

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

林 勇輝

論文題目

歯髄・骨髄・脂肪由来幹細胞培養上清の再生能比較  
による再生誘導因子の検索

## I. 緒言

間葉系幹細胞(MSC)治療は多くの疾患への新たな治療法として期待されており、350を超える臨床試験が開始されている。MSC移植の有効性は知られているが、そのメカニズムの詳細は明らかにはされていない。また移植されたMSCの運命は細胞接触と可溶性因子によって調整される微小環境によって決定されると言われている。そのため効果的な細胞治療のためには、生体内の微小環境を明らかにし、移植細胞の運命決定を調節することが重要であると言える。

申請者らは以前、同一個体由来の歯髄・骨髄・脂肪由来MSCであるCD31<sup>-</sup>side population (SP)細胞を脳梗塞、下肢虚血、抜髄根管または異所性歯根移植による歯髄再生モデルに移植したところ、組織再生量は歯髄CD31<sup>-</sup>SP細胞の移植で最も多かったが、全ての再生組織は質的に同様であり、移植した幹細胞の由来組織には依存していないと報告した。

また、移植細胞はそれ自身が部位特異的な細胞に直接分化するのではなく、移植された宿主の微小環境に応じて、分泌するTrophic factorの種類や濃度を変えることで再生の促進に寄与していると報告されている。

細胞によって分泌されたTrophic factorは培養上清中に集積しており、その治癒効果は腎臓や肝臓、肺の損傷あるいは心臓、脳虚血さらに骨欠損や歯周疾患、創傷治癒などの疾患モデルにて検討されている。その結果、

治癒・再生促進能として増殖促進能、遊走促進能、抗アポトーシス能、抗炎症能、血管新生能、神経再生・保護能の関連が報告されている。

このように、上清の持つ再生に対する有益な効果は報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。加えて、同一個体において、同様の条件下で細胞分離・培養した多組織 MSC に由来する培養上清の再生能を比較検討した報告はない。また、その際、安定して一定の微小環境を供給できるため、異所性歯根移植モデルは多組織幹細胞由来培養上清の再生能の比較に有用であると考えられる。

申請者らはこれまで異所性歯根移植モデルにおいて、骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup> SP 細胞を移植した場合と比較して歯髄 CD31<sup>+</sup> SP 細胞を移植した場合が最も高い血管新生、再生能を示すことを明らかとしている。さらに、*in vitro* において、歯髄上清は骨髄、脂肪上清より高い Tropic 効果を有すことを明らかとしている。

そこで本研究では、歯髄再生の詳細なメカニズムを検討するために、異所性歯根移植モデルを用い、同一個体由来の歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup> SP 細胞より回収した上清の歯髄/象牙質再生能、血管新生促進能、増殖促進能、周囲細胞に対する遊走促進能、抗アポトーシス能を比較した。さらに遺伝子解析から歯髄/象牙質再生能に関与する因子の候補を挙げ、そのレセプターも含め、免疫組織学的あるいは分子生物学的に解析した。

## II. 材料および方法

全ての動物実験は愛知学院大学歯学部および国立長寿医療研究センターの動物実験指針に基づいて、動物実験倫理委員会の承認（承認番号：AGUD156）を得て行われた。

## 1. ブタ歯髄・骨髄・脂肪幹細胞分取と上清調整

ブタ歯髄・骨髄・脂肪 CD31-SP 細胞は同一個体の下顎骨より分取し、50%コンフルエントの状態にて無血清培地に変え、24 時間後、培養上清(CM)として回収した。

## 2. マウス異所性歯根移植モデルにおける再生組織解析

ブタの下顎側切歯より作成した移植片に最終濃度 5 µg/ml 歯髄・骨髄・脂肪CMまたは  $1 \times 10^6$ 個の歯髄CD31-SP細胞をコラーゲンTEと混合して注入し、5 週齢SCIDマウスに皮下移植した。

移植片は固定、脱灰の後、5 µmのパラフィン切片とした。

それぞれの再生組織をHE染色後、形態学的に解析した。再生歯髄における細胞密度は、核染色によって解析した。血管新生能は、RECA1を用いた免疫染色によって解析した。

再生組織が歯髄であると証明するために、歯髄マーカーである *TRH-DE* を *in situ hybridization*にて確認した。次いで、Western blotを行い、そのタンパク発現を確認した。さらに、再生組織における歯髄マーカー *TRH-DE* および *Syndecan 3* を real-time RT PCRで解析した。

さらに、歯髄の形態学的特徴である象牙芽細胞は、*enamelysin*に対する *in situ hybridization* によって解析した。

再生組織内のTrophic効果である基質形成能、増殖促進能、周囲組織由来細胞に対する遊走促進能および抗アポトーシス能はそれぞれに対応するマーカーによる免疫染色によって解析した。

### 3. 歯髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞中の高発現遺伝子解析

マイクロアレイ解析において、歯髄再生能に関与する Trophic factor を同定した。また同定された 9 因子である *CXCL14*、*G-CSF*、*BDNF*、*NPY*、*IL1 $\alpha$* 、*IL6*、*IL8*、*IL16*、および *MCP1* に対し、real time RT-PCR を行った。

### 4. Trophic factor およびそのレセプターの発現解析

歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞において、MCP1、CXCL14、IL6 のタンパク発現を Western blot にて解析した。

CXCL14 の遊走能、MCP1 の血管新生能、IL6 の抗アポトーシス能をそれぞれ関連マーカーとの免疫二重染色によって解析した。さらに、CXCL14 および MCP1 のレセプターである *CXCR4*、*CCR2* の mRNA 発現を real-time RT-PCR によって解析した。

### 5. 遊走細胞に対する免疫組織学的、分子生物学的解析

周囲組織からの遊走細胞における *CCR 2* あるいは *CXCR 4* の発現を確認するために、BrdU で免疫染色を行い、さらにそれぞれのプローブによる *in situ hybridization* を行った。

## 6. MCP1、CXCL14、IL6 の Trophic 効果解析

遊走促進能の解析には、C2C12 に対し CXCL14 あるいは MCP 1 を添加し、TAXIScan-FL を用いた。血管分化促進能の解析には、CXCL14 および MCP 1 を添加した HUVEC を 14 日間培養した後、VE-cadherin を用いた免疫染色を行った。抗アポトーシスを比較するために、C2C12 に対し IL 6 を添加し、アポトーシス細胞を標識した後フローサイトメトリーにて測定した。

## 7. 統計学的解析

データは平均±標準偏差で表した。統計処理は一元配置分散分析および Tukey 法により多重比較にて行った。

### III. 結果および考察

#### 1. 上清移植による歯髄再生能

歯髄・骨髄・脂肪上清のいずれを移植した場合でも形態学的に同様の特徴を示し、幹細胞を移植した場合と同様に歯髄マーカー TRH-DE の発現を認める歯髄組織が再生した。移植歯の周囲組織において BrdU で標識された細胞は全ての移植後再生組織で認められ、宿主の細胞が遊走していることが明らかとなった。これらの結果は、いずれの組織由来の上清を移植し

た場合であっても、遊走してきた宿主の細胞が移植歯内部の微小環境に反応して歯髄組織は再生していることを強く示唆している。しかし歯髄上清を移植した場合、他の上清を移植した場合と比べ、再生量、細胞密度、血管新生密度の高い組織を再生する。つまり、歯髄・骨髄・脂肪上清の再生能の差は、含まれている Trophic factor の持つ遊走促進能、抗アポトーシス能および血管新生促進能によって生じていることが示唆された。

## 2. 再生歯髄における Trophic factor とそのレセプターの発現

マイクロアレイにおいて、間葉系幹細胞の再生能に関与する候補因子を絞り込んだところ、骨髄・脂肪と比べ歯髄で高く発現している因子は9種類挙げられ、さらにその内、*CXCL14*、*IL6*、*IL16*、*MCP1*、*NPY*が real-time RT-PCR においても遺伝子高発現を示していた。加えて、Western blot にて解析したところ、タンパク高発現まで認められるのは *CXCL14*、*MCP1*、*IL6* のみであった。

## 3. *CXCL14*、*MCP1*、*IL6*の Trophic 効果

本研究では *in vitro* において、歯髄 *CD31*<sup>+</sup>*SP* 細胞は *CXCL14*、*MCP1*、*IL6* を高発現していることを明らかにした。組織内でそれらの Trophic factor は移植した細胞において発現しており、周囲組織からの遊走細胞、内部で増殖・分化した細胞には認められなかった。一方、レセプターである *CXCR4* または *CCR2* の発現は遊走細胞に認められた。また *in vitro* において、*CXCL14* の添加により遊走能を、*MCP1* の添加により血管新生能を、*IL6*

の添加により抗アポトーシス能を認め、さらに上清をそれぞれの抗体にて中和すると、上清のもつ各Trophic効果は有意に抑制されることが明らかとなった。

#### 1) CXCL14のTrophic効果

CXCL14は、CXCケモカインの一つとして知られ、様々な種類の間葉系幹細胞の遊走に重要な役割を果たしているCXCL12のレセプターであるCXCR4に対し高親和性を示し、CXCL12と互いに作用しあっていると報告されている。また、CXCL14は移植細胞が発現しており、BrdU陽性の遊走細胞はCXCR4を発現しているという結果、さらに、*in vitro*における各上清のC2C12への添加実験と*in vivo*におけるPCNAの免疫染色により増殖促進能に差を生じないという結果から、移植細胞により再生組織中に分泌されたCXCL14が、周囲のCXCR4陽性細胞を遊走させるTrophic効果を有することが示唆され、その作用が細胞密度と再生量に影響を与えていることが考えられた。

#### 2) MCP1のTrophic効果

MCP1はC-Cケモカインの一つであり、2次的な血管新生因子発現の調節によって、血管新生能に影響する因子であると報告されており、血管新生療法薬として期待されている。MCP1は移植細胞が発現しており、再生組織中では歯髄動脈あるいは静脈と近い径の血管周囲に多く見られ、BrdU陽性の遊走細胞は発現しておらず、レセプターであるCCR2を発現してい



た。これらの結果は、MCP 1 が CCR 2 を通じた、血管内皮細胞の遊走と血管の成熟により血管新生に関与する Trophic 効果を有することを示唆している。

### 3) IL6 のTrophic効果

抗アポトーシス作用にはチロシンリン酸化されたSTAT3が大きく起因していることが知られているが、IL6はJAK/STAT3経路を調整し、Bcl-2の発現を誘導してアポトーシスと増殖のバランスを変えることが報告されている。今回の組織評価においてIL6陽性細胞数が多ければ、Caspase3陽性細胞は少なく、逆の相関を示すことを明らかとした。また、C2C12における抗アポトーシス能が示され、再生歯髄において、上清中または再生組織内で分泌されたIL6はアポトーシス抑制のTrophic効果を示すことを示唆している。

## IV. 結論

以上より、歯髄再生メカニズムには遊走促進能、血管新生促進能および抗アポトーシス能が関与しており、それぞれに関わるTrophic factorの候補にはCXCL14、MCP 1、IL6が挙げられることが明らかとなった。