

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	堀部 宏茂
論文審査 委員氏名	主査 副査	栗田 賢一 戸苅 彰史 中村 洋	
論文題名	若齢と同様に高い血管新生能および歯髄再生能を有するヒト高齢歯髄幹細胞の分取		

インターネットの利用による公表用

間葉系幹細胞は生体恒常性維持および組織修復/再生に関与し、様々な疾病や外傷などの組織損傷に対しての治療応用に大きな役割を果たす。組織工学と再生医療に間葉系幹細胞を適用するためには、安定した細胞表現型を示す間葉系幹細胞分取や培養をおこなうことが重要である。さらに、間葉系幹細胞の老化が形質にどう影響を与えるかについても明らかにする必要がある。そこで今回、最近開発された遊走因子 (G-CSF) により遊走分離した高齢膜分取歯髄幹細胞の分子生物学的特性、安定性や再生能を若齢の膜分取歯髄幹細胞と比較検討した。

高齢者(44-70歳)および若齢者(21-30歳)の第3大臼歯を抜歯し、摘出した歯髄組織を 37°Cで1時間 0.04mg/ml リベラーゼ溶液で酵素消化して歯髄細胞を分離し、10%ヒト血清含有の DMEM 培地にて培養した。

膜分取歯髄幹細胞は上部構造 (セルカルチャー・インサート) を、下部構造 (24 well plate) に挿入した膜遊走分取器を用いた。この膜上部に、ヒト3代目歯髄細胞を 2×10^4 cells/100 μ l、播種し、下部構造体の 24 well 中に 10%ヒト血清および遊走因子 G-CSF (終濃度 100 ng/ml) 含有 DMEM を入れ、48 時間後に G-CSF を取り除き、10%ヒト血清を含む DMEM に培地交換した。分取効率は 24 well 下部に付着した細胞数を位相差顕微鏡下で測定し算出した。コントロールとして、ヒト3代目歯髄細胞を 1×10^3 cells/ml で 10%ヒト血清を含む DMEM 中で 10 cm dish に播種して、コロニーを形成させたものを、未分取歯髄幹細胞として用いた。

今回、幹細胞形質の比較として幹細胞表面マーカー発現、幹細胞マーカー、血管新生・神経栄養因子の mRNA 発現、多分化能、増殖能、遊走能および歯髄幹細胞培養上清の trophic 効果の比較を行った。高齢膜分取歯髄幹細胞は若齢膜分取歯髄幹細胞と同様に高い幹細胞形質を有していたが、未分取歯髄幹細胞は高齢では若齢と比較して CD105 および CXCR4 陽性率や血管誘導能、増殖能、血管誘導因子・神経栄養因子発現および培養上清の遊走促進能、免疫調整能や抗アポトーシス効果が劣っていた。以上の結果より、膜分取法により、年齢にかかわらず形質の優れた幹細胞を分取できることが示唆された。

つぎにマウス下肢虚血モデルおよびマウス異所性歯根移植モデルを用いて in vivo において歯髄幹細胞移植による血管新生能と歯髄再生能の比較を行った。高齢膜分取歯髄幹細胞は若齢膜分取歯髄幹細胞と同様に in vivo において高い血管新生能および歯髄再生能を有していたが、未分取歯髄幹細胞は高齢では若齢と比較して血管新生能および歯髄再生能が低かった。これは、高齢膜分取歯髄幹細胞は若齢と trophic 効果が変わらないため、高齢と若齢歯髄幹細胞の in vivo の再生能に差がみられなかったものと示唆される。

さらに増幅に伴う歯髄幹細胞の形質安定性を比較するため、老化マーカー (SA- β -gal) 染色、細胞老化誘導因子の発現やテロメラーゼ活性、テロメア長の測定を行った。高齢膜分取歯髄幹細胞は若齢膜分取歯髄幹細胞と同

様に長期継代培養による老化マーカー、老化誘導因子発現の抑制、またテロメラーゼ活性やテロメア長の低下がみられず維持されていた。以上のことから、膜分取歯髄幹細胞はより幹細胞を効率よく分取するため前駆細胞が少なく、老化しにくいと考えられる。

60歳以上の人割合は先進国で急速に増加しており、高齢者のための幹細胞治療の革新的な戦略は、このような”超高齢化社会”において優先順位が高い。高齢膜分取歯髄幹細胞が幹細胞形質の維持、再生能および老化の抑制について高齢未分取歯髄幹細胞より優れていることは、膜分取歯髄幹細胞が自家細胞移植の臨床応用で特に高齢の患者において有用であることが明らかになった。このことは本研究が口腔外科学、歯科保存学、歯科薬理学ならびに関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。