

論文の内容の要旨

氏名：佐藤 桃子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：過剰歯歯髄由来間葉系細胞の特性

間葉系幹細胞（MSCs）は自己複製能および多分化能を有し、近年では臨床応用に向けた様々な研究が行われている。象牙質再生能を持つことが明らかとなっている歯髄は、抜歯された歯から比較的容易に採取できることから、MSCsの細胞源として期待されている。歯髄由来の間葉系幹細胞は、骨髄由来のMSCsと比較して、高いコロニー形成能、増殖能および多分化能を有することが報告されている。歯髄由来のMSCsは永久歯および乳歯において同定されたが、近年、過剰歯の歯髄にもMSCsが存在すること明らかとなった。

過剰歯とは通常の本数以上に存在する歯の総称であり、乳歯列における出現頻度は0.2-0.8%、永久歯列での出現頻度は0.5-5.3%とされている。最も高頻度で出現する部位は上顎の正中部であり、正中過剰歯とよばれる。正中過剰歯の出現頻度は0.15-1.9%であり、女性よりも男性に高い頻度で現れる。過剰歯は、歯列不正の原因となることが多いため、抜歯による治療が第一選択となる。過剰歯は、MSCsの細胞源として有用と考えられるが、過剰歯の歯髄由来MSCsの特性に関する報告はきわめて少ない。

そこで本研究では、日本大学歯学部付属歯科病院小児歯科にて抜歯した上顎正中過剰歯10歯（5～8歳）を対象として、表面抗原、コロニー形成能、細胞増殖能、未分化マーカーの発現および分化能について解析することで過剰歯の歯髄に存在するMSCsの特性を検討した。

抜歯した正中過剰歯のセメント-エナメル境部にディスクで0.5-1.0 mm程の深さの溝をいれた後、ノミを用いて歯を分割し無菌的に歯髄を採取した。単離後、外科用メスにより約1 mmの大きさに細断し、歯髄片を培養用皿に静置した。外生した細胞を継代培養し、第2～4継代目の細胞を本研究に用いた。表面抗原の発現では、細胞の表面抗原型を解析するために培養細胞を蛍光プローブで標識しフローサイトメーターで蛍光標識された細胞の割合を調べた。コロニー形成能は、培養細胞を播種し、9日間培養を行ったのちトルイジンブルー染色液で染色後、染色されたコロニー数を計測して検討した。細胞増殖能は、血球算定板での細胞数計測による方法およびフローサイトメーターでの細胞周期解析により検討した。RT-PCR解析では、未分化マーカーであるc-Myc, Sox2, Nanog, Oct4, Klf4, およびRex1の遺伝子発現を調べた。また、過剰歯由来歯髄細胞の分化能を評価するために、骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導実験を行った。骨芽細胞への分化能はALP染色、石灰化noduleのアリザリン赤染色およびnodule中のカルシウム定量にて、また脂肪細胞への分化能はオイルレッドO染色で評価した。

これら一連の観察や実験的検討により、次のような結果が得られた。

1. 本研究で用いた過剰歯10歯中9歯が上顎正中部に存在した逆生の埋伏過剰歯であり、1歯が上顎乳歯列正中部に存在した順生歯であった。過剰歯の形態は円錐状が6歯、犬歯様が4歯であった。
2. FACSを用いた細胞表面抗原のフローサイトメトリ解析では、MSCsに共通のマーカーであるCD13, CD44, CD73, CD90, CD105およびCD146が高い発現を示した。一方、MSCsに共通のマーカーの中でCD271, STRO-1そしてSSEA4の発現は低かった。
3. コロニー形成が認められた培養9日目において、10歯すべてでコロニー形成が認められた。最初に播種した100細胞から形成されたコロニーの比率は、 $46.6 \pm 5.1\%$ であった。
4. 細胞増殖能では、培養細胞を播種後2日目、4日目および6日目において細胞数はそれぞれ約2倍に増加し、6日目から8日目にかけては、約5倍の増加が認められた。10日から12日目においては細胞数の増加は認められなかった。また、細胞周期の解析において、DNA合成期のS期における細胞の割合は19.4%を示し、細胞分裂期であるG2/M期における12.0%と比較して高い傾向を示した。
5. RT-PCR解析においては未分化マーカー（c-Myc, Sox2, Nanog, Oct4, Klf4, Rex1）の発現が認められた。
6. 骨芽細胞への分化誘導実験では、アルカリホスファターゼ活性が21日間の培養の過程で上昇していることが確認された。また、骨芽細胞誘導培地では培養21日目にアリザリン赤陽性の石灰化noduleが観察されたが、増殖培地では観察されなかった。骨芽細胞誘導培地で培養した細胞群は、Ca沈着量が

コントロール群と比較して有意に高値を示した。脂肪細胞誘導培地で培養した細胞では、培養 46 日目にオイルレッド O 陽性細胞が観察された。しかし、陽性細胞数は 1 培養ディッシュあたり 1~2 個であった。

以上より、正中過剰歯髄由来の間葉系細胞群には、硬組織形成細胞に分化しうる MSCs が含まれると示唆された。