

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659846

研究課題名(和文)細胞集合体を用いた *in vitro* での歯髄様組織構築の試み

研究課題名(英文) Fabrication of dental pulp-like tissue using 3D cell construct

研究代表者

今里 聡 (Imazato, Satoshi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80243244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、歯髄再生医療に利用できる歯髄様組織を *in vitro* で創製することを最終目標とし、歯髄様形状(棒状)の細胞集合体を作製する技術の確立を目指した。本研究の結果、シート状に回収した歯髄幹細胞を用いることで棒状の集合体を作製することに成功した。さらに、歯髄幹細胞集合体が象牙質/歯髄複合体を構築する機能を有していることが明らかになり、歯髄様組織を *in vitro* で構築できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to establish new technology to fabricate dental pulp-like tissue to be transplanted for regenerative medicine. The stick-shaped 3-dimensional (3D) cell construct composed of dental pulp derived stem cells were successfully fabricated by molding the sheeted cell aggregations. The cell construct prepared was found to possess the function to form dentin/pulp complex, suggesting the usefulness of our tissue engineering technology for fabrication of dental pulp-like tissue *in vitro*.

研究分野：歯科生体材料学

キーワード：歯学 組織工学 再生歯学 歯髄 細胞集合体

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた再生医療への関心が高まるなか、抜髄処置が施された歯に歯髄を再生する歯髄再生療法の確立は、患者の QOL を向上させるうえで重要なオプションのひとつになると考えられている。

近年、CD105⁺細胞や SHED 細胞を用いた歯髄再生医療に関する研究が精力的に進められ、動物実験などにおいて失活歯に歯髄を再生することに成功したとの報告もある。しかしながら、これらの幹細胞を応用する試みにおいては、歯髄組織の構築にある程度の時間を要し、また、スキャフォールドや形態形成因子が必要であるなど、臨床応用をするうえでまだ十分なレベルには至っていない。

ところで、本研究の研究分担者である佐々木と松本らは、温度応答性高分子の poly-N-isopropylacrylamide (pNIPAAm) ゲルモールドを用いて、骨髄由来間葉系幹細胞の三次元球状集合体を作製することに成功した (Sasaki J, et al. *Tissue Eng Part A*, 2010.)。また、この細胞集合体は、単なる細胞の凝集塊ではなく、石灰化能等の自己組織化能を有する構造体であることを明らかにしてきた (Sasaki J, et al. *Integr Biol*, 2012.)。

われわれは、この細胞集合体を作製する技術を応用することで、歯髄再生医療に利用できる移植用歯髄様組織を *in vitro* で創製することが可能になるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、失活歯への移植に適した歯髄様組織を *in vitro* で構築することを最終目標とし、pNIPAAm ゲルモールドを用いて、ヒト由来歯髄幹細胞 (hDPSCs) から成る歯髄様形状 (棒状) の細胞集合体を作製する技術の確立を目指した。さらに、作製した細胞集合体が機能的な組織であるかを検証するために、象牙質/歯髄複合体様組織への *in vitro* での誘導が可能かについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 骨髄間葉系幹細胞および線維芽細胞を用いた棒状細胞集合体の作製

まず、象牙芽細胞と類似した細胞表現形を有する骨髄間葉系幹細胞を用いて棒状の細胞集合体を作製できるか否かを検討した。長さ 10 mm、幅および深さが 1.0、1.5、3.0 mm の溝を有する 3 種類の pNIPAAm ゲルモールドを作製した。培養したマウス骨髄由来間葉系幹細胞を各ゲルモールドに播種し、1 日間の培養を行った後、周囲温度を低下させて pNIPAAm ゲルを膨張させることで骨髄間葉系幹細胞のみから成る棒状集合体を取り出すことを試みた。

歯髄組織の大部分は線維性結合組織から

構成されている。そこで次のステップとして、線維芽細胞を用いて棒状集合体を作製できるかを検討した。骨髄間葉系幹細胞の場合と同様の方法に加え、ゲルモールドから取り出した細胞集合体を 21G、25G、27G の注射針に通す方法でも作製を試みた。

(2) hDPSCs を用いた棒状細胞集合体作製法の確立

長さ 12 mm、幅 3 mm、深さ 3 mm の溝を有する pNIPAAm ゲルモールドにトリプシン処理によって回収した hDPSCs の細胞懸濁液を注入し、培養 2 日後に周囲温度を低下させることで棒状集合体の取り出しを試みた。また、hDPSCs をコンフルエントの状態に 5 日間培養した後に、セルスクレーパーを用いてシート状に回収した細胞塊を pNIPAAm ゲルモールドに填入し、同様に 2 日間の培養を行った後に集合体として取り出すことを試みた。

(3) hDPSCs 棒状集合体の石灰化誘導による象牙質/歯髄複合体の構築

作製した hDPSCs のみから構成される棒状集合体を、培養培地にアスコルビン酸、β グリセロリン酸、デキサメタゾンを追加した石灰化誘導培地を用いて静置培養した。最大 20 日間まで培養した後にパラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行って内部構造を観察した。また、細胞集合体を構成する hDPSCs の象牙芽細胞への分化能を検討するために Dentin sialophosphoprotein (DSPP) の免疫蛍光染色、石灰化基質の沈着を観察するために von Kossa 染色を行った。

4. 研究成果

(1) 骨髄間葉系幹細胞および線維芽細胞を用いた棒状細胞集合体の作製

溝の大きさが異なる pNIPAAm ゲルモールドを用いて骨髄間葉系幹細胞の棒状集合体の作製を試みたところ、溝の幅の大きさに応じて得られる集合体の長さや太さが変化した (図 1)。

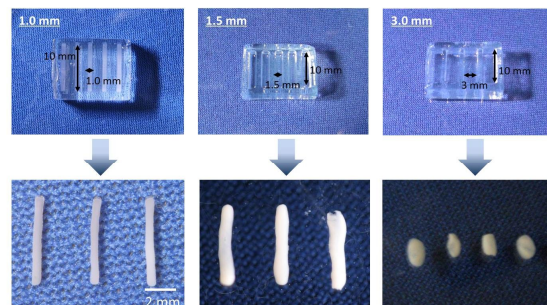


図 1. 異なる大きさの溝を有するゲルモールドを用いて作製した骨髄間葉系幹細胞集合体

そして、大きさの変化の定量評価の結果、溝の幅と深さが大きいほど、長軸方向や短軸

方向への変形割合が大きいことが分かった。また、いずれのゲルモールドにおいても、得られる棒状集合体のサイズ制御の再現性は良好であった。

線維芽細胞を用いて同様に棒状細胞集合体の作製を試みた場合は、いずれの溝の大きさのモールドを使用しても、また、いずれの培養日数においても不定形の細胞集合塊しか得られなかった。一方、不定形の細胞集合塊を注射針を通過させて成形したところ、棒状の集合体を得ることに成功した(図2)。

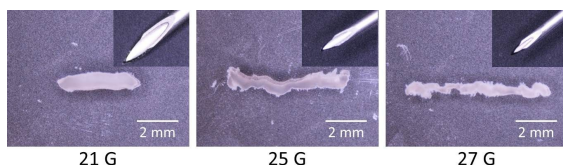


図2. 注射針を用いて成形した線維芽細胞集合体

棒状成形したこれらの細胞集合体について、Live/Dead染色およびトリパンブルー染色で生細胞の割合を観察したところ、いずれの直径の注射針を用いて作製した集合体においても、約95%の細胞が生存していることが明らかとなった。

(2) hDPSCsを用いた棒状細胞集合体作製法の確立

トリプシン処理で回収したhDPSCsをpNIPAAmゲルモールドに播種し、2日間培養後に取り出すことを試みたところ、棒状集合体を得ることは不可能であった(図3A)。一方、hDPSCsのシート状細胞塊をゲルモールドに填入する方法を用いると、棒状集合体の作製が可能であった(図3B)。

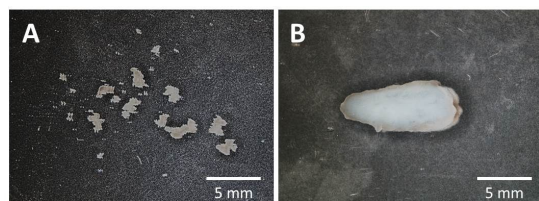


図3. hDPSCs棒状集合体の作製

シート状にhDPSCsを回収したことで細胞外基質が維持され、細胞-基質間接着を誘導できた結果、棒状成形が可能になったものと考えられた。

(3) hDPSCs棒状集合体の石灰化誘導による象牙質/歯髄複合体の構築

hDPSCsのみから構成される細胞集合体の作製直後の薄切切片をHE染色した結果、集合体の最外層に細胞が密に存在しており、また、中心部においても細胞が生存している様子が観察された。棒状集合体を石灰化誘導培地を用いて20日間培養した試料においても、集合体中心部の細胞は生存していた。

次に、von Kossa染色を行った結果、培養10日目において石灰化基質沈着が集合体外

層に認められた(図4A)。また、培養20日目の試料では、より多くの石灰化基質の沈着が認められた。一方、集合体中心部では、培養期間に関わらず石灰化基質の沈着量が少なかった。

同様の試料から作製した薄切切片に対して象牙質基質の一つであるDSPPの免疫蛍光染色を行ったところ、産生された石灰化基質にDSPPが含まれていることが分かった(図4B)。また、培養20日目の試料においても、石灰化基質が沈着している細胞集合体の外層にDSPPが強く発現していた。

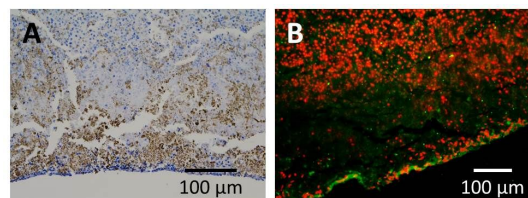


図4. hDPSCs棒状集合体の石灰化基質産生

これらの結果から、棒状集合体外層のhDPSCsが象牙芽細胞への分化能を維持しており、象牙質様の硬組織が形成したものと考えられた。すなわち、hDPSCsからなる棒状集合体が象牙質/歯髄複合体を構築する機能を有していることが示唆された。

以上のように、本研究の結果から、シート状で回収した細胞集合体を温度応答性高分子pNIPAAmゲルのモールドを用いて培養することで、hDPSCsからなる棒状集合体の構築が可能であること、および、構築した集合体の象牙質/歯髄複合体への誘導が可能であることが明らかとなった。この棒状細胞集合体を応用することで、歯髄再生医療に利用できる歯髄様組織を*in vitro*で構築できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. 佐々木淳一, 今里 聡. 歯髄再生技術はここまで進化した 第1回: 歯由来の細胞を用いた歯髄再生の試み. 日本歯科評論 73(10), 153-155, 2013. 査読無
2. 佐々木淳一, 今里 聡. 歯髄再生技術はここまで進化した 第2回: 歯由来以外の細胞を用いた歯髄再生の試み. 日本歯科評論 73(11), 145-147, 2013. 査読無
3. 佐々木淳一, 今里 聡. 歯髄再生技術はここまで進化した 第3回: 成長因子やスキャフォールドの応用. 日本歯科評論 73(12), 141-143, 2013. 査読無
4. Sasaki JI, Matsumoto T, Imazato S. Oriented bone formation using biomimetic fibrin hydrogels with three-dimensional patterned bone

matrices. Journal of Biomedical Materials Research Part A 103(2), 622-627, 2015. 査読有

5. 佐々木淳一, 今里 聡. 三次元細胞集合体を応用した骨様組織の in vitro 創製. バイオマテリアル - 生体材料 - 33(1), 41-44, 2015. 査読無
6. Sathi GA, Kenmizaki K, Yamaguchi S, Nagatsuka H, Yoshida Y, Matsugaki A, Ishimoto T, Imazato S, Nakano T, Matsumoto T. Early initiation of endochondral ossification of mouse femur cultured in hydrogel with different mechanical stiffness. Tissue Engineering Part C: Methods (in press). 査読有
7. Sasaki JI, Hashimoto M, Yamaguchi S, Itoh Y, Yoshimoto I, Matsumoto T, Imazato S. Fabrication of biomimetic bone tissue using mesenchymal stem cell-derived three-dimensional constructs incorporating endothelial cells. PLoS ONE (in press).

[学会発表](計10件)

1. 佐々木淳一, 松本卓也, 毛利有希子, 吉本いつみ, 今里 聡. 三次元細胞集合体における骨/軟骨基質形成プロセスの解析. 第10回日本再生歯科医学会学術大会(2012年9月2日, 神戸市).
2. Imazato S. Restorative materials and technique for the future: From "biomimetic" to "bio-protective & biopromoting". Young Scientists in Dentistry 10th Symposium (2012年10月8日, Leipzig, Germany). 招待講演
3. 佐々木淳一, 毛利有希子, 竹重文雄, 今里 聡. 歯髄組織工学に向けた棒状三次元細胞集合体の作製. 第138回日本歯科保存学会2013年度春季学術大会(2013年6月28日, 福岡市).
4. 佐々木淳一, 竹下 登, 伊藤善博, 吉本いつみ, 松本卓也, 今里 聡. 三次元細胞集合体内における血管内皮細胞の共培養. 第35回日本バイオマテリアル学会大会(2013年11月26日, 東京都).
5. 佐々木淳一, 松本卓也, 今里 聡. 基質配向ハイドロゲルを応用した皮質骨様組織の構築. 第13回日本再生医療学会総会(2014年3月4日, 京都市).
6. 吉本いつみ, 佐々木淳一, 松本卓也, 今里 聡. 細胞集合体の凍結乾燥処理によ

る幹細胞由来新規骨補填材の作製. 第63回日本歯科理工学会学術講演会(2014年4月13日, 東京都).

7. Sasaki JI, Imazato S. Fabrication of scaffold-free 3D cell constructs for bone regeneration. Kyungpook-Osaka University International Symposium, 2014 "New Horizon of Basic and Clinical Research in Dentistry" (2014年5月16日, Daegu, Korea). 招待講演
8. 松田真悠, 濱本大貴, 吉崎文彦, 佐々木淳一, 今里 聡. 血管内皮細胞の導入による三次元細胞集合体内の生細胞維持の試み. 大阪大学歯学会第118回例会(2014年7月24日, 吹田市).
9. Sasaki JI, Matsumoto T, Imazato S. Fabrication of biomimetic bone-like tissue by using 3D cell constructs. The 22nd Annual Meeting of the Korean Society for Biomaterials(2014年11月6日, Seoul, Korea). 招待講演
10. Sasaki JI, Matsumoto T, Imazato S. Fabrication of biomimetic bone-like tissue by using 3D cell constructs. 第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014年11月18日, 東京都).

[その他]

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座(歯科理工学教室)ホームページ
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/techno/Welcome.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今里 聡 (IMAZATO SATOSHI)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号: 80243244

(2) 研究分担者

松本卓也 (MATSUMOTO TAKUYA)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40324793

佐々木淳一 (SASAKI JUN-ICHI)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号: 50530490