

研究者：河合 咲希（所属：大阪歯科大学 小児歯科学講座）

研究題目：6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) と低酸素培養が乳歯歯髓由来細胞に及ぼす影響

目的：

近年、再生医療研究において注目されている幹細胞が歯髓組織に存在し、なかでも乳歯歯髓に存在する幹細胞は、骨髄由来幹細胞に比べて高い増殖能を持ち、永久歯歯髓由来細胞と比較して増殖能や分化能に優れていることから再生医療への応用が期待されている。しかし、歯髓中に含まれる幹細胞は0.4~0.8%と非常に少なく、幹細胞を利用するためにはその増殖能や多分化能の維持・増強が必要である。6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) はマウス・ヒト ES 細胞において未分化能を維持することが報告されており、私はこれまでに、BIO がヒト乳歯歯髓由来細胞の未分化能を維持することを明らかにしてきた。また、低酸素培養 (2% O₂) が細胞増殖能、未分化能を増強するとの報告があり、私は現在までの研究において、ヒト乳歯歯髓由来細胞が低酸素培養下にて未分化マーカーである Oct3/4、Sox2 遺伝子発現を増強し、脂肪細胞への分化を可能にすることを明らかにしてきた。今後、ヒト乳歯歯髓由来細胞の未分化能を維持できる BIO の添加と、細胞の増殖能・分化能を増強させる低酸素培養を併用することでさらに未分化能を増強できれば、歯髓中に含まれる幹細胞を増加させることが可能となり、再生医療研究へ貢献できるものとする。

そこで本研究では、低酸素培養におけるさらなる分化能の検討を行うことを目的として、骨芽細胞分化能の検討を行った。また乳歯歯髓由来細胞の増殖能および分化能を増強させる条件を検討することを目的として、近年細胞の活性化に有用であると注目されている非熱的大気圧プラズマ (Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma : NTAPP) を用いた各種実験を行った。

対象および方法：

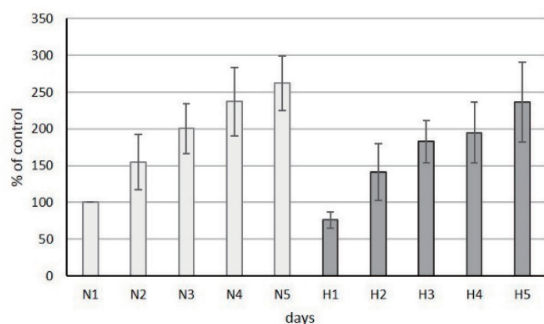
これまでの研究において、低酸素培養が乳歯歯髓由来細胞における脂肪細胞への分化を誘導することが確認できたことから、本研究では引き続いて骨芽細胞への分化能を検討した。

当初の計画では、BIO 添加乳歯歯髓由来細胞を低酸素状態で培養することにより、さらなる未分化能の増強が可能であるという仮説をもとに、細胞増殖能および未分化能の変動について検討を行うことを予定していたが、適切な培養条件を特定することが困難であったため、代替の細胞活性化条件として非熱的大気圧プラズマ (NTAPP) を利用し、乳歯歯髓由来細胞の増殖能に及ぼす影響について検討を行った。

- ・ヒト乳歯歯髓由来細胞は、矯正治療や晩期残存が原因で抜去された、う蝕がなく歯根吸収が1/3以下の乳歯を使用した。
- ・低酸素下培養はマルチガスインキュベーター (MCO-5M (UV) /5M ; SANYO Electric Co.,Ltd, Osaka, Japan) を使用し、37℃、2% O₂、93% N₂、5% CO₂ の条件下にて行った。

- ・細胞増殖能は MTSassay にて行った。96 well plate に細胞を播種し、1~5 日間低酸素培養を行い、MTS 試薬を添加、1 時間後マイクロプレートリーダーにて 460nm、690nm の吸光度を測定した。
- ・骨芽細胞誘導については、6well plate に細胞を播種し 2 日後から骨芽細胞分化誘導培地（R&D）にて分化を開始し、21 日間分化誘導した。培地は 2~3 日毎に交換した。2 日間低酸素培養後通常培養行った群（HN）、そのまま 21 日間低酸素培養下で分化を行った群（HH）、細胞の播種から通常培養を行った群（NN）について細胞形態の観察および骨芽細胞分化マーカーである ALP 発現を定量した。
- ・非熱的大気圧プラズマ（NTAPP）は大気圧マルチプラズマジェット源（(株)プラズマコンセプト東京）を使用し、アルゴン（Ar）ガス流量：2.7slm、照射距離 20mm、照射時間は 0、10、20、30、40、50 秒、照射回数は 1、2、3、4 回（1 回照射ごとに 1 時間あける）とし照射後の増殖能を測定した。

結果および考察：

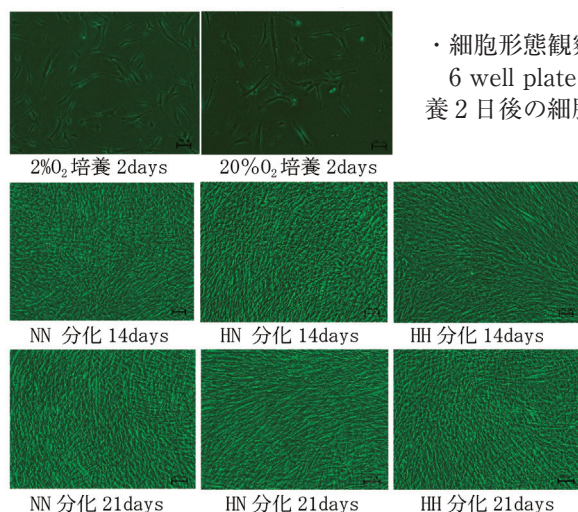


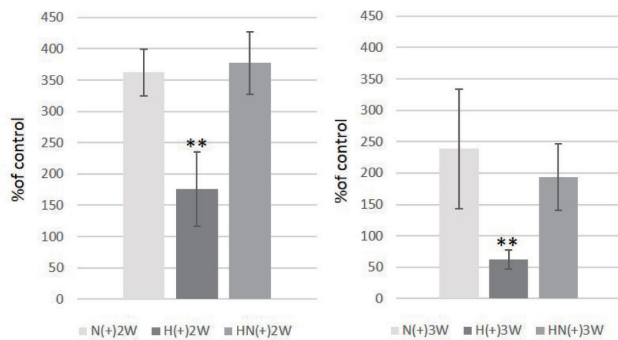
<低酸素培養下における細胞増殖能への影響>

96wellplate にて 5 日間培養した乳歯歯髄由来細胞において、通常培養（Normoxia：N）下と低酸素培養（Hypoxia：H）下において増殖能に差はみられなかった。

<低酸素培養下における骨芽細胞分化能の検討>

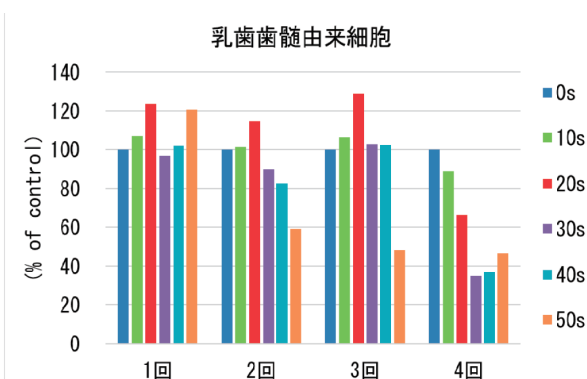
6well plate に細胞播種後、2 日間低酸素（2% O₂）刺激を与え、その後通常培養下において分化誘導（HN）、通常酸素（20% O₂）下で 2 日間培養後分化誘導（NN）、2 日間低酸素下にて培養を行い分化誘導時も低酸素下にて行った（HH）について、分化 14 日間後および 21 日間後の細胞形態の観察とアルカリフォスファターゼ発現について定量を行った。





・アルカリフォスファターゼ発現検討

通常酸素下で培養下細胞と比較して、低酸素培養下のみで14日、21日間分化誘導を行った細胞は有意にALP発現が減少していた。2日間低酸素刺激を与えた細胞に関しては、14日間分化においては増加がみられたが、有意な差はなくALP発現は通常培養下と同様に見られた。



＜非熱的大気圧プラズマによる細胞増殖能への影響＞

非熱的大気圧プラズマを照射した結果、20秒間3回の照射で細胞増殖能が有意に増加した。

これまでの研究により、酸素濃度2%の低酸素培養において、ヒト乳歯歯髄由来細胞の脂肪細胞分化は増強されることを明らかにしたが、今回の研究では骨芽細胞分化において低酸素培養は有意な影響を与えなかった。幹細胞に適した生理的酸素分圧は1~2%といわれているが、本研究においては骨芽細胞分化の際に低酸素培養を行った細胞の有意な分化能の低下がみられたこと、2日間の低酸素刺激では有意な分化能の増強が認められなかったことより、長期の低酸素状態は分化能増強には不要だと考える。しかし、7日間低酸素培養下において脂肪細胞分化においては有意な分化能の増強を認めたことを考えると培養条件のさらなる検討をする必要がある。

また、NTAPPについては、乳歯歯髄由来細胞にNTAPPを20秒間3回照射すると、細胞増殖能が増強され過度な照射は不活化されることが明らかとなり、NTAPPが細胞活性化に有用であることが確認できた。今後はNTAPP照射による未分化能への影響等を検討していく予定である。

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

日本小児歯科学会 近畿地方会（予定）