

論文の内容の要旨

氏名：鳥海 拓

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Mesenchymal progenitor cells in the root pulp of human primary teeth

（ヒト乳歯の歯根部歯髄間葉系細胞に関する研究）

ヒトの歯は、乳歯脱落后に代生歯が後継永久歯として萌出する二生歯性である。脱落した乳歯の歯冠には象牙質に囲まれた歯髄が残存しており、近年の研究では、こうした歯髄に乳歯歯髄の幹細胞としての間葉系幹細胞(MSCs)の存在が報告されている。乳歯の歯髄幹細胞は永久歯の歯髄幹細胞と比較して、高い細胞増殖能、分化能、さらにはOCT3/4, SOX2, NANOGおよびREX1など、胚性幹細胞(ESCs)マーカーの高発現がみられる。歯はしばしば歯冠部と歯根部に分けて論じられるが、歯髄細胞はどちらの部位においても神経堤細胞に由来すると考えられ、組織学的に両者を識別することは一般に困難である。しかし、最近の研究報告では、ブタ第三大臼歯の歯根形成期における歯髄間葉系細胞は、象牙質タンパクの発現と組織形成能の点において、歯冠部と歯根部とで特性が異なるとされ、また、ヒト過剰歯の歯髄間葉系細胞では、歯冠部と歯根部のMSCsマーカーであるCD105の発現パターンが異なるとも報告されている。そこで本研究は、未だ報告のない乳歯歯根部の歯髄間葉系細胞（歯根細胞）について、乳歯歯冠部の歯髄間葉系細胞（歯冠細胞）と比較検討することで、その細胞学的特性およびiPS細胞樹立効率の差異を明らかにすることを目的とした。

日本大学歯学部付属歯科病院小児歯科で矯正治療上の必要性から抜歯された歯根吸収を伴わない乳歯を歯冠部と歯根部に分割し、歯冠細胞と歯根細胞を得た。これらを外植体として培養し、外生した細胞を2～5代まで継代し、本実験に供した。歯冠細胞および歯根細胞の細胞学的特性の解析は、まず1)フローサイトメトリーによって、CD105, CD146, SSEA-4およびSTRO-1についての細胞表面抗原解析を行った。続いて、2)PCRおよびReal Time-PCRによって、ESCsマーカーであるNANOG, REX1, OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYCの遺伝子発現とこれらの一部についての定量的解析を行った。さらに、3)細胞増殖能に関する一連の検討、すなわち、コロニー形成能の検討、増殖細胞数の計測、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、および、Real Time-PCRによる細胞周期関連遺伝子の発現解析を行った。一方、分化能の評価は、骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導実験で行った。4)骨芽細胞分化は、アルカリホスファターゼ(ALP)染色、ALP活性の測定および石灰化noduleのアリザリンレッド染色で評価し、5)脂肪細胞分化はオイルレッドO染色により評価した。歯冠細胞および歯根細胞からのiPS細胞樹立は、6)OCT3/4, SOX2, KLF4およびc-MYCを導入した細胞が産生する4因子とc-MYCを除いた3因子を用いた。これらを培養下の歯冠細胞および歯根細胞に感染させ、4因子導入例で30日目、3因子導入例で35日目に、6a)iPS細胞の樹立効率(播種細胞数に対してのALP陽性コロニー数の割合)を求めた。また、コロニーから継代培養したクローンを用い、樹立されたiPS細胞の確認同定と特性解析を行った。すなわち、6b)位相差顕微鏡によるコロニー形態の評価、6c)ALP染色性の検討、6d)蛍光抗体法によるSSEA-4, TRA-1-60およびTRA-1-81染色性の検討、6e)PCRによるNANOG, REX1, OCT3/4, SOX2, KLF4およびc-MYCの発現解析、6f)樹立細胞の核型と脱メチル化の解析、および、6g)樹立細胞のマウス精巣への移植によるin vivo奇形腫形成能の評価を行った。

以上の実験により、乳歯歯髄由来の歯冠細胞と歯根細胞について、以下のような細胞学的特性(1-5)が示され、また、これらから樹立されたiPS細胞の樹立効率の差異や細胞特性(6a-g)も明らかとなった。

1. 歯冠細胞と歯根細胞はいずれもCD105とCD146の発現が高かったが、STRO-1とSSEA-4の発現は低かった。
2. 歯冠細胞と歯根細胞ではいずれも、KLF4とc-MYCの発現を認めたが、NANOG, REX1, OCT3/4, SOX2の発現は認めなかった。また、歯根細胞のKLF4発現は歯冠細胞より約2倍高かったが、c-MYCの発現は同程度

度であった。

3. 歯根細胞のコロニー形成能は歯冠細胞より約 2.4 倍高かった。歯根細胞の培養 6, 10 日目の増殖細胞数は歯冠細胞より有意に大きかった。また、培養 7 日目において、S 期および G2+M 期にある歯根細胞の割合は歯冠細胞より高い傾向があった。歯根細胞では、細胞周期の進行に関連する ABL1, MCM7, MCM5, MCM3, CDK2, CCNA2, E2F3 および ORC1L の発現が歯冠細胞より約 1.5 倍以上高く、増殖停止に関連する TGFB2 および GADD45G の発現が歯冠細胞での発現の 1/2 以下であった。
4. 骨芽細胞分化誘導によって、歯冠細胞と歯根細胞はいずれも、培養 7, 14 日目にコントロールよりも強い ALP 陽性を示し、培養 21 日目ではアリザリンレッド陽性の石灰化 nodule を認めた。しかし、培養 7 日目の歯冠細胞と歯根細胞の ALP 活性には差異が認められなかった。
5. 脂肪細胞分化誘導によって、歯冠細胞と歯根細胞は、培養 35 日目にオイルレッド O 陽性の細胞内脂肪滴を有する細胞が出現した。
6. 歯冠細胞と歯根細胞いずれもから ESCs 様形態のコロニー形成細胞 (iPS 細胞) が樹立された。
 - a. 樹立効率は、4 因子の場合、歯冠細胞で 0.0165%、歯根細胞で 0.0535%、3 因子の場合、歯冠細胞で 0.0036%、歯根細胞で 0.0160% であり、歯根細胞からの樹立効率は歯冠細胞の約 3-4 倍高かった。
 - b-d. 3 因子あるいは 4 因子によって形成された ESCs 様形態のコロニーは、ALP 陽性であり、SSEA-4, TRA-1-60 および TRA-1-81 陽性であることも確認された。
 - e. 樹立された iPS 細胞では、NANOG, REX1, OCT3/4, SOX2, KLF4 および c-MYC の遺伝子発現を認めた。
 - f. 樹立された iPS 細胞の核型はいずれも 46, XY (20 継代目) で異常を認めず、また、NANOG, REX1 および OCT3/4 のプロモーター領域には、由来細胞と比較して明らかに広範な脱メチル化が生じていることが確認された。
 - g. 歯冠細胞および歯根細胞由来の iPS 細胞のマウス精巣への移植によって、それぞれ、14 例中 4 例、10 例中 4 例の奇形腫が形成された。いずれも iPS 細胞の場合において、奇形腫において三胚葉の組織に分化し得ることが確認された。

以上の結果は、ヒト乳歯歯根部の歯髄には MSCs の特性を持つ細胞が含まれ、これらの細胞増殖能、KLF4 発現および iPS 細胞樹立効率は乳歯歯冠部歯髄の MSCs よりも高く、iPS 細胞の作製とそれに続く移植療法にとって有益な新たな細胞源となる可能性を示すものである。