

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21025

研究課題名（和文）歯の細胞バンクの臨床応用へ向けた基礎データ収集とメッセージの発信

研究課題名（英文）Collection of Basic Data and Dissemination of Messages for Clinical Applications of Dental Stem Cell Banks

研究代表者

島村 直宏（Shimamura, Naohiro）

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：40908125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、乾燥環境と紫外線の影響に対する食用ツバメの巣の細胞保護効果と、環境に優しい細胞培養インサートの開発について示される。結果的には、EBNDの抗酸化能力が、乾燥環境と紫外線による有害な影響や炎症反応を部分的に減少させる可能性があることが示された。また、自作インサートが共培養された細胞間のクロストークに強い影響を与えることが明らかになった。これらの研究結果は、神経細胞を保護する可能性があることや、三次元神経細胞の培養においても考慮すべき点があることを示唆している。今後は神経損傷に対する治療に向けた研究や、臨床応用に向けた三次元神経細胞培養の開発に期待が寄せられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、実現可能な再生医療として、DPSCsから三次元神経細胞への分化を誘導し、神経損傷に対する原因療法の確立へ向けた基礎データの収集を行い、再生医療の基盤を作るものである。また、本研究は若年期に保存した自分の歯の細胞を、未来の疾患罹患時に再利用するコンセプト“細胞バンク・テラーメイド再生医療”の1モデルとなる可能性がある。本研究成果を発信することは、歯髄の特性や有用性を社会へ向けたメッセージとして発信でき、再生医療の新たな選択肢として歯髄細胞を臨床応用していく道筋ともなる。

研究成果の概要（英文）：Enzyme-digested edible bird's nest (EBND) was found to have a cell-protective effect against oxidative stress, cell death, DNA double-strand breaks, and inflammation reactions caused by a combination of dry environment and UV exposure. EBND partially reduced inflammatory reactions in human HaCaT keratinocyte three-dimensional epithelial cultures, suggesting its potential to protect nerve cells and contribute to future treatments for nerve damage. The experiments also developed an environmentally friendly cell culture insert that provides an in vivo-like microenvironment facilitating cell-cell interactions and cytokine diffusion, which can reduce plastic waste at a low cost. These results are promising for three-dimensional nerve cell culture for clinical applications.

研究分野：細胞培養

キーワード：神経再生 紫外線 乾燥 ツバメの巣 Insert 環境保護 三次元上皮培養 三次元神経細胞培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯髄由来の間葉系幹細胞(Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells; DPSCs)は、再生医療において、有能で安全な細胞資源として注目を集めている。DPSCs は、智歯抜歯、矯正治療での便宜抜歯、乳歯抜歯など、必要な歯科治療に付随して採取が可能である。申請者の所属する日本歯科大学では、2015年より歯の細胞バンク事業の運用が開始している。また、DPSCsの神経細胞への分化も報告している。

他方、歯科口腔外科の臨床において、智歯抜歯は多くの割合を占めている。特に下顎埋伏智歯では、下歯槽神経と近接していることが多く、抜歯の合併症として神経損傷を避けることはできない。下歯槽神経損傷に対する治療方法は、ビタミン B12 製剤の投与や、星状神経節ブロックなどが従来より行われてきたが、それらは自己修復の補助療法であり、治療期間は1年以上に及ぶことが多く、回復の程度は個人差が大きい。

そこで本研究の目的は、DPSCs から神経細胞への分化を誘導し、より短期間で、より効果的な神経損傷の再生医療を確立することである。また、本研究の学問的意義は、歯科と医科の枠を超える新規性にあり、DPSCs を利用したテーラーメイド再生医療の実用化へ向けた基礎データの収集である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、実現可能な再生医療として、DPSCs から神経細胞への分化を誘導し、神経損傷に対する臨床応用へ向けた基礎データの収集である。

これまでの組織幹細胞の研究は骨髄、脂肪、臍帯由来によるものが多く、それらは組織採取のために侵襲を加えるなど倫理的ハードルも高い。他方、歯髄由来の報告は極めて少ない、また DPSCs は必要な歯科治療に付随して採取可能であり、組織再利用のコンセプトの元、遥かに利便性の高い細胞資源であるところに学術的独自性がある。

3. 研究の方法

(1) 本研究の方法は、酵素消化されたツバメの巣 (EBND) が、乾燥した環境と UV の組み合わせによる細胞内酸化ストレス、細胞死、DNA 二本鎖切断、炎症反応に対する抑制効果を、人間の HaCaT 角化細胞を用いた三次元培養(3D)上皮相当物質で検証することである。

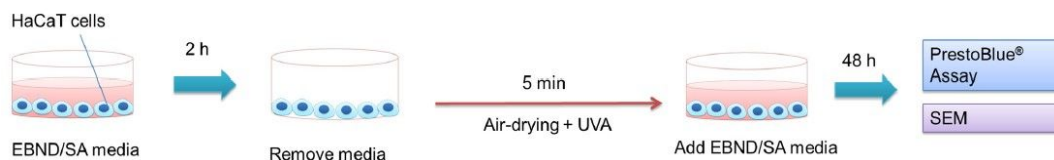


図1 : HaCaT 細胞における EBND および SA の空気乾燥および UVA 誘発細胞膜損傷および細胞死への影響に関する比較実験の手順を示す。

HaCaT 細胞 (2×10^4 細胞/ウェル) を細胞皿にまき、SA および EBND で処理した。最後に細胞表面の微細構造を SEM で観察した。細胞の生存率は PrestoBlue アッセイで測定した。

(2) 同時並行で行われた研究の方法は、共培養細胞間の細胞間相互作用を調べるため、さらに環境に優れたセルカルチャーインサートの開発と、THP-1 マクロファージと OP9 脂肪細胞の共培養における相互作用を検証することである。

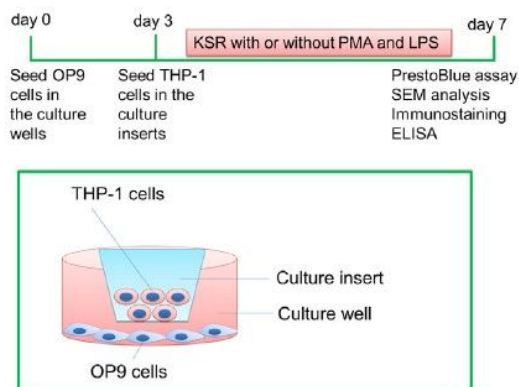


図2 : THP-1 細胞と OP9 細胞との共培養における PMA および LPS の THP-1 細胞からマクロファージ分化への影響に関する 3 種類の培養インサートの比較実験の手順を示す。

OP9 細胞 (3×10^4 個) を細胞プレートにまき、100% まで成長させる。次に、KSR 培地 (PMA 10 ng/mL および/または LPS 250 ng/mL がある場合とない場合の両方) へ交換する。THP-1 細胞 (5×10^4 個) をまき、CoI、XL、PET インサートに OP9 細胞と共に入れる。

4. 研究成果

(1) 実験の結果、直接的に神経再生を確立するものは得られなかった。しかしながら、酸素ラジカル抗酸化能試験により、EBND は優れたペルオキシラジカルの捕捉活性を示し、HaCaT 細胞の細胞抗酸化能を有意に増加させた。EBND が HaCaT 細胞および 3D 上皮相当物質に投与された場合、空気乾燥と UVA (Dry-UVA) 誘発の細胞死とアポトーシスを有意に予防した。Dry-UVA は、CellROX® Green/Orange 再発物により定量化された HaCaT 細胞および 3D 上皮相当物質内の反応性酸素種 (ROS) の発生を著しく誘発した。しかし、EBND を HaCaT 細胞および 3D 上皮相当物質に処理すると、Dry-UVA 誘発の細胞内 ROS が有意に減少した。抗-H2A.X 抗体に基づく免疫染色の結果、EBND は HaCaT 角化細胞の Dry-UVA 誘発の DSBs を有意に抑制した。シアル酸と比較して、EBND は Dry-UVA 誘発の傷害に対して、角化細胞および 3D 上皮相当物質の両方を有意に保護した。ELISA により、EBND は UVB 誘発の IL-6 および TNF- α 分泌を有意に抑制した。結論として、EBND は、その抗酸化能によって、ヒトの角化細胞および 3D 上皮相当物質での乾燥した環境と UV 誘起の有害な影響と炎症反応を部分的に減少させることができることが示された。これらの結果は神経細胞をも保護する可能性があり、今後の神経損傷に対する治療へも期待ができる。

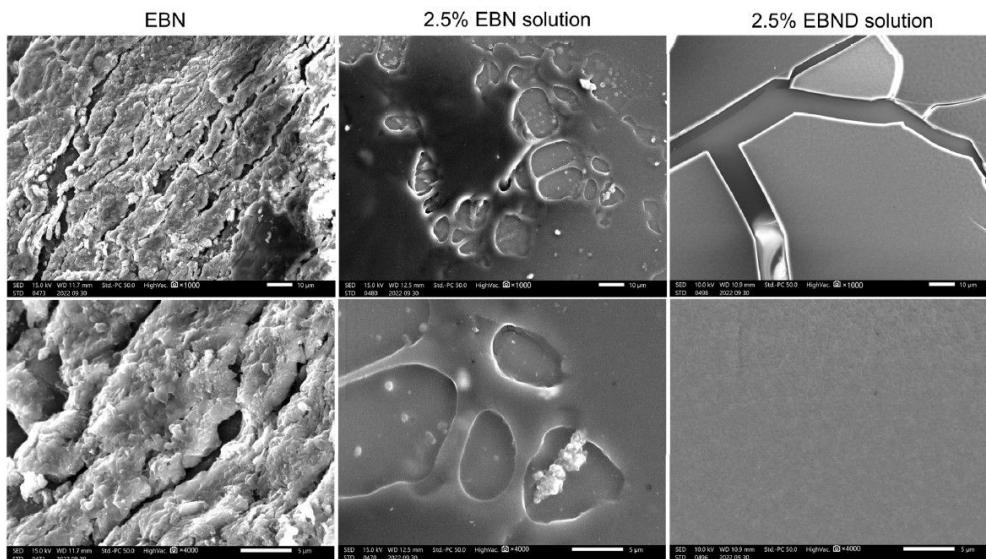


図 3 : EBND と 2.5%EBND 溶液と 2.5%EBND 溶液の細胞表面の微細構造の SEM 画像を示す。上部および下部パネルのスケールバーは、それぞれ 10 μ m および 5 μ m を示す。

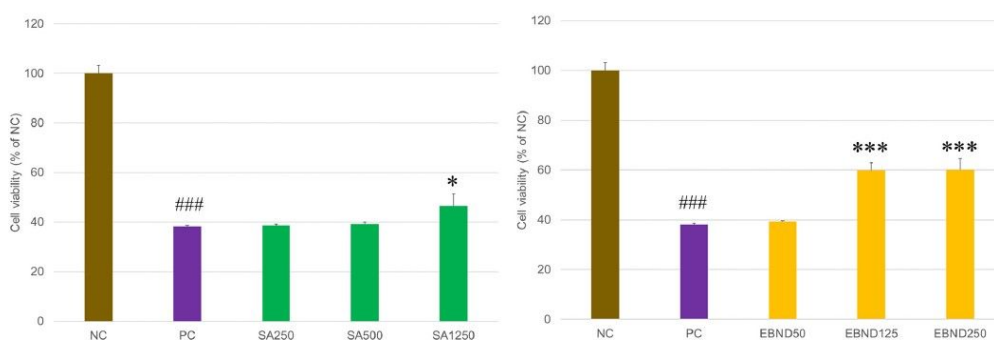


図 4 : HaCaT 細胞の細胞生存率を示す。

陰性対照 (NC) 細胞は空気乾燥および UVA 照射なし。

陽性対照 (PC) 細胞は EBND または SA 処理なしに空気乾燥および UVA 照射あり。

SA250 ; 250 μ g/mL の SA が含まれる培地。SA500 ; 500 μ g/mL の SA が含まれる培地。

SA1250 ; 1250 μ g/mL の SA が含まれる培地。

EBND50 ; 50 μ g/mL の EBND が含まれる培地。EBND125 ; 125 μ g/mL の EBND が含まれる培地。

EBND250 ; 250 μ g/mL の EBND が含まれる培地。

(2) 低コストでプラスチック廃棄物を削減できる、環境に優しい細胞培養インサート(XL-insert)の開発に成功した。それを一般的に使用されている二種類の市販のインサート(Col-insertsとPET-inserts)と比較した。その結果、XL-insertsは細胞間相互作用に適した環境を提供し、PET-insertsは一部の細胞の塊によって孔が塞がれるため、細胞間のコミュニケーションに制限があることがわかった。Col-insertsは、大きなサイズのサイトカインをブロックする一方で、小さい分子の透過を許容し、脂質蓄積やアディポネクチンの分泌を改善することができることがわかった。この研究は、セルカルチャーインサートの種類が細胞間相互作用に大きな影響を与えることを示した。これらの結果は三次元神経細胞の培養でも十分考慮するべきであり、今後の臨床応用へ向けた三次元神経細胞培養の成功へも期待ができる。

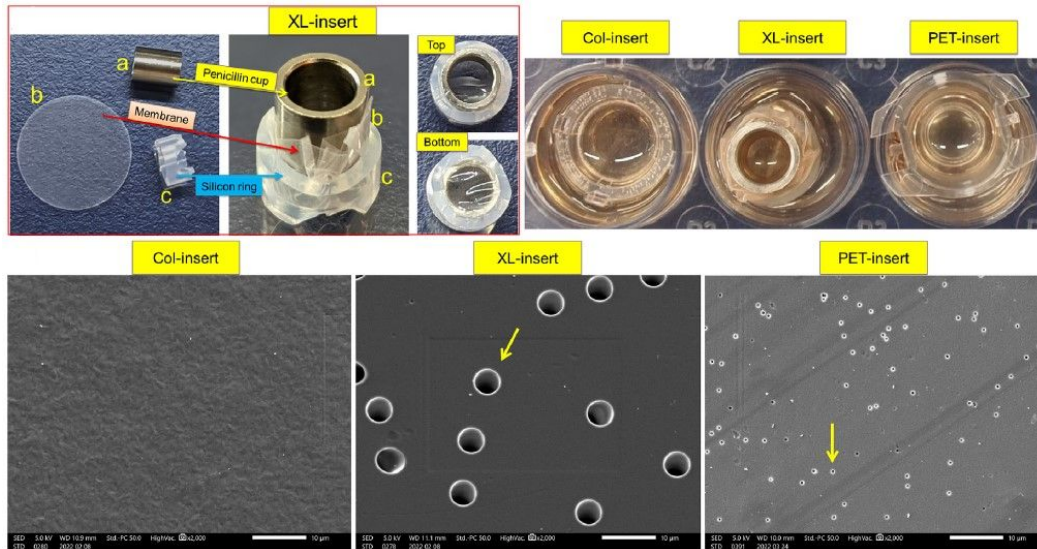


図5:新しい環境に優しい細胞培養インサート(XL-insert)の部品と構造と市販インサート(Col-insertsとPET-inserts)との比較を示す。

XL-insertは3つの部品から成り立っている:aはペニシリンカップであり、インサートの壁となる。bは細胞がその上で成長するための親水性のメンブレン膜である。cはメンブレン膜をペニシリンカップに保持する弾性シリコンリングである。

Col-, XL-, PET-インサートの膜表面のSEM画像で、黄色の矢印はXL-insertとPET-insertの膜表面の穴を示している。スケールバーは10ミクロンを示している。

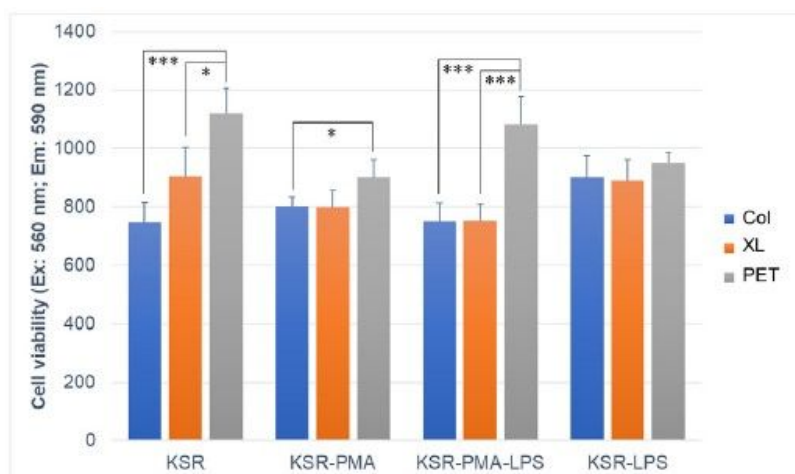


図6:異なる培養条件下で共培養4日後のTHP-1細胞の細胞生存率をPrestoBlueアッセイで測定した比較を示す。

KSR; PMAまたはLPSがない培地。KSR-PMA; 10 ng/mLのPMAが含まれる培地。

KSR-PMA-LPS; 10 ng/mLのPMAおよび250 ng/mLのLPSが含まれる培地。

KSR-LPS; 250 ng/mLのLPSが含まれる培地。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

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 Equivalentents	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, 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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 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		
中国	Beijing Xiaoxiandun Biotechnology		