

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	林 勇輝
論文審査 委員氏名	主査	福田 理	
	副査	前田 初彦	
		中田 和彦	
論文題名	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		

インターネットの利用による公表用

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、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いわれており、効果的な細胞治療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。

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⁻ 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、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ことを報告している。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たTrophic factorを分泌す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、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。

そこで本研究では、歯髄再生の詳細なメカニズムを明らかにするため、異所性歯根移植モデルを用い、歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清の歯髄/象牙質再生能およびそのTrophic 効果を比較し、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、以下の結果が明らかになったとしている。

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を明らかにしている。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に比べ、再生量、細胞密度、血管新生密度の高い組織を再生しており、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るとしている。

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のうち骨髄・脂肪と比べ歯髄で高く発現している因子を9種類挙げられ、さらにその内、*CXCL14*、*IL6*、*IL16*、*MCP1*、*NPY*がreal-time RT-PCRにおいても遺伝子の高発現を示し、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*のみであったとしている。

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、MCP1がCCR2を通して血管内皮細胞の遊走と血管の成熟などの血管新生に関与するTrophic効果を発現することを示唆している。

IL6陽性細胞数は、Caspase3陽性細胞数と逆の相関を示し、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。

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を明らかにしている。

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、各々に関わるTrophic factorの候補にはCXCL14、MCP1、IL6が挙げられると結論付けている。

(論文審査の要旨)

No.4.....

(2000字以内のこと)

愛知学院大学

本研究は、歯髄再生に関する新たな知見を与えるものであり、小児歯科学のみならず歯科保存学、口腔病理学ならびに関連諸学科に寄与するところが大きいと考えられ、博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。

平成27年1月28日