

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	梅 原 茉 愛
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 537 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 14 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	Improved Method for Dental Pulp Stem Cell Preservation and Its Underlying Cell Biological Mechanism (歯髄幹細胞の保存方法の改良とその細胞生物学的メカニズム) Cells, 第 12 巻, 第 17 号 2138 掲載 令和 5 年 8 月 24 日発行
論 文 審 査 委 員	主査 教授 二 藤 彰 副査 教授 河 原 博 副査 教授 里 村 一 人

内 容 の 要 旨

再生医療を実現させる上で、良質の幹細胞を効率的かつ確実に確保することが重要である。間葉系幹細胞の一つである歯髄幹細胞は増殖能に優れ、他の成体幹細胞と同程度の多分化能を有するなどの特性から、再生医療における幹細胞源として注目、利用されている。しかし現在までに行われている歯髄幹細胞の回収保存法は、抜去歯より歯髄組織を採取した後、ある一定の細胞数を確保するまで細胞培養を行い、その後分離した細胞を凍結保存するというものである。そのため長い培養期間を要すること、それに伴いコンタミネーションのリスクが高くなること、高額な費用を要すること、回収した細胞の保管場所の確保が必要となるなどの問題がある。我々はこれらの問題を解決することを目的に、歯髄組織そのものを culture dish 上で 5 日間培養した後に、歯髄組織のまま凍結保存するという新規凍結保存法 (NCM) を確立してきた。この方法で培養すると、歯髄細胞が dish 側に偏在するようになり、この偏在した細胞に凍結保存液が浸透することにより、細胞に傷害を与えることなく凍結保存でき、後日必要に応じて回収することが可能であることが確かめられた。本研究では本技術の臨床応用を視野に入れ、確保した歯髄組織の輸送に要する時間をも利用しより効率良く細胞を確保、保存する方法として、歯髄組織片を上下からメンブレンで挟み込む改良歯髄組織凍結保存法 (Improved CMDPT) の確立を目指した。

鶴見大学歯学部倫理審査委員会承認のもと、同意の得られた患者の抜去歯から歯髄組織を採取し、上下を cell culture inserts で挟んで保持し、37℃、5% CO₂ 下で 5 日間培養を行った。24 時間毎にメンブレンで挟んだままの状態に固定し、組織切片を作製、細胞動態を確認するとともに、細胞の特性について免疫組織化学的に検討した。その結果、培養後 72 時間以降に上下のメンブレン近傍に細胞が偏在するようになることが確かめられた。これらの細胞は Ki-67 陰性であったことから、この細胞の偏在は細胞増殖ではなく細胞遊走によるものであることが確認できた。また、上下のメンブレンのみを固定液に浸漬し、組織外への細胞の遊走について検討したところ、培養 96 時間後で細胞が outgrowth し始め、120 時間では細胞の顕著な outgrowth がみられた。そこで、従来の NCM における dish 面近傍へ偏在する細胞数と Improved CMDPT においてメンブレン近傍に偏在する細胞数を経時的に比較したところ、後者において 48 時間後にメンブレン近傍に移動した細胞数が、NCM での 120 時間後に観察された細胞数と同程度であった。また Improved CMDPT で 72 時間後にメンブレン近傍に移動した細胞数は、NCM の 120 時間後に観察された細胞数よりも多く、NCM よりも Improved CMDPT の方がより短時間で効率的に細胞の回収が可能となることが明らかとなった。

次に Improved CMDPT で回収した細胞の特性について検討したところ、培養 72 時間後の歯髄組織切片において、偏在している細胞に幹細胞マーカーである CD44 の発現を認めた。また骨芽細胞への分化誘導下では、Alizarin Red S 染色陽性

の石灰化基質の形成を認めた。脂肪細胞分化誘導下では、Oil Red O 染色陽性の脂肪滴形成と脂肪細胞特異的マーカーである FABP4 の発現を認めた。軟骨細胞分化誘導下では、Alcian Blue 染色陽性を示し、軟骨細胞特異的マーカーである Aggrecan の発現を認めた。これらの結果から、Improved CMDPT で回収した細胞は歯髄幹細胞であり、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有することが確認された。

さらに Improved CMDPT で認められる細胞遊走のメカニズムについて検討したところ、CXC ケモカインサブファミリーの一つであり、組織・臓器の損傷に際して、損傷部位への間葉系幹細胞や炎症性細胞を動員し、損傷の修復を調節するサイトカインである stromal cell-derived factor-1 (SDF1) が、培養後 72 時間の歯髄組織片の中央付近に発現されていることが明らかとなった。さらに、ほぼすべての細胞が上下に移動した培養後 96 時間では、歯髄組織内に SDF1 の発現は認められなかった。このことから、歯髄組織片内での細胞の遊走には SDF1 が関与していることが強く示唆された。そこで歯髄幹細胞に対する SDF1 の遊走促進効果について、*in vitro* 浸潤アッセイを用いて検討したところ、SDF1 タンパク質を添加した群で有意に細胞の遊走が促進された。加えて Improved CMDPT での培養液中に SDF1 中和抗体を添加したところ、培養 48 時間のコントロール群では歯髄幹細胞はメンブレン近傍に局在していたが、SDF1 中和抗体添加群では細胞の移動は観察されなかった。培養 72 時間では、コントロール群では歯髄幹細胞はさらにメンブレン近傍に偏在したが、SDF1 中和抗体添加群では細胞の移動は観察されなかった。培養 96 時間では、コントロール群ではメンブレン近傍に局在していたほとんどの細胞が組織外へと遊走していたのに対し、SDF1 中和抗体添加群では、一部の歯髄幹細胞が上下のメンブレン近傍に偏在しているのみであった。このことから、SDF1 を阻害することにより歯髄組織内の細胞遊走が抑制されることが明らかとなり、細胞遊走のメカニズムに SDF1 が大きく関与していることが示唆された。しかし完全に細胞遊走が阻害されなかったことから、SDF1 による遊走促進以外のメカニズムの存在も示唆された。

これを踏まえ、細胞の移動に関与する他の分子を同定するために、マルチプレックスによる網羅的解析を行った。その結果、GRO- α 、MCP-1 の 2 つの因子の発現量が経時的に増加し、その増加が細胞の遊走・偏在の時期と一致していた。これら 2 つの因子はそれぞれ好中球、単球の走化性因子として知られているため、細胞の遊走促進因子の重要な候補であると考え、今後さらに詳細な検討を進める予定である。

以上の結果から、Improved CMDPT は歯髄幹細胞をより効率的に回収し、確実に保存することができる有用な方法であることが示された。また本法における細胞の偏在は、SDF1 を含めた複数の因子によって制御された細胞遊走によるものであることが明らかとなった。本法は、これまでに行われてきた一連の歯髄幹細胞の分離、培養、保存法における問題を克服できる方法であり、再生医療の効率的実施に向けてより多くの歯髄幹細胞を安定的に確保するための、低コストで、簡便かつ確実な細胞回収システムの構築に大きく貢献できるものと考えられる。今後は、Improved CMDPT における細胞遊走のメカニズムの解明をさらに進め、近い将来の臨床応用を目指したいと考えている。

審査の結果の要旨

再生医療においては、良質の幹細胞を効率的かつ確実に確保することが重要である。これまでの歯髄幹細胞の回収保存法は、抜去歯より歯髄組織を採取した後、細胞培養を行い、その後細胞を凍結保存するというものであるが、長い培養期間、コンタミネーションリスク、高額な費用、保管場所の確保などの問題がある。これまで、これらの問題を解決することを目指し、歯髄組織のまま凍結保存するという新規凍結保存法 (NCM) を確立してきた。本研究では、回収した歯髄組織の輸送に要する時間をも利用しより効率良く細胞を確保・保存する方法として、歯髄組織片を上下からメンブレンで挟み込む改良歯髄組織凍結保存法 (Improved CMDPT) の確立を目指した。

歯髄組織をメンブレンで挟んだままの状態に固定し、組織切片を作製、細胞動態ならびに、細胞の特性について解析した。その結果、培養後 72 時間以降に上下のメンブレン近傍に細胞が偏在していた。Ki-67 陰性であることから、細胞の偏在は細胞増殖ではなく細胞遊走によることが示唆された。Improved CMDPT で 72 時間後にメンブレン近傍に移動した細胞数は、NCM の 120 時間後の細胞数よりも多く、NCM よりも Improved CMDPT の方がより短時間で効率的に細胞の回収が可能となることが明らかとなった。

Improved CMDPT で回収した細胞では幹細胞マーカーである CD44 の発現を認め、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有することが確認された。

Improved CMDPT で認められる細胞遊走のメカニズムについて検討したところ、損傷の修復を調節するサイトカインである stromal cell-derived factor-1 (SDF1) の発現が、培養後 72 時間の歯髄組織片の中央付近に見られた。培養液中に

SDF1 中和抗体を添加したところ、細胞の移動は観察されなかった。マルチプレックスによる網羅的解析を行ったところ、GRO- α 、MCP-1 の2つの因子の発現量が経時的に増加していた。以上の結果から、Improved CMDPT は歯髄幹細胞をより効率的に回収・保存することができる有用な方法であることが示された。

本研究は、新たな歯髄組織凍結保存法の有用性を示し、今後の歯科・口腔外科臨床において、歯髄幹細胞を用いた再生医療に繋がることが期待される。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。