

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名（本籍） 竹 部 祐 生 亮（岡山県）
博士の専攻分野 博 士（歯 学）
学 位 記 番 号 甲 第 473 号
学位授与年月日 平成 29 年 3 月 31 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻 鶴見大学大学院歯学研究科
（博士課程）歯学専攻
学 位 論 文 題 目 Cryopreservation Method for the Effective Collection of Dental Pulp Stem Cells
（歯髄幹細胞の効率的回収を可能とする新規凍結保存法の開発）
Tissue Engineering, Part C 第 23 巻 第 5 号 251 頁～ 261 頁掲載 平成 29 年 4 月 26 日発行
論 文 審 査 委 員 主査 教授 斎 藤 一 郎
副査 教授 二 藤 彰 副査 教授 里 村 一 人

内 容 の 要 旨

【緒言および目的】

歯髄幹細胞は細胞増殖能に優れ、他の体性幹細胞と同程度の分化能を有していることから、再生医療における幹細胞ソースとして注目されている。しかし、現在の歯髄幹細胞の確保方法では、歯髄組織を採取してからある一定の細胞数を確保して凍結保存するまでに長い培養期間と多くの費用を要するという問題がある。将来の再生医療に向けてより多くの歯髄幹細胞を確保する上では、低コストで簡便、且つ安全な細胞回収保存システムの構築が必要である。そこで本研究では、歯髄幹細胞の簡便な回収と確実な保存を可能とする新規凍結保存法の開発を試みた。

【材料および方法】

1. 歯髄組織の回収

術前にインフォームドコンセントが得られた 18 歳～ 34 歳の患者から抜歯した第 3 大臼歯より歯髄組織を回収した。ヒト歯髄組織を扱うに先立ち、鶴見大学倫理委員会の承認を得て実験を行った。

2. Explant 法により培養した歯髄組織片の組織学的観察

歯冠部歯髄組織を 2 片に分け、1 片の歯髄組織片を culture dish (Falcon Corning) の上に静置し、基礎培地 (α -MEM : Sigma-Aldrich, 10% FBS : Biological Industries, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin : Invitrogen, 1 $\times$ Glutamax[®] : Invitrogen) にて 5 日間培養した。組織片をパラフィン包埋行った後に切片を作製した。もう 1 片の組織片は培養を行わず、即時にパラフィン包埋した。切片は H-E 染色後、光学顕微鏡を用いて観察した。さらに、組織片内の細胞の挙動を確認するために、抗 Ki-67 抗体 (Abcam) にて免疫組織化学染色と TUNNEL 法による観察を行った。

3. 新規凍結法を用いた歯髄組織片からの細胞遊走の評価

歯冠部歯髄組織を 6 分割し、3 片の組織片は 5 日間培養後に凍結保存し (新規凍結群)、残りの組織片は即時凍結保存した (即時凍結群)。解凍後、culture dish の上に静置して 10 日間培養した。培養後、両群の組織片からの細胞遊走を評価した。

4. 細胞特性の評価

歯冠部歯髄組織を 6 分割し、3 組織片を新規凍結群、残りの組織片はコントロール群とした。新規凍結群は 1 週間凍結保存した後に解凍し培養を行い、組織片から遊走してきた細胞を回収した。コントロール群は、凍結を行わず Explant 法にて回収した細胞を使用した。

5. 細胞増殖能

新規凍結群とコントロール群の細胞を培養後、0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 日に固定し、Crystal violet 法にて細胞増殖能を測定した。

6. フローサイトメトリ解析

両群の細胞を 1×10^6 cells/tube に分注し、それぞれ一次抗体（抗 CD146, 抗 CD73, 抗 CD105, 抗 CD34, 抗 CD45, 抗 CD14, 抗 HLA-DR, 抗 Stro-1）を添加して反応させた後に、FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience) にて陽性細胞率を解析した。

7. 分化能の検討

i) 骨芽細胞への分化能

両群の細胞を基礎培地にて confluence まで培養を行い、その後、骨誘導培地（基礎培地 + 100 nM dexamethasone : Sigma Aldrich, 2 mM β -glycerophosphate : Sigma-Aldrich, 50 μ M ascorbic acid 2 phosphate : Wako）に交換し、さらに 21 日間培養を行った。培養後、Arizarin red S 染色を行い、Arizarin red 陽性領域を Image-J (National Institute of Health) を用いて解析した。さらに Osteocalcin, Runt-related gene 2, Dentin sialophosphoprotein, Alkaline phosphatase の骨芽細胞関連遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した。

ii) 脂肪細胞への分化能

両群の細胞を基礎培地にて confluence まで培養を行い、脂肪誘導培地（基礎培地 + 1 μ M dexamethasone, 100 μ M indomethacin : Wako, 500 μ M 3-isobutyl-methylxanthine : Wako, 10 μ g/ml human insulin : Wako）に交換し、さらに 21 日間培養を行った。培養後、Oil Red O 溶液 (Sigma-Aldrich) にて染色し、色素量を定量した。さらに Lipoprotein lipase, Peroxisome proliferator-activated γ 2 の脂肪細胞特異的遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した。

iii) 軟骨細胞への分化能

両群の細胞を軟骨誘導培地（基礎培地 + 2 mM β -glycerophosphate, 100 μ M l-ascorbate 2 phosphate : Wako, 100 nM dexamethasone, 10 ng/ml TGF β -3 : R&D system, Inc., 2 mM L-glutamine : Wako, 1% ITS : Trevigen）を用いて両群の細胞のベレット培養を 21 日間行った。培養後、パラフィン切片を作製し、Alcian blue solution (pH 1.0) (WAKO) と Nuclear fast red (Sigma) にて染色を行った。さらに、切片を抗 Aggrecan 抗体 (Abcam) で免疫組織化学染色を行い、加えて、Aggrecan, Type II collagen, SRY-box 9 の軟骨細胞特異的遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した。

【結 果】

Explant 法における組織片の動態を組織学的に観察したところ、培養前の組織片では細胞が組織内全体に比較的均一に分布していたが、5 日間培養した組織片では細胞が組織辺縁に稠密に集積していることが観察された。この組織辺縁に集積した細胞は細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現を認めず、また、組織片中央部の細胞にアポトーシス細胞は検出されなかった。新規凍結法にて保存した組織片からの細胞遊走の有無を観察したところ、新規凍結群では 30 片中 28 片 (93.3%) に組織片から遊走が確認でき、即時凍結群では 30 片中 11 片 (36.7%) にしか見られなかった。新規凍結群の細胞とコントロール群の細胞は線維芽細胞様形態をしており、ほぼ同等の細胞増殖能を有していた。また、新規凍結群の細胞は、Stro-1, CD146, CD73, CD105 の MSC マーカーは陽性で、造血系マーカーの CD34, CD45, CD14, HLA-DR は陰性であった。さらに新規凍結群の細胞は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有していることが確認できた。さらに、新規凍結保存法にて回収した細胞は MSC の特性を持つことが示唆された。

【考 察】

Explant 法では、組織中央の細胞が組織辺縁に遊走し、その細胞が組織外に遊走することが示唆された。この現象を利用し、組織辺縁の細胞が集積した領域に凍結保存液が浸透することによって、凍結による細胞障害を防ぐことができ、凍結前に組織片を 5 日間培養することで、解凍後に細胞の回収が可能となったものと考えられた。

このことから開発した新規凍結保存法は、歯髄幹細胞を用いた再生医療実現に大きく寄与するものと考えられる。

審査の結果の要旨

歯髄幹細胞は再生医療における幹細胞ソースとして注目されている。しかし、現在の歯髄幹細胞の確保方法では、歯髄組織を採取してから、ある一定の細胞数を確保して凍結保存するまでに長い培養期間と多くの費用を要するという問題がある。将来の再生医療に向けてより多くの歯髄幹細胞を確保する上では、低コストで簡便かつ安全な細胞回収保存システムの構築が必要である。そこで本研究では、歯髄幹細胞の簡便な回収と確実な保存を可能とする新規凍結保存法の開発を試みた。

Explant 法における組織片の動態を組織学的に観察したところ、培養前の組織片では細胞が組織内全体に均一に分布して

いたが、5日間培養した組織片では細胞が培養皿に接している側の組織辺縁に稠密に集積していることが観察された。この組織辺縁に集積した細胞は細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現を認めず、また組織片中央部の細胞にアポトーシス細胞は検出されなかったことから、細胞の移動によるものと考えられた。この現象を利用して、組織辺縁の細胞集積領域に凍結保存液を浸透させることで、効果的に細胞の凍結保存が可能となるのではないかと仮説を立てた。

歯冠部歯髄組織を5日間培養後に凍結保存する群（新規凍結群）と即時凍結保存する群（即時凍結群）の2群に分け、解凍後、培養皿上に静置して10日間培養し、両群の組織片からの細胞遊走を評価した。その結果、新規凍結群では30片中28片（93.3%）に組織片からの細胞遊走が確認できた一方、即時凍結群では細胞遊走がみられたのは30片中11片（36.7%）にとどまった。次に回収した細胞の特性評価を行ったところ、細胞は線維芽細胞様形態を呈し、従来法により回収される細胞（コントロール群）とほぼ同等の細胞増殖能を有していた。また細胞表面マーカーの発現パターンはコントロール群と同じであった。さらに骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有していることが確認でき、新規凍結保存法にて回収した細胞は間葉系幹細胞の特性を持つことが確認された。

本研究により、歯髄組織片を凍結前に5日間培養することで、歯髄細胞が組織辺縁に移動すること、組織周辺部の細胞集積領域に凍結保存液を浸透させることによって歯髄組織を直接凍結保存できること、さらにその凍結保存歯髄組織より効率的に歯髄幹細胞を分離回収できることが示唆された。

本研究で開発された歯髄組織の新規凍結保存法は、歯髄幹細胞を用いた再生医療実現に大きく寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。