

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）	福島 龍 洋（東京都）
博士の専攻分野	博士（歯学）
学位記番号	甲第 487 号
学位授与年月日	平成 30 年 9 月 30 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	Dental Pulp Stem Cell-derived, Scaffold-free Constructs for Bone Regeneration （骨再生におけるヒト歯髄幹細胞を用いた 3 次元細胞組織体の作製） International Journal of Molecular Sciences doi:10.3390/ijms19071846
論文審査委員	主査 教授 二 藤 彰 副査 教授 五 味 一 博 副査 教授 里 村 一 人

内容の要旨

【緒言および目的】

現在、細胞移植においては、scaffold を用いずに細胞のみで作製した 3 次元組織構造体（Tissue engineering construct : TEC）を移植することにより、組織や臓器の欠損に対して再生・修復が試みられている。そこで本研究では、多分化能および高い増殖能をもつヒト歯髄幹細胞（hDPSCs）から効率的な骨再生を誘導し得る scaffold free の 3 次元組織構造体（3D hDPSCs construct）を作製し、その特性について検討した。

【材料および方法】

1. ヒト歯髄組織から細胞の分離と培養

本研究倫理審査委員会の承認（承認番号：901）下に、18～30 歳の健康な患者 10 人の抜去智歯から歯髄組織を回収した。採取した歯髄組織を 3 mg/mL type I collagenase と 4 mg/mL dispase solution を用いて酵素処理後、基本培地（ α -MEM + 10% FBS + 100 U/mL penicillin + 100 μ g/mL streptomycin）にて培養を 3 継代まで行った。

2. フローサイトメトリー解析

分離した細胞を 1×10^6 cells/tube に分注し、それぞれ 1 次抗体（CD146, CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14, HLA-DR）を添加して反応後、Cell Sorter SH800 Series にて陽性細胞率を解析した。

3. 3D hDPSCs constructs の作製

hDPSCs を 1.0×10^5 cells/well で 6-well plate に播種後、基本培地で 4 週間継代することなく培養することにより、ヒト歯髄幹細胞シート（hDPSCs sheets）を作製した。このシートを超低付着性培養皿にて、さらに 1 週間、3 次元培養（3D）を行い 3D hDPSCs constructs を作製した。一方、hDPSCs sheets をさらに 1 週間、単層培養（2D）を行ったものをコントロールとした。各培養方法で、基本培地と骨芽細胞誘導培地（基本培地 + 50 μ g/mL ascorbic acid + 10 mM β -glycerophosphate + 10^{-3} M dexamethasone）のそれぞれで培養した 4 群を以下とする。

- ・ 2D（-）hDPSC sheet：基本培地にて単層培養したもの
- ・ 2D（+）hDPSC sheet：骨芽細胞誘導培地にて単層培養したもの
- ・ 3D（-）hDPSC construct：基本培地にて 3 次元培養したもの
- ・ 3D（+）hDPSC construct：骨芽細胞誘導培地にて 3 次元培養したもの

4. 組織学的観察

3D hDPSCs constructs を4% PFA で固定し、パラフィン包埋を行った後に、5 μm で薄切した切片を H&E 染色、1% Alizarin red 染色を行い組織学的に観察した。また、骨関連タンパク質の発現については、抗 Osteopontin (OPN) 抗体、抗 bone sialoprotein (BSP) 抗体、抗 Osteocalcin (OCN) 抗体、抗 Type1 collagen (Col 1) 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。さらに、組織構造体内の細胞の生死を確認するため、TUNEL 染色をし、アポトーシス細胞の検出を行った。

5. 骨芽細胞への分化能の検討

hDPSCs sheet の培養開始後 0, 1, 3, 5, 7 日目の組織構造体を回収し、骨関連遺伝子である alkaline phosphatase (ALP), Col 1, OPN, BSP, OCN, Runx2, Osterix の発現を quantitative real-time PCR 法で経時的に解析した。次に、3D hDPSCs constructs を 1% Nonidet P-40 を用いてホモジナイズ後、遠心分離をかけて得られた上清より、ALP 活性値 (units/ μg) と DNA 量 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を測定した。単位 DNA 量あたりの ALP 活性値を定量した。最後に、3D hDPSCs constructs の Alizarin red 染色後、塩酸アルコールにて処理した際の抽出液の吸光度 (405 nm) を測定し、石灰化基質を定量した。

【結果】

ヒト歯髄組織から分離した細胞は、間葉系幹細胞マーカーである CD90, CD146, CD73, CD105 陽性であり、造血系幹細胞マーカーである CD45, CD34, CD14, HLA-DR 陰性であることから幹細胞であることが示唆された。この細胞で作製した 3D hDPSCs constructs は、3~4 mm 程度の弾性硬の球状構造を呈していた。組織学的所見では、2D (+/-) hDPSC sheets は、H&E 染色にて石灰化基質の形成が認められず、Alizarin red 染色による染色域も確認されなかったのに対し、3D (+/-) hDPSC constructs は、H&E 染色にて石灰化基質の形成が全ての試料で確認でき、Alizarin red 染色にて赤く染色されたカルシウムの沈着を認めた。特に、骨芽細胞誘導培地にて培養を行うと、より多くの石灰化基質を認めた。3D (+) hDPSC construct の免疫組織学的所見では、骨関連タンパク質である OPN, BSP, OCN, Col 1 の発現が確認でき、特に組織構造体中心部に強く発現していた。また、組織構造体内の細胞は TUNEL 染色に陰性であった。骨関連遺伝子の発現では、3D hDPSC constructs は 2D hDPSC sheets と比較して、培養開始後 7 日目で OPN, BSP, OCN, Runx2, Osterix 遺伝子の発現は有意に高く、さらに 3D (+) hDPSC construct はこれらの遺伝子の発現がさらに促進した。一方、3D hDPSC constructs の ALP, Col 1 遺伝子の発現は、2D hDPSC sheets と比較して有意に低下していた。また、3D hDPSC constructs の ALP 活性も有意に低下した。石灰化基質形成能を比較した結果では、3D (+/-) hDPSC constructs は 2D (+/-) hDPSC sheets と比較して有意に高く、さらに 3D (+) hDPSC construct の石灰化が最も高くなることが示された。

【考察】

本法で作製した 3D (+) hDPSC construct は、細胞、細胞自身が産生した骨関連細胞外マトリックスと石灰化基質にて構成されていること、さらに構造体内部にアポトーシスした細胞が検出されなかったことに加え、人工材料を使用していないこと、また作製に特別な機械等は不要であり、3次元培養するだけで簡便に scaffold-free TEC の作製が可能であることから、骨組織再生に有用性の高い移植材であることが示唆された。

審査の結果の要旨

再生医療においては、最近、scaffold を用いずに細胞のみで作製した 3次元組織構造体の利用が模索されている。そこで本研究では、多分化能および高い増殖能をもつヒト歯髄幹細胞 (hDPSCs) から効率的な骨再生を誘導し得る scaffold free の 3次元組織構造体 (3D hDPSCs construct) を作製し、その特性について検討した。

hDPSCs を 6-well plate に播種後、4週間培養を継続し、ヒト歯髄幹細胞シート (hDPSCs sheets) を作製した。このシートを超低付着性培養皿にて、さらに1週間、3次元培養 (3D) を行い 3D hDPSCs constructs を作製した。一方、hDPSCs sheets をさらに1週間、単層培養 (2D) を行ったものをコントロールとした。またそれぞれを基本培地あるいは骨芽細胞誘導培地で培養し、2D (+) hDPSC sheets, 2D (-) hDPSC sheet, 3D (+) hDPSC constructs, 3D (-) hDPSC constructs の4群を作製した。3D hDPSCs constructs は、3-4 mm 程度の弾性硬の球状構造を呈していた。組織学的所見では、2D (+/-) hDPSC sheets は、H&E 染色にて石灰化基質の形成が認められず、Alizarin red 染色による染色域も確認されなかったのに対し、3D (+/-) hDPSC constructs は、H&E 染色にて石灰化基質の形成が全ての試料で確認でき、Alizarin red 染色にて赤く染色されたカルシウムの沈着を認めた。特に、骨芽細胞誘導培地にて培養を行うと、より多くの石灰化基質を認めた。3D (+) hDPSC construct の免疫組織学的所見では、OPN, BSP, OCN, Col 1 の発現が確認できまた組織構造体内の細胞は TUNEL 染色に陰性であった。3D hDPSC constructs では 2D hDPSC sheets と比較して、培養

開始後7日目で OPN, BSP, OCN, Runx2, Osterix 遺伝子の発現は有意に高く, さらに 3D (+) hDPSC construct ではこれらの遺伝子発現がさらに促進した. 一方, ALP, Col1 の遺伝子発現および ALP 活性は, 2D hDPSC sheets と比較して 3D hDPSC constructsn において有意に低下していた. 石灰化基質形成能は, 2D (+/-) hDPSC sheets と比較して 3D (+/-) hDPSC constructs では有意に高く, さらに 3D (+) hDPSC construct の石灰化が最も高くなることが示された.

本法で作製した 3D (+) hDPSC construct は, 細胞, 細胞自身が産生した骨関連細胞外マトリックスと石灰化基質にて構成されていること, さらに構造体内部にアポトーシスした細胞が検出されなかったことに加え, 人工材料を使用していないこと, また簡便に scaffold-free の組織体の作製が可能であることから, 骨組織再生に有用性の高い移植材であることが示唆された.

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.