSC集合体を血管内皮細胞分化誘導培地で培養することで、集合体内に血管様構造が形成されることが分かった。さらに、血管構造をもったDPSC集合体は高い歯髄再生能を有することが示された。また、神経細胞分化誘導培地で培養した集合体内部には、組織学的・電気生理学的検討から、イオンチャンネルをもった神経細胞が形成されていることが分かった。これらの結果から、作製したDPSC集合体は、機能的な歯髄再生を可能にする新規生体材料として応用できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、スキャフォールドフリーで移植可能かつ機能的な歯髄様組織をin vitroで創製する技術の確立に成功した。本研究のように、細胞集合体内にin vitroで血管網や神経網を構築する手法に関して、類似する研究例は国内外をみても存在せず、本研究成果のもつ学術的意義は大きい。さらに、本研究で確立した三次元組織内に幹細胞由来の血管網および神経網を形成する技術は、脊髄や四肢の外傷性損傷の治療に用いる生体材料にも応用可能であり、本研究の成果は再生医療分野において重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp regenerative medicine is a promising approach to restore the vitality of pulpless teeth. The purpose of this study was to fabricate the vascularized and neuralized DPSC constructs which facilitate to deliver the blood flow into the construct and achieve efficient pulp regeneration. This study revealed that vascularized DPSC constructs could be prepared by endothelial differentiation of constructs. In addition, vascularized DPSC constructs showed higher ability for pulp regeneration compared with undifferentiated constructs. Neuralized constructs were also fabricated by the neural differentiation of DPSC constructs. It was shown that this neuralized construct contained nerve cells which possessed voltage-dependent sodium and potassium channels. This study demonstrated that these functionalized DPSC constructs are prospective biomaterials for a novel dental pulp regeneration.

研究分野：組織再生

キーワード：歯髄 再生歯学 生体材料 歯髄幹細胞 血管 神経

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療を実現する有効な手段として、細胞、足場(スキャフォールド)、成長因子という三つの材料を適切に組み合わせ、生体内外で臓器や組織を人工的に構築する Tissue Engineering (組織工学)が注目されている。組織工学的手法を用いた歯髄再生医療は、従来の根管充填処置に取って代わる画期的な手法と考えられ、歯髄の再生により抜歯へ至る症例が減少することで健康寿命の延伸も期待される。近年、歯髄再生医療の実現に向けて組織工学的手法を応用した試みがなされているが、外因性物質であるスキャフォールドを用いることによって感染や炎症が引き起こされる可能性が指摘されている。また、歯髄の再生の場である根管内への血流供給は直径 1 mm 以下の根尖からのみであり、他の臓器と比較して著しく狭小なため、歯髄の再生は他の臓器や組織の再生と比べて容易ではない。さらに、天然の歯髄には血管とともに神経線維も豊富に存在しており、血管と神経の間に密接な相互作用が存在するという報告もあるなかで、血管網や神経網を有する歯髄様組織の *in vitro* 構築を目指した研究はこれまでにない。

申請者らのグループはこれまでに、温度応答性高分子ゲルモールドを用いて、歯髄幹細胞のみからなる集合体を *in vitro* で作製することに成功し、これを無髄歯の根管内に移植することで歯髄再生を達成する、新たな歯髄再生技術の確立を目指した研究を行ってきた(図 1)。そのなかで、ヒト歯髄幹細胞(DPSC)から作製した三次元細胞集合体(DPSC 集合体)が *in vitro* で自己組織化能を発揮できることを明らかにしてきた。一方、上述したように、血管網構造および神経網構造をもたない DPSC 集合体では、栄養・酸素の供給不足から無髄歯根管内のすべてを満たす歯髄再生は難しく、組織再生に期間を要することが課題となっていた。そこで、あらかじめ血管網構造および神経網構造をもつ歯髄幹細胞集合体を *in vitro* で構築して根管内に移植すれば、より確実な歯髄再生を効率的に実現できるのではないかと考え、本研究をスタートさせた。

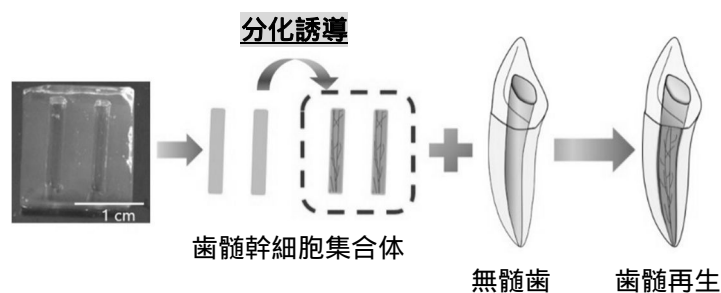


図 1. 新たな歯髄再生技術の概要

高分子ゲルモールドを用いて細胞集合体を作製し、分化誘導することにより血管網と神経網をもつ歯髄様組織を構築する。これを根管内に移植することで歯髄再生を達成できる。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、血管網および神経網をもつ人工歯髄様組織の *in vitro* 構築、および作製した人工組織の歯髄再生能の検証を目的とした。まず、DPSC 集合体に血管網を誘導することによる構造と遺伝子発現の変化を検討し、さらに歯髄再生能を評価した。次に、DPSC 集合体を神経分化誘導することで神経網構造をもつ歯髄様組織を *in vitro* で構築できるかを組織学的・生理学的検討を通じて評価した。

スキャフォールドフリーの歯髄様組織を *in vitro* で作製し、これを生体材料として無髄歯の根管内に移植するという再生医療技術は、我々のグループ独自の技術である。また、集合体を構成する細胞を分化誘導することで血管網と神経網を構築し、移植に適した高次の細胞集合体を作り出すことが可能となれば、血管や筋肉、脂肪など複合的な組織で構成される臓器の再生医療技術にも応用可能であると期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管網構造をもつ歯髄様組織の構築

ヒト第三大臼歯由来 DPSC を 100 mm 培養皿で培養し,100%コンフルエントを確認した後, さらに 5 日間培養を行った. セルスクレイパーを用いてシート状になった DPSC を回収し, 温度応答性高分子ゲルで作製したモールドに填入して 2 日間培養後, 周囲温度の低下によってモールドを拡張することで棒状の DPSC 集合体を得た. DPSC 集合体の血管内皮細胞分化誘導には, 内皮細胞用培地 (EGM-2 MV) に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, 50 ng/mL) を添加した培地を用いた. この分化誘導培地で細胞集合体を最長 20 日間まで培養し, 実体顕微鏡を用いて経時的な形態変化を観察した. さらに, 細胞集合体を構成する DPSC の生存率を評価することを目的として, Live/Dead 染色を行った. また, 同様に培養した試料からパラフィン包埋薄切切片を作製し, ハマトキシリン・エオジン染色, および血管内皮細胞分化マーカーである CD31 と Smooth Muscle Actin (SMA) の免疫蛍光染色を行った. 細胞集合体の外層, および内層を構成する DPSC の表現型を検討するために, 幹細胞マーカーである *Nanog*, 血管内皮細胞マーカーである *VEGFA* と *CXCL1* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で評価した. 次に, 血管内皮細胞分化誘導を施した DPSC 集合体の構造変化を検討するために, DPSC 集合体を FITC 蛍光ビーズを添加した分化誘導培地に浸漬し, 蛍光顕微鏡で観察した. さらに, 分化誘導を施した DPSC 集合体の歯髄再生能を評価することを目的として, 分化誘導培地あるいは通常培地で 10 日間培養した DPSC 集合体をヒト抜去歯根管内に填入し, その後, 免疫不全マウスの背部皮下に埋入した. 試料は移植 6 週間後に摘出し, 実体顕微鏡およびマイクロ CT を用いて観察を行った. さらに, 脱灰試料からパラフィン包埋薄切切片を作製し, HE 染色を行うことで移植根管内に形成された組織を観察した.

#### (2) 神経網構造をもつ歯髄様組織の構築

前述した方法で作製した DPSC 集合体を神経細胞分化誘導培地で最長 20 日間培養し, 内部構造の変化を実体顕微鏡を用いて経時的に観察した. 歯髄幹細胞の神経細胞分化誘導には, Neurobasal 培地 (Gibco) に B27, EGF (20 ng/mL), FGF-2 (40 ng/mL) を加えた培地を用いた. 分化誘導を施した細胞集合体から薄切切片を作製し, HE 染色および免疫蛍光染色による組織学的検討をおこなった. 免疫蛍光染色では, 神経細胞マーカー (Neurofilament, GFAP) の発現を評価した. さらに, DPSC 集合体内部に形成された神経網の電気生理学的検討を行うために, 最長 20 日間の神経細胞分化誘導を施した集合体のスライス標本を作製し, ホールセルパッチクランプ法によってナトリウムチャンネルによる活動電位, およびカリウムチャンネルの開口を確認した.

### 4. 研究成果

#### (1) 血管網構造をもつ歯髄様組織の構築

DPSC 集合体を血管内皮細胞分化誘導培地で培養すると, 培養 7 日目までは集合体の体積が減少するものの, それ以降は, 大きさが維持されることが分かった. また, HE 染色から, 集合体の最外層に細胞が密に存在していることが明らかとなった.

Live/Dead 染色の結果から, 20 日間の培養期間を通して, 分化誘導培地で培養した DPSC 集合体を構成する細胞が生存していることがわかった. また, 蛍光ビーズで内部構造を観察した結果, 分化誘導培地で培養した DPSC 集合体において, 培養 10 日目に

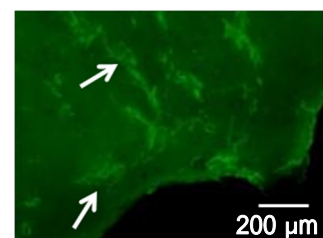


図 2. 血管構造をもつ歯髄様組織 DPSC 集合体内部に血管構造(矢印)が形成された.

集合体外層に蛍光ビーズの集積を認め、さらに、培養 20 日後の試料では明瞭な管腔様構造が形成されている様子が観察できた (図 2)。

免疫蛍光染色の結果、ゲルモールドから取り出した直後 (培養 0 日目) では、CD31 と SMA は発現していなかったが、培養 10 日目以降では、CD31 と SMA がともに集合体外層の細胞に強く発現していた。また、免疫蛍光染色の拡大像では、血管内皮細胞マーカーを発現している細胞が、集合体外層で管腔様構造を形成している様子が観察された。一方、リアルタイム PCR の結果、培養 10 日目までの集合体において、集合体内層の細胞は外層の細胞と比較して *Nanog* を有意に高く発現していたが、培養 20 日目では、集合体内層と外層の細胞で *Nanog* の発現量に有意差は認められなかった。一方、*VEGFA* および *CXCL1* の mRNA 発現量については、20 日間の培養期間を通して、集合体外層の細胞が内層の細胞に比べて有意に高い値を示した。以上の結果から、細胞集合体の外層を構成する DPSC が血管内皮細胞へ分化することで、集合体内に管腔様構造を形成したものと考えられた。

血管内皮細胞分化誘導を施した DPSC 集合体の歯髄再生能を評価したところ、分化誘導を施した DPSC 集合体を移植した試料の根尖部に血液成分を多く含む組織が存在することが分かった。さらに、マイクロ CT 観察および HE 染色の結果から、分化誘導後の DPSC 集合体を移植した試料内部では、分化誘導を施していない集合体を移植した場合と比較してより多くの歯髄様組織が形成されていることが分かった (図 3)。以上の結果から、集合体を構成する歯髄幹細胞を血管内皮細胞へ分化誘導することにより、集合体内に血管網構造を *in vitro* で形成できること、さらに、DPSC 集合体に血管網を形成することによって歯髄再生能が向上することが明らかとなった。

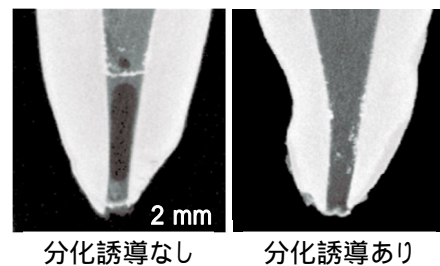


図 3. 血管構造をもつ DPSC 集合体の歯髄再生能 分化誘導を施していない DPSC 集合体を移植した試料(左)に比べて、分化誘導した集合体を移植した試料(右)では多くの歯髄様組織が形成された。

## (2) 神経網構造をもつ歯髄様組織の構築

DPSC を神経細胞分化誘導培地を用いて培養した際の動態変化をマトリゲル上で観察したところ、球状の細胞凝集塊、すなわちニューロスフィアが形成されることが分かった。次に、DPSC 集合体を作製し、神経分化誘導下での形態変化を実体顕微鏡で観察したところ、長期培養によって細胞集合体の体積が減少することが分かった。一方、Live/Dead 染色の結果では、細胞集合体を構成する細胞は神経細胞分化誘導培地で長期培養した後も生存していることが明らかとなった。そこで、分化誘導を施した細胞集合体から薄切切片を作製し、ニッスル染色を行ったところ、培養期間が長くなるにつれてニッスル染色陽性の細胞が増加する様子が観察された。さらに、免疫蛍光染色の結果、細胞集合体内に神経細胞分化マーカー (Neurofilament, GFAP) 陽性の細胞も観察され、これら分化マーカー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、神経細胞分化誘導を 20 日間施した DPSC 集合体について、ホールセルパッチクランプ法で電気生理学的検討を行ったところ、集合体内にナトリウムチャンネルとカリウムチャンネルをもった神経様細胞が形成されていることが分かった。

本研究の結果、DPSC 集合体の血管内皮細胞分化あるいは神経細胞分化誘導によって、集合体内に血管網あるいは神経網を形成できることが明らかとなった。このことは、機能化した歯髄様組織が *in vitro* で構築できることを示しており、本研究で作製した高次機能型歯髄様組織が歯髄再生医療に応用できる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 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katata C, Sasaki JI, Li A, Abe GL, Nor JE, Hayashi M, Imazato S.	4. 巻 100
2. 論文標題 Fabrication of Vascularized DPSC Constructs for Efficient Pulp Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1351 ~ 1358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345211007427	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

〔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
---------	---------