

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17075

研究課題名（和文）歯髄幹細胞を基材とした人工神経様組織のin vitro創製

研究課題名（英文）In vitro fabrication of nerve-like tissue using dental pulp stem cells

研究代表者

堅田 千裕（Katata, Chihiro）

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：20876677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、我々がこれまでに確立した細胞集合体システムを活用して、神経細胞への分化能をもつ歯髄幹細胞から神経様組織をin vitroで構築することを目指した。本研究の結果、歯髄幹細胞のみから成るスキャフォールドフリー集合体を神経細胞分化誘導培地で培養すると、集合体内に神経関連タンパク質が産生されることが分かった。さらに、組織学的・電気生理学的検討から、神経細胞分化誘導培地で培養した集合体内部にはイオンチャンネルを有した神経細胞が形成されていることが明らかとなった。これらの結果から、神経分化誘導を施した歯髄幹細胞集合体は、神経損傷を回復させる新規神経再生用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

本研究において、スキャフォールドフリーで機能的な神経様組織をin vitroで創製する技術の確立に成功した。本研究のように、移植可能なサイズの神経様組織をin vitroで作製する手法に関して、類似する研究例は国内外をみても存在せず、本研究結果のもつ学術的意義は大きい。本研究で確立した幹細胞を基材として神経様組織を形成する技術は、脊髄や四肢の外傷性損傷の治療に用いる生体材料に応用可能であり、本研究の成果は神経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）：The purpose of this study was to fabricate the nerve-like tissue from scaffold-free three-dimensional (3D) constructs composed only of dental pulp stem cells (DPSCs). It was revealed that the expression of neuronal differentiation markers increased in DPSCs constituting 3D cell construct by culturing with neuronal differentiation medium. In addition, nerve-related proteins were produced in 3D cell constructs by neuronal differentiation. Histological and electrophysiological analyses demonstrated that differentiated DPSCs in the 3D cell construct expressed voltage-dependent ion channels. The results obtained in this study indicated that neuronal differentiated-DPSCs construct could be used as a novel biomaterial for nerve regeneration.

研究分野：歯学

キーワード：再生歯学 組織工学 細胞集合体 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域における外傷や腫瘍切除の際には、しばしば末梢神経の損傷を伴うことがあり、重大な偶発症として知られている。特に舌神経の損傷は疼痛・異常感覚のほかに触覚のみならず味覚の鈍麻や喪失を招き、損傷後に著しいQOLの低下を来す。縫合が不可能なほど大きな神経損傷の場合には、現在では、神経移植が第一選択となるが、自家神経移植には採取部位における神経機能の脱落や供給量の制限、追加の外科的切開が必要となるといった欠点が挙げられる。一方、他家神経移植においては、周術期の免疫抑制や採取神経の適切な保存が必要となる。また、第三の選択肢として報告されている人工神経導管は、臨床の場で実際に使用されているものの、生体適合性の低さや感染のリスク、再生可能な長さの限界が指摘されている。

近年、再生医療を実現する手段として、細胞、スキャフォールド、成長因子という三つの素材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。生体外で神経組織を作製することができれば、神経損傷を効率的に再生する生体材料として応用できると考えられるが、幹細胞から移植可能なサイズの人工神経組織を *in vitro* で創製したという報告はこれまでにない。そこで本研究では、再生医療分野において細胞ソースとして注目されている歯髄幹細胞に着目した。歯髄より採取できる歯髄幹細胞は、高い増殖能を示すだけでなく、神経堤を由来とするため外胚葉性間葉の表現型を有しており、骨芽細胞などの間葉系細胞のみならず、神経細胞にも分化できることが報告されている。

これまで我々は、歯髄幹細胞のみから成るセンチメートルオーダーの細胞集合体を *in vitro* で作製し、これが人工歯髄様組織として機能すること、すなわち、無髄歯根管内で歯髄を再生することを報告してきた (Katata C, *et al.*, *J Dent Res* 2020)。さらに、細胞集合体を糸状に成形する技術の確立にも成功している (Sasaki JI, Katata C, *et al.*, *J Biomed Mater Res A* 2019)。これらを背景として、我々の研究グループがこれまで培ってきた前述の技術に、歯髄幹細胞の神経分化能に関する知見を組み入れることで、細胞のみを基材とした人工神経組織を創製できるのではないかと、すなわち、糸状に成形した歯髄幹細胞集合体に神経分化誘導を施すことで神経様組織の *in vitro* 創製が可能ではないかと着想した (図1)。



図1. 本研究の概要
歯髄幹細胞から成るスフェロイドから糸状の細胞集合体を作製し、これを分化誘導することで神経様組織の構築を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、歯髄幹細胞を用いた神経様組織を *in vitro* で構築し、その神経再生用材料としての有用性を評価することを目的とした。本研究は、スキャフォールドを使用せず、細胞と細胞外基質のみによって神経様組織を *in vitro* で作製するというアプローチであり、既存の高分子材料よりも生体親和性が高いと考えられる細胞のみを使用して、さらに細胞集合体がつもつ自己組織化能を活用することで神経様組織の *in vitro* 創製を目指した。

3. 研究の方法

(1) 歯髄幹細胞集合体の作製と神経分化誘導

ヒト第三大臼歯由来歯髄幹細胞を 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細胞を回収し、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細胞集合体を得た。さらに、作製した棒状集合体を 25G の注射針で成形することで、糸状の細胞集合体を作製した。細胞集合体の神経分化誘導には、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。この分化誘導培地を用いて細胞集合体を最長 20 日間培養し、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歯髄幹細胞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。

(2) 神経分化誘導が歯髄幹細胞集合体に与える影響

神経分化誘導が細胞集合体を構成する歯髄幹細胞に与える影響を評価するために、Real-time PCR 法で神経細胞マーカーの発現量を検討した。具体的には、歯髄幹細胞集合体を神経分化誘導培地で最長 20 日間培養し、*Nestin* および $\beta 3$ -*tubulin* の発現量を *GAPDH* 発現量で補正することで評価した。また、同様に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、ニッスル染色、および免疫蛍光染色による組織学的検討を行った。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、歯髄幹細胞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ネルによる活動電位、およびカリウムチャネルの開口を確認した。

4. 研究成果

(1) 歯髄幹細胞集合体の神経分化誘導

歯髄幹細胞集合体の神経分化誘導培養による形態変化を評価したところ、培養 5 日間で長軸方向の長さが約 75%に減少することが分かった。その後、細胞集合体の大きさは経時的に減少し、培養 20 日目で長さは約 50%となったが、細胞集合体の形状は維持していた。また、Live/Dead 染色の結果、培養期間が延長するとともに死細胞の数が増加するものの、細胞集合体を構成する大部分の細胞が生存していることが分かった。これらの結果から、歯髄幹細胞から成る細胞集合体は、本研究で用いた分化誘導培地で細胞の活性を維持したままの状態での長期培養が可能であることが明らかとなった。

(2) 神経分化誘導が歯髄幹細胞集合体に与える影響

組織学的検討の結果、培養 5 日目の集合体は疎な構造をしているが、分化誘導期間が延長するにつれて内部構造は徐々に密となり、培養 20 日目は均一な内部構造を呈することが明らかとなった。また、免疫蛍光染色とニッスル染色の結果から、分化誘導の期間が長くなるにつれて、細胞集合体内に神経関連タンパク質やクレシルバイオレット陽性の細胞が経時的に増加することが明らかとなった。さらに、電気生理学的検討の結果、細胞集合体内にナトリウムチャネルとカリウムチャネルを有し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、歯髄幹細胞から成る細胞集合体に神経分化誘導を施すことで、神経組織様の構造体を作製できることが明らかとなった。このことは、細胞のみを基材とした人工神経を *in vitro* で創製できることを示しており、本研究で作製した神経様構造体が神経損傷を回復させる新規神経再生用材料として応用できる可能性が示された。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Li A, Sasaki JI, Abe GL, Katata C, Sakai H, Imazato S	4. 巻 2023
2. 論文標題 Vascularization of a bone organoid using dental pulp stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 5367887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2023/5367887	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 -

〔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
---------	---------