

## 論 文 要 旨

区 分	甲・乙	氏名	田口 雅英	印
-----	-----	----	-------	---

## Creating 3D constructs with cranial neural crest-derived cell lines using a bio-3D printer

## 研究目的

剣山式バイオ3Dプリンターは、非接着培地を用いて形成したスフェロイドをマイクロニードルに刺しながら積み重ね、細胞から分泌される細胞外マトリックスによって大きな構造体を作製することを可能とする。人工足場を使用しないため、未分化な細胞を用いた場合、細胞の自発的な分化を観察できる可能性がある。本研究では、バイオ3Dプリンティング技術を用いて象牙質-歯髄複合体を模した3次元構造体を作製することを目的とした。

## 材料および方法

細胞：O9-1細胞（マウス第一鰓弓由来神経堤細胞株）。3次元構造体の作製：剣山式バイオ3Dプリンティングに適応可能なスフェロイド形成の条件決定を行い、KENZAN式バイオプリンター3次元構造体を作製をした。培地：幹細胞培地、EGM/FGM培地または石灰化誘導培地を使用した。遺伝子発現変化：Real time PCRを用いて細胞外マトリックス、Tenascin C (TnC)、Periostin、Type I collagen、骨芽/象牙芽細胞分化マーカー(Runx2, Osterix, ALP, DSPP, DMP1)の発現変化を2次元培養時と比較した。蛋白発現解析：免疫組織化学染色またはin situ hybridizationを用いて、スフェロイドおよび3次元構造体におけるKi67、TnC、DMP1の発現パターンを検討した。

## 結 果

幹細胞培地を用いて作製したスフェロイドは、EGM/FGM培地と比較して、Ki67陽性の細胞増殖層が外側に観察された。2次元培養時と比較してTnCとDMP1の遺伝子発現が有意に増加した。組織学的には、Ki67陽性層の内側にTnC、外側にDMP1の発現が観察された。バイオ3Dプリンターを用いて作製した3次元構造体は、スフェロイド体作製時と同じ幹細胞培地では、TnCの発現は認められたが細胞増殖活性は低下しており、さらにDMP1の発現がほとんど観察されなかった。しかし、石灰化誘導培地を用いた場合、構造体の外側に境界明瞭なKi67陽性細胞増殖領域が観察され、その内側にTnC、外側にDMP1の発現が確認された。TnCとDMP1の発現がKi67陽性領域を境にして重ならず発現しているパターンは、スフェロイド、3次元構造体の両方において共通していた。

## 考 察

細胞をスフェロイドとして3次元で培養することにより、TnCおよびDMP1といった細胞外マトリックスの分泌が上昇することが明らかとなった。また、これらは、極性を持って規則的に発現しており、それぞれの領域で細胞分化に影響を与えていると考えられた。また、剣山式バイオ3Dプリンターで作製した構造体においてもこの極性は維持されており、細胞増殖層の領域を合わせて考えると、TnC、Ki67、DMP1の3次元構造体における発現パターンは、歯乳頭から象牙質-歯髄複合体へと分化する過程での発現パターンと類似していると考えられた。本研究で作製した3次元構造体は、象牙質の形成メカニズムを解析するための有用なモデルとなる可能性が示唆された。

## 結 論

バイオ3Dプリンターを用いて作製した細胞由来の3次元構造体のTnCとDMP1発現解析を通して、この構造体、生体における象牙質-歯髄複合体に類似した構造体であることを示すことができた。