

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

中山 英典

論文題目

若齡根未完成智歯由来膜分取歯髓幹細胞の形質評価

I. 緒言

再生医療の発展は目覚ましく、幹細胞に関する基礎研究が盛んに行われており、中でも、間葉系幹細胞を用いた治験は数多く行われている。

幹細胞治療に使われる細胞は、使用する細胞分画によって細胞治療の有効性に影響を及ぼすことが分かっている。そのため申請者の所属する研究室ではこれまで、幹細胞治療における適切な細胞源の分取法の検索を、歯髄再生モデルを用いて行い、G-CSFにより歯髄幹細胞を遊走させ分取する膜遊走分取法を開発した。これは他の細胞分画分取法に比べ安全で費用対効果が高く、膜遊走分取法によりヒト若齢および高齢の歯根完成歯から分取した膜分取歯髄幹細胞を、コロニー形成法による従来の歯髄幹細胞と比較したところ、血管・神経栄養因子の発現、遊走能、抗アポトーシス能、免疫調整能、血管新生・神経突起伸長作用に優れており、歯髄再生を促進することが明らかとなった。

一方で、ヒト若齢根未完成歯は広い歯髄腔を有し、多くの歯髄幹細胞を分離することができる。また、根未完成歯由来の歯髄幹細胞は根完成歯に比べて、短時間で倍化することが可能であり高い増殖能を有することに加え、骨・象牙質分化能が高いことが報告されている。これらの報告は、根未完成歯由来の歯髄幹細胞は根完成歯由来のそれよりも優れた細胞源であり、分取の必要がないことを示唆しているかもしれないが、若齢根未完成歯由来の歯髄幹細胞における分画分取の必要性は検討されていない。そこ

で、簡便な分取法である膜遊走分取法を用いることによって、若齡根未完成歯より膜分取歯髓幹細胞を分取し、コロニー形成法による歯髓幹細胞と比較し、分取の必要性和膜遊走分取法の有用性を明らかにすることを目的に本研究を行った。

II. 材料および方法

1. 若齡根未完成智歯より歯髓幹細胞分取

本研究は愛知学院大学の倫理委員会の承認を得て行った。患者および保護者より書面にて同意を得た後に、根未完成第三大臼歯の抜歯を行った(14-19歳、n=4)。歯髓組織を摘出後、37°Cで1時間0.04mg/mlリベラーゼ溶液にて酵素消化して歯髓幹細胞を分離し、10%ヒト血清含有DMEM培地に播種した。コロニーを形成させた歯髓幹細胞は70%コンフルエント後にトリプルセレクトを用いて継代した。膜分取歯髓幹細胞は、膜遊走分取器を用い分取した。

2. 各種細胞表面マーカー発現

膜分取した上記歯髓幹細胞を継代増幅後、幹細胞表面抗原マーカー発現率の比較を行った。膜分取歯髓幹細胞はCD105、CXCR4およびG-CSFRにてラベルし、フローサイトメーターFACSAria IIを用いてそれぞれ解析を行った。コントロールとして、コロニー形成法による未分取歯髓幹細胞を用いた。

3. 遊走能比較

膜分取歯髄幹細胞および歯髄幹細胞の遊走能を比較するため、real time 水平化学走化性分析を TAXIScan-FL を用いて測定した。すなわち、6 μ m の孔のあいた silicon およびガラスプレートの中に、細胞の大きさに最適化されたチャンネルを形成し、各チャンネルの一端に細胞を注入し、10ng/ μ l の G-CSF を 1 μ l ずつ、一定濃度勾配を形成させるように反対側に入れた。遊走の video 画像から、3 時間ごとの遊走細胞数を 24 時間まで計測した。

4. Real-time RT-PCR による mRNA 発現の比較

それぞれの細胞の幹細胞マーカー、血管誘導・神経栄養因子 mRNA 発現を検討するため、の real-time RT-PCR を Light Cycler にて行った。幹細胞マーカーとして、*Nanog*、*Sox2*、*Rex1*、*Stat3* および *CXCR-4*、血管誘導・神経栄養因子として、*GM-CSF*、*MMP-3*、*VEGF*、*BDNF*、*GDNF* および *NGF* のプライマーを用い、 *β -actin* で標準化した。

5. 多分化能の比較

膜分取歯髄幹細胞および未分取歯髄幹細胞の多分化能（血管誘導能・神経誘導能）を比較した。血管誘導能の比較として、細胞を EGM2 に懸濁し、24well プレートに注入した matrigel 上に播種し、誘導後 5 時間で形成された脈管構造を、倒立顕微鏡を用いて観察、測定した。神経誘導の比較として、それぞれの細胞を NPMTM BulletKitTM 培地中で 35mm ディッシュに播種し 14 日間誘導後、形成した浮遊細胞塊(neurosphere)を倒立顕微鏡にて観察し、

その直径を測定比較した。その後、細胞塊は単細胞に分離した後、調製した誘導培地にて神経突起伸長させ、anti-neurofilament 抗体を用いて免疫染色し観察した。また、神経誘導能を分子生物学的に解析するため、神経誘導マーカーである *neurofilament*、*neuromodulin* および *SCN1 α* のプライマーを用いて mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。

6. 膜分取歯髄幹細胞の培養上清の trophic 効果

膜分取歯髄幹細胞および未分取歯髄幹細胞を、60%コンフルエントの状態にして無血清培地に変え、24 時間後に培養上清を回収した。その上清を約 40 倍に濃縮し、培養上清の増殖促進作用および遊走促進作用を比較した。増殖促進作用は、NIH3T3 細胞に培養上清を終濃度 5 μ g/ml で添加し、Cell counting kit-8 を用いて、450nm の吸光度をプレートリーダーにて経時的に測定した。遊走促進作用に関しては、NIH3T3 細胞を、終濃度 5 μ g/ml の培養上清で遊走させ、上記と同様に TAXIScan-FL で測定した。

抗アポトーシス効果は、Caspase-3 活性測定により比較した。すなわち、NIH3T3 細胞を staurosporine および 5 μ g/ml の培養上清とともに 3 時間培養した後回収し、APOPCYTO™ Caspase-3 Colorimetric Assay Kit を用いて Caspase-3 活性を測定した。

7. *in vitro* における培養上清の血管内皮細胞分化と神経突起伸長作用

培養上清の血管内皮細胞分化誘導能および神経突起伸長作用を、膜分取歯髄幹細胞および未分取歯髄幹細胞で比較した。血管内皮細胞分化誘導に

関しては、ヒト臍帯静脈内皮細胞をそれぞれの培養上清を用い 14 日間誘導し、anti- VE-cadherin/CD144 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察、陽性率を算出した。神経突起伸長作用は、ヒト神経芽細胞腫細胞株 TGW を用い、それぞれの培養上清または GDNF を添加し、20 時間後の神経突起伸長を倒立顕微鏡にて観察、測定した。

8. マウス異所性歯根移植モデルにおける歯髄再生および血管新生

膜分取歯髄幹細胞および未分取歯髄幹細胞を、調製したブタ歯根の根管内にコラーゲンとともに注入し、5 週齢の SCID マウスの皮下に移植した。4 週間後にサンプルを摘出し、通法に従い 5 μ m のパラフィン切片を作成し、HE 染色後、再生歯髄面積の比率を計算し、再生組織量を検討した。また、5 μ m のパラフィン切片を BS-1 Lectin にて免疫染色し、蛍光顕微鏡にて血管新生密度を算出した。

III. 結果・考察

本研究では、G-CSF による遊走を用いた膜遊走分取法の有効性、根未完成歯由来歯髄幹細胞において検討し、以下の結果を得た。

1) 根未完成歯由来膜分取歯髄幹細胞の幹細胞性を、未分取歯髄幹細胞と比較したところ、CD105 陽性細胞は両者に差を認めなかった。一方で、膜分取歯髄幹細胞の CXCR-4 および G-CSFR 陽性率については未分取と比べて有意に高かった。膜分取歯髄幹細胞はまた、未分取に比べ幹細胞マーカー

である CXCR-4、Stat3、Rex1、Sox2 および Nanog の高い mRNA 発現がみられ、血管誘導因子・神経栄養因子 mRNA 発現においても高い発現を認めた。

さらに、膜分取歯髄幹細胞は未分取に比べ高い遊走能を示し、分化誘導においても高い血管誘導能および神経誘導能を示した。これらの結果より、若齢根未完成歯由来の歯髄幹細胞においても、膜遊走分取法による細胞分画分取が有効であり、形質の優れた幹細胞を分取出ることが示唆された。

2) *in vitro* における培養上清の Trophic 効果についての検討では、膜分取歯髄幹細胞の培養上清を添加することにより、未分取に比べ、NIH3T3 細胞の細胞増殖および細胞遊走を促進した。膜分取歯髄幹細胞の培養上清はまた、staurosporine 処理した NIH3T3 細胞の caspase-3 活性を有意に減少させた。

さらに、膜分取歯髄幹細胞の培養上清添加により、血管内皮分化促進作用および神経突起伸長作用を有していた。これらの結果より、膜分取歯髄幹細胞の分泌物はより効果的な他の細胞に対する trophic 効果を有することが示唆された。

3) 異所性歯根移植における歯髄再生では、統計学的検討により、根管全体に対する再生歯髄の割合は、膜分取歯髄幹細胞移植群において有意に大きかった。細胞密度および血管形成に関しても、膜分取歯髄幹細胞移植群において未分取に比べ有意に高かった。これらの結果より、膜分取歯髄幹細胞は未分取よりも、高い歯髄再生能と血管新生能を有することが示された。

V. まとめ

本研究では若齡根未完成智齒由来齒髓幹細胞より、膜遊走分取法を用いて分取した膜分取齒髓幹細胞および未分取齒髓幹細胞の比較を行い、幹細胞治療における有用性を検討した。若齡根未完成齒由来の膜分取齒髓幹細胞は未分取と比べて、ホーミング効果に関わる有用な細胞表面マーカー発現および遊走能を有し、加えて多くの trophic 因子の分泌が明らかとなり、幹細胞治療における有用性が示唆された。