

## 令和2年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	にしむら ゆうま 西村 祐真	学部 学科	歯学部歯学科	学年	4年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	今里 聡	所属	歯学研究科		
研究課題名	三次元細胞集合体成型システムを用いた人工骨髄組織の <i>in vitro</i> 創製				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

## 【緒言】

重篤な血液疾患の患者などに対して行われる造血幹細胞移植である骨髄移植に関しては、ソース不足や術後合併症など未だ多くの問題点がある。ソース不足の解消という点では、骨髄組織を人工的に作製することが考えられるが、未分化性を維持した状態で造血幹細胞を簡便に体外で長期間培養する手法は現存せず、生体外で構築した骨髄組織を移植治療に応用する再生医療技術は実現していない。

近年、本学歯学研究科歯科理工学教室において、温度応答性高分子ゲルを用いて細胞のみからなる凝集塊（細胞集合体）を作製する手法（細胞集合体成形システム）が確立された<sup>1,2)</sup>。このシステムを用いて作製された細胞集合体は、スキャフォールドを用いていないため自己組織化能を発揮することが可能であり、例えば、骨髄由来間葉系幹細胞（BMSC）を基材とする集合体を骨系分化誘導することで、生体骨組織と構造的、組成的に近似した人工骨様組織が *in vitro* で創製できることが明らかとなっている<sup>3,4)</sup>。そこで、この手法を用いて BMSC のみからなる集合体に血管網を導入することで、造血幹細胞ニッチを有する骨様組織を作製できるのではないかと着想した。本研究では、骨髄様組織の *in vitro* 構築に向けた基盤技術を確立するために、血管網のソースとして歯髄幹細胞（DPSC）に着目し、血管網を有する細胞集合体の作製を試みた。

## 【材料と方法】

## 1. ヒト由来細胞の血管内皮細胞分化誘導

## 1) 細胞培養

ヒト BMSC (Lonza) とヒト第三大臼歯由来歯髄幹細胞 (DPSC; Lonza) の通常培養には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 20% ウシ胎児血清と 1% Penicillin/Streptomycin を加えた培地を用いた。また、細胞の血管内皮細胞への分化誘導には、内皮細胞用培地である Endothelial Cell Growth Medium-2 for Microvascular Cells (EGM-2 MV; Lonza) に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, R&D Systems) を 50 ng/mL となるように添加した血管内皮細胞分化誘導培地 (EM) を用いた<sup>5)</sup>。

## 2) 血管内皮細胞への分化能の評価

BMSC および DPSC の血管内皮細胞への分化能を二次元、および三次元培養環境下で評価した。まず、BMSC あるいは DPSC を、500 cells/cm<sup>2</sup> となるように培養ディッシュに播種し、EM を用いて 37°C の湿潤環境下で培養した。培養 1、3、7、14 日後に細胞を回収し、Cells-to-CT Kits (Invitrogen) を用いて調製した試料について、血管内皮細胞分化マーカーである *VEGFA* と *C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL1)* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で定量評価した。

また、三次元培養系としてマトリゲル上で各細胞を培養し、血管内皮細胞への分化能を評価した。具体的には、マトリゲルを 24 well plate の各 well に 200 μL/cm<sup>2</sup> 注入し、37°C で 1 時間のゲル化反応後、各細胞を 0.5 x 10<sup>4</sup> cell/cm<sup>2</sup> ずつゲル上に播種した。細胞の培養には EM を用い、最長 14 日間の培養期間中、細胞の形態変化を光学顕微鏡で観察した。また、得られた光学顕微鏡像から画像解析ソフト (ImageJ) を用いて、細胞が形成した分枝の数および全長を評価した。

## 2. BMSC/DPSC 集合体の血管内皮細胞分化誘導

### 1) BMSC/DPSC 集合体の作製と分化誘導

BMSC の細胞懸濁液に DPSC を 5~20% の細胞数となるように混合し、この懸濁液から細胞集合体成形システムを応用することで直径 1.0 mm の BMSC/DPSC 集合体 (95/5~80/20) を作製した。また、BMSC のみで作製した集合体 (100/0) をコントロールとして用いた。作製直後を培養 0 日目とし、これら細胞集合体をシーソー型バイオリクター上で EM を用いて 20 日間培養することで試料とした。

### 2) BMSC/DPSC 集合体の内部構造観察

BMSC/DPSC 集合体内部における血管内皮細胞の分布を観察することを目的として、作製した試料を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋ブロックから薄切切片を作製し、血管内皮細胞分化マーカーである CD31 の免疫蛍光染色を行った。さらに、Hoechst33342 を用いた核染色を施し、蛍光顕微鏡で観察した。

BMSC/DPSC 集合体の内部構造を評価することを目的として、蛍光ビーズを用いたイメージング解析を行った。BMSC/DPSC 集合体の固定処理後、FITC 蛍光デキストランビーズ (150 kDa) を添加したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に 1 日間浸漬した。その後、BMSC/DPSC 集合体を PBS で洗浄し、外科用メスで作成した集合体のスライス片を蛍光顕微鏡で観察した。

## 【結果】

### 1. BMSC および DPSC の血管内皮細胞への分化能

#### 1) 二次元培養系

DPSC および BMSC を二次元培養系で分化誘導した結果、培養 7 日目以降の DPSC の *VEGFA* 発現量が BMSC と比較して有意に高いことが分かった。また、培養 7 日目以降の DPSC の *VEGFA* 発現量は、培養 3 日目までの DPSC の発現量と比較しても有意に高いことが明らかとなった。一方、BMSC における *VEGFA* 発現量は、培養期間を通じて有意な増減を示さなかった。*CXCL1* の発現量を検討したところ、*VEGFA* の結果と同様に、培養 7 日目以降に DPSC は BMSC よりも高い発現を示した。さらに、培養期間が増加するにつれて DPSC の *CXCL1* 発現量は増加傾向にあるものの、BMSC ではその発現量に変化はみられなかった (図 1 A,B)。

2) 三次元培養系

三次元培養系で各細胞の血管内皮細胞への分化能を評価した結果、DPSC は培養 3 日目で分枝状の形態変化を示し、培養 14 日目では毛細血管様の網目状構造を形成することが分かった (図 1 C)。一方、BMSC は 14 日間の分化誘導後も形態に変化はみられなかった。また、分枝の数および全長を計測したところ、培養 7 日目で分枝数が、培養 3 日目で分枝の全長が DPSC で有意に大きな値を示すことが分かった。

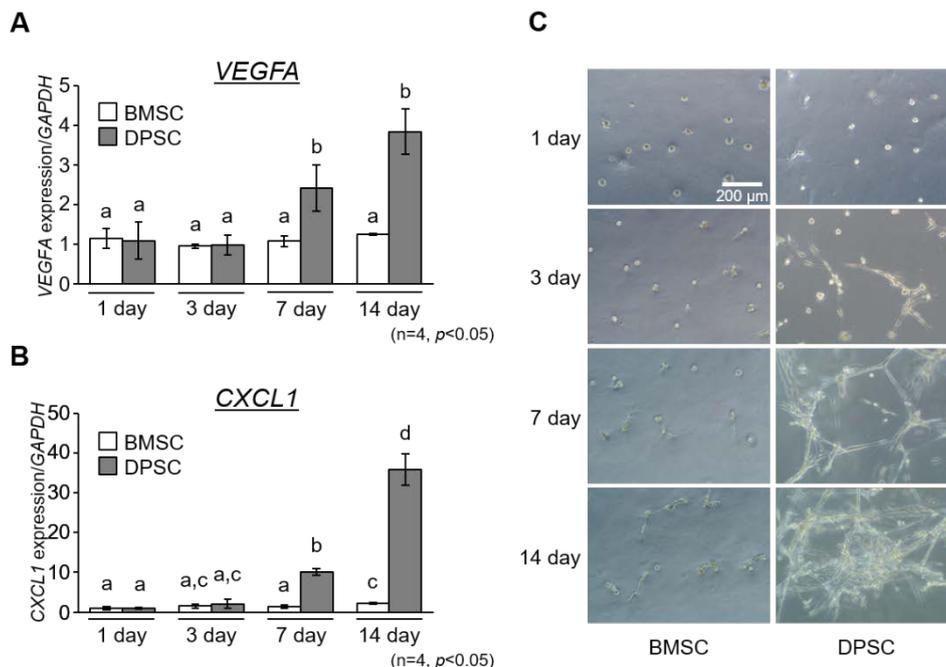


図 1. BMSC および DPSC の血管内皮細胞への分化能

A: VEGFA の mRNA 発現量

B: CXCL1 の mRNA 発現量

C: BMSC および DPSC のマトリゲル上での形態変化

2. BMSC/DPSC 集合体の内部構造評価

1) 免疫蛍光染色

培養直後 (day 0) の細胞集合体において、CD31 陽性の細胞は観察されず、いずれの試料においても核染色像のみの近似した像が観察された。一方、培養 20 日後の試料においては、DPSC の含有割合が増加するにつれて CD31 陽性細胞が多く存在すること、さらに、CD31 陽性細胞が細胞集合体内に均一に分布していることが分かった (図 2)。BMSC のみで構成される細胞集合体 (100/0) では CD31 陽性細胞がわずかしか存在しないことが分かった。

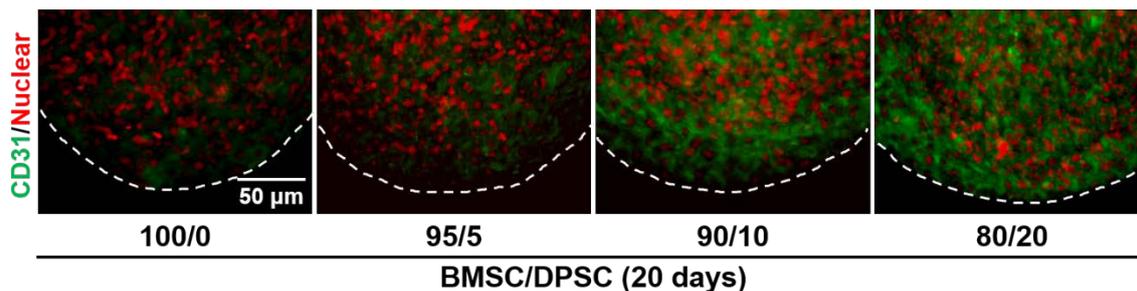


図 2. BMSC/DPSC 集合体の免疫蛍光染色像

## 2) 蛍光イメージング解析

細胞集合体に蛍光ビーズを浸潤させたところ、DPSC を含む集合体で管腔様構造が形成されていることが分かった。さらに、DPSC の割合を増加させると、集合体内に形成される管腔様構造が増加する傾向がみられた (図3 矢印)。一方、BMSC のみで作製した試料では、蛍光ビーズの集積が観察されず、培養 20 日後においても管腔様構造が形成されていないことが明らかとなった。

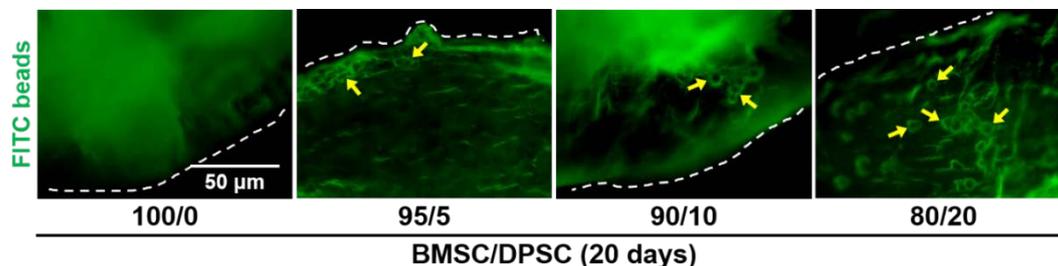


図3. BMSC/DPSC 集合体の蛍光イメージング解析

## 【考察】

BMSC と DPSC の血管内皮細胞への分化能を評価したところ、分化誘導後 7 日目で DPSC の血管内皮細胞分化マーカーの発現が促進されるが、BMSC ではこれらマーカーの発現が変化しないことが分かった。さらに、三次元培養系で評価したところ、DPSC はマトリゲル内に毛細血管様の構造を形成できることが明らかとなった。これらの結果から、本研究で用いた培養環境において、DPSC が BMSC と比較して血管内皮細胞に分化しやすいこと、さらに、DPSC が機能的な血管内皮細胞に分化できることが示唆された。

また、BMSC と DPSC を混合した細胞集合体を作製し、分化誘導環境下で培養したところ、集合体内部に CD31 陽性細胞が誘導されていることが分かった。一方、BMSC 集合体では CD31 陽性細胞がわずかしかなかった。このことから、集合体内部に存在する CD31 陽性の血管内皮細胞は DPSC 由来であると考えられた。さらに、蛍光イメージング解析で BMSC/DPSC 集合体の内部構造を観察したところ、管腔様構造が形成されていることが示された。これらの結果から、BMSC/DPSC 集合体内部で血管内皮細胞に分化した DPSC が毛細血管様の管腔様構造を形成したものと考えられた。

なお、本研究では、BMSC/DPSC 集合体を構成する BMSC の表現型は明らかになっておらず、BMSC が集合体内で骨形成能を発揮できるかについては今後の検討が必要である。

## 【結論】

本研究の結果、DPSC は BMSC と比較して血管内皮細胞への分化能が高く、この分化能の違いを応用することで毛細血管様の構造を有する細胞集合体を作製できることが明らかとなった。本研究で作製した BMSC/DPSC 集合体は、骨髄様組織の *in vitro* 創製に有用であると考えられる。

## 【参考文献】

1. Sasaki J, *et. al.* Fabrication of 3D cell constructs using temperature-responsive hydrogel. *Tissue Eng Part A* 16(8), 2497-2504, 2010.
2. Sasaki JI, *et. al.* Fabricating large-scale three-dimensional constructs with living cells by processing with syringe needles. *J Biomed Mater Res A* 107(4), 904-909, 2019.
3. Sasaki JI, *et. al.* *In vitro* reproduction of endochondral ossification using 3D mesenchymal stem cell construct. *Integr Biol* 4(10), 1207-1214, 2012.
4. Sasaki JI, *et. al.* Fabrication of biomimetic bone tissue using mesenchymal stem cell-derived three-dimensional constructs incorporating endothelial cells. *PLoS One* 10(6), e0129266, 2015.
5. Sasaki JI, *et. al.* VE-cadherin and anastomosis of blood vessels formed by dental stem cells. *J Dent Res* 99(4), 437-445, 2020.