

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17096

研究課題名（和文）多能性を維持したVitrification歯根膜幹細胞スフェロイド確立の試み

研究課題名（英文）Trial to establish the vitrification of periodontal ligament stem cell spheroids that maintain stemness

研究代表者

佐野 孝太郎（Sano, Kotaro）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10852486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：ガラス化法(Vitrification)および緩慢凍結法(Slow freezing)により凍結した歯根膜幹細胞スフェロイドの形態は、凍結後7日・30日・90日のいずれにおいても凍結前の球状を維持していたが、凍結保存期間が長くなるほど、またガラス化法よりも緩慢凍結法の場合ではアポトーシス細胞の割合が増加していた。

ガラス化法凍結によるスフェロイドでは、緩慢凍結法によるものと比べて生存率が向上していた。多能性マーカー遺伝子、骨分化/脂肪分化/軟骨分化の指標となる遺伝子の発現の変化は、凍結前と比べて有意なものではなかった。ただし、緩慢凍結法で凍結した場合はガラス化法と比べて発現が減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜幹細胞を3次元的に培養した歯根膜幹細胞スフェロイドは、歯周組織再生に有効であることが報告されている。しかし、スフェロイドを獲得するまでには時間と工程を要する。本研究結果より、ガラス化法により歯根膜幹細胞スフェロイドの性質を維持した長期保存が実現できる可能性が示唆された。多分化能および組織再生能を維持したスフェロイドを長期凍結保存し、即時利用可能となる環境を整備できれば、再生医療の発展への寄与が期待される。

研究成果の概要（英文）：The morphology of periodontal ligament stem cell spheroids frozen by the vitrification or the slow freezing maintained the same spherical shape as 7, 30, and 90 days before freezing. However, the longer the frozen storage period, and the higher the ratio of apoptotic cells in the slow freezing compared to the vitrification.

The survival rate of spheroids frozen by the vitrification was improved compared to those frozen by the slow freezing. The changes in expression of stemness marker and marker of osteogenic/adipogenic/chondrogenic differentiation were not significant compared to before freezing, although the expression was down-regulated when frozen by the slow freezing compared to the vitrification.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 再生療法 スフェロイド 歯根膜幹細胞 Vitrification

1. 研究開始当初の背景

歯の支持組織である歯周組織を構成する歯根膜細胞には間葉系幹細胞が存在し、多分化能を有することが知られている (Seo et al., Lancet 2004)。歯周病により破壊された歯周組織を再生させる組織再生誘導法 (GTR 法) やエナメルマトリックスデリバティブを応用した術式は、歯根膜由来の未分化間葉系細胞に作用することで、失われた歯周組織を再生させる。このように、歯根膜は歯周組織の再生に重要であることが臨床的にも実証されている (Needleman et al., Cochrane Database Syst Rev. 2006)。スフェロイドとは細胞が多数凝集して 3 次元構造になったもので、スフェロイド培養された細胞は、*in vivo* の培養条件に近く、幹細胞性が向上することが報告されている (Page et al., Cell Tissue Res. 2013)。

我々は、スフェロイド作製用マイクロウェルチップを利用して歯根膜幹細胞スフェロイドの検証を行ってきた。このマイクロウェルチップは細胞が接着しないようにウェル内にポリエチレングリコール (PEG) を付着させることで、酵素処理することなくスフェロイドを回収することができ、細胞機能を保存することができる。歯根膜幹細胞スフェロイドは単層培養と比べて多能性マーカー遺伝子発現および骨形成能が有意に上昇していることが明らかとなった (Moritani et al., J Periodontal Res. 2018)。また、歯根膜幹細胞スフェロイドをラット歯周組織欠損モデルに移植すると、単層培養よりも新生骨および新生セメント質形成が亢進したことを見出した (Sano et al., Regen Ther. 2020)。このように、歯根膜幹細胞スフェロイドが歯周組織再生に有効である可能性が示されている。

これまでの研究より、歯根膜幹細胞スフェロイドは歯周組織再生に有用であることが示されているものの、スフェロイドを作製するにあたり、細胞の播種・培養には時間がかかるため、必要な時にすぐに用いることはできない。近年、その解決策としてスフェロイドの凍結保存について研究されてきており、凍結保存したヒト皮膚線維芽細胞スフェロイドを解凍しても、細胞が破壊されることなく生存することが報告されている (Arai et al., PLoS One 2020)。また、細胞の結晶化を防ぐガラス化法 (Vitrification) により保存したヒト脂肪由来間葉系幹細胞スフェロイドは、従来の緩慢凍結法 (Slow freezing) で保存したものよりも生存率が向上したことも確認されている (Jeong et al., BMC Biotechnol. 2020)。そこで、歯根膜幹細胞スフェロイドを幹細胞性や多分化能を維持した状態で凍結できれば、作製にかかる工程を省略することができ、組織再生を目的に将来使用された場合にも有用であるという仮説を立てた。本研究はそれを検証するものであり、歯周組織再生療法に新しい知見を付加するものである。

2. 研究の目的

本研究では、作製した歯根膜幹細胞スフェロイドの冷凍保存条件 (細胞数・凍結方法・凍結期間) を検証する。また、凍結保存後、解凍した歯根膜幹細胞スフェロイドの形態的・機能的 (生存率・幹細胞性・多分化能) 解析を行う。さらに、ラット歯周組織欠損モデルに移植し歯周組織再生能の検討を行う。

間葉系幹細胞スフェロイドの凍結保存についての報告は見受けられるものの、歯根膜幹細胞をもとに作製したスフェロイドが凍結保存を経て幹細胞性および多分化能を維持するか、さらに歯周組織再生能を有するかについて検討した研究はなく、今までに報告のない新規の試みであり独創的だと考えられる。また、幹細胞スフェロイドの凍結保存は、作製工程の短縮につながるため、細胞治療・再生医療の発展の点で意義深い研究だと考えられる。

3. 研究の方法

歯根膜幹細胞スフェロイドの凍結保存条件の検討および多分化能の検証

() 歯根膜幹細胞の採取および歯根膜幹細胞スフェロイドの作製

予防的な智歯抜歯や歯列矯正のための便宜抜歯などの理由で、健全な歯を抜歯した患者の抜去歯牙から酵素法で歯根膜幹細胞を単離する。その後、スフェロイド作製用マイクロウェルチップを用いて、歯根膜幹細胞から歯根膜幹細胞スフェロイドを作製する。

() 歯根膜幹細胞スフェロイドの冷凍保存条件の検証

・凍結時の細胞数

ヒト歯髄幹細胞を $0.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ で凍結しても、細胞数により生存率に有意な影響がないことが示されている (Woods et al., Cryobiology 2009)。しかし、間葉系幹細胞スフェロイドでは検討されていないため、凍結時の細胞数を 1.0×10^5 、 4.0×10^5 、 1.0×10^6 として凍結する。

・凍結方法

細胞の凍結方法にはガラス化法と緩慢凍結法があり、ガラス化凍結法により保存したヒト脂肪由来間葉系幹細胞スフェロイドは、従来の緩慢凍結法で保存したものよりも生存率が向上したことが報告されている (Jeong et al., BMC Biotechnol. 2020)。

しかし、歯根膜幹細胞スフェロイドでは不明であるため、ガラス化凍結法および緩慢凍結法で歯根膜幹細胞スフェロイドを凍結する。

・凍結期間

これまでの研究では、スフェロイドを7日間および14日間凍結しても生存していたことが確認されている。本研究では、7日間（短期）30日間（中期）90日間（長期）凍結する。

（ ）冷凍保存後、解凍した歯根膜幹細胞スフェロイドの形態的・機能的解析

冷凍保存後、スフェロイドの3次元構造が失われていないか顕微鏡にて経時的に形態を観察する。また、歯根膜幹細胞スフェロイドのLIVE-DEAD染色にて生存率を測定する。

さらに、凍結前の歯根膜幹細胞スフェロイド（b-PDLsp）と凍結・解凍後の歯根膜幹細胞スフェロイド（a-PDLsp）の幹細胞マーカーの発現を、リアルタイムPCR法にて解析、比較する。a-PDLspおよびb-PDLspを骨分化条件（ascorbic acid、 α -glycerophosphate、dexamethasoneを含む培地）で14日間培養し、リアルタイムPCR法およびアリザリンレッド染色法で評価、比較する。

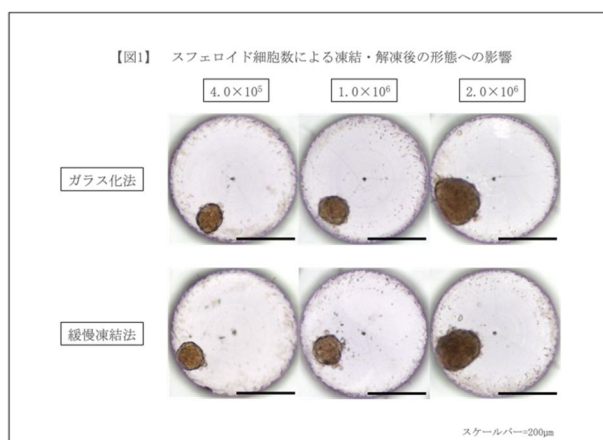
ラット歯周組織欠損モデルへの移植実験

ラット上顎第1大臼歯に歯科用バーを用いて歯周組織欠損を作製し、a-PDLspおよびb-PDLspを移植する。手術の4、8週間後に3次元マイクロCT撮影および、組織切片（HE染色・アザン染色）にて歯周組織再生能（新生歯槽骨、新生セメント質、新生歯根膜）について比較検討する。さらに、歯根膜幹細胞の免疫染色により、再生された組織の由来を同定する。

4．研究成果

・凍結時の細胞数による影響

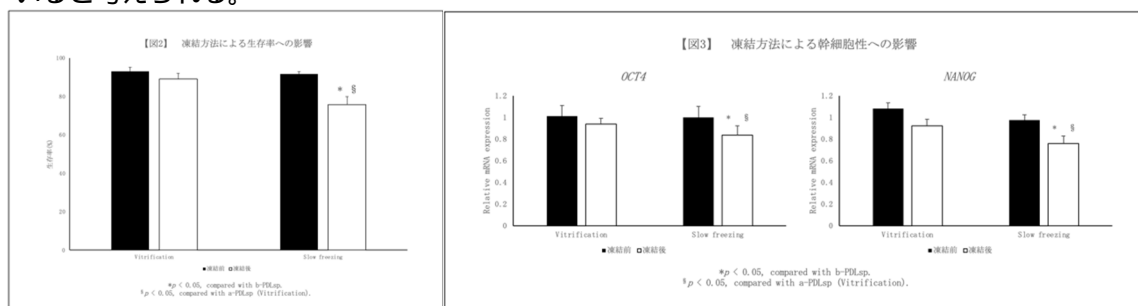
健康なヒトの智歯から歯根膜幹細胞を単離し、 4.0×10^5 、 1.0×10^6 、 2.0×10^6 （ 1.0×10^5 から変更）の3通りの細胞数でマイクロウェルチップに播種し、3日後に歯根膜幹細胞スフェロイドを回収、ガラス化法および緩慢凍結法により7日間凍結した。いずれの細胞数の場合でも、解凍後も凍結前の球状の形態を維持しており【図1】、同一凍結方法（ガラス化法または緩慢凍結法）、同一凍結期間（7日）で比較しても、スフェロイドを構成する細胞の生存や、幹細胞性および多分化能への有意な影響を確認できなかったため、以降の実験では冷凍保存条件として 2.0×10^6 の細胞数を採用することとした。



・凍結方法による影響

細胞数が 2.0×10^6 の歯根膜幹細胞スフェロイドをガラス化法または緩慢凍結法で7日間凍結し、スフェロイドを構成する細胞に対する影響を評価した。凍結方法による形態への影響は認めなかった。ガラス化法よりも緩慢凍結法の場合ではアポトーシス細胞の割合が増加することがTUNEL染色により明らかになり、LIVE-DEAD染色よりガラス化法凍結によるスフェロイドでは、緩慢凍結法によるスフェロイドと比べて生存率が向上していた【図2】。また、リアルタイムPCR法にて多能性マーカー遺伝子（*OCT4*、*NANOG*）、骨形成関連遺伝子（*ALP*、*RUNX2*）に加えて脂肪生成関連遺伝子（*LPL*、*FABP4*）、軟骨形成関連遺伝子（*SOX9*、*COL2A*）の発現を確認したところ、緩慢凍結法で凍結した場合はガラス化法と比べて発現が減少していた【図3】。

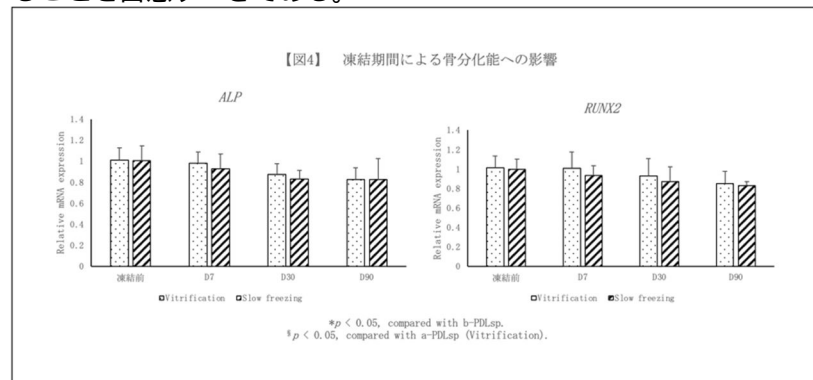
したがって、歯根膜幹細胞スフェロイドを凍結保存する方法としてはガラス化法が優れていると考えられる。



・凍結期間による影響

7日（短期）・30日（中期）・90日（長期）の凍結保存後、解凍し、凍結期間によりスフェロイドの内部細胞の生存および多分化能が影響を受けるか検討を行った。形態はいずれの時点においても凍結前の球状を維持していたが、凍結保存期間が長くなるほどアポトーシス細胞の割合が増加していた。さらに、多分化能および骨分化／脂肪分化／軟骨分化についても、上

記に示す指標となる遺伝子発現の変化は凍結前と比べて有意なものではなかった。【図4】
 まとめて、長期間の凍結保存は可能であるが、解凍後のスフェロイドには凍結期間の影響が生じていることを留意すべきである。



なお、本研究期間中には、スフェロイドをラット歯周組織欠損モデルに移植し、歯周組織再生について検討する *in vivo* 実験を実現することができなかった。

これらの結果より、ガラス化法により歯根膜幹細胞スフェロイドの性質を維持した長期保存が実現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
---------	---------