

論文の内容の要旨

氏名：河野英輔

博士の専攻分野の名称：博士(歯学)

論文題名：Derivation of neural crest cells from human dental pulp-derived induced pluripotent stem cells

(ヒト歯髄細胞由来 iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導)

近年、細胞を用いた歯の再生医療が注目されているが、歯を完全に再生する方法は未だ確立されていない。歯の発生に関わる細胞の一つとして神経堤細胞 (Neural crest cells : NCCs) が挙げられる。NCCs は脊椎動物に特有な細胞群であり、顎顔面領域の発生に重要な役割を果たす。NCCs からは象牙芽細胞などになる間葉細胞が生じ、上皮細胞と間葉細胞の相互作用により歯は発生することから、多能性幹細胞から NCCs に分化誘導させることができれば、歯や顎骨などの顎顔面領域の再生医療にとって有益な細胞源となる。そこで本研究では、Bajpai ら (2010) が報告したヒト ES 細胞からの神経堤細胞誘導法を応用し、ヒト乳歯歯髄細胞由来 iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導を行うことを目的とした。

iPS 細胞は、日本大学歯学部附属歯科病院にて抜去した乳歯の歯髄細胞から作製したものを使用した。NCCs への分化誘導法は、iPS 細胞を single cell にして回収し、96 ウェルの低接着プレートに 20mM の Y-27632 を含む neural induction medium 中で浮遊培養を行い、ニューロスフェアを作製した。浮遊培養 8 日後、ニューロスフェアをフィブロネクチンコートした培養皿に移した。そして接着したニューロスフェアよりロゼット構造が出現し、細胞が外生した。ロゼット構造を除去後、残った細胞を NCCs とした。NCCs の細胞学的特性の解析として、まず 1) real-time PCR にて NCC マーカーである *PAX3*, *P75*, *SLUG*, *SNAIL*, *SOX9* の遺伝子発現を調べた。続いて 2) フローサイトメトリーにより、NCC マーカーである P75, HNK-1, 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell : MSC) マーカーである CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, および iPS 細胞マーカーである SSEA-4 の細胞表面抗原解析を行った。3) 蛍光抗体法により、NCC マーカーである AP-2 α , NESTIN, P75, および iPS 細胞マーカーである SSEA-4 の染色性の検討を行った。さらに、4) 細胞増殖能に関しては、コロニー形成能、WST-8 アッセイを用いた細胞増殖能の評価、およびフローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。一方、分化能の評価は、*in vitro* における骨芽細胞、シュワン細胞への分化誘導実験、および *in vivo* における移植実験を行った。5) 骨芽細胞分化はアルカリホスファターゼ (ALP) 染色および石灰化 nodule のアリザリンレッド染色で評価し、6) シュワン細胞分化は、蛍光抗体法によるシュワン細胞マーカーである GFAP および S100B の染色性を評価した。7) NCCs とブタ歯胚から採取したエナメル上皮をヌードラットに移植し、*in vivo* における組織形成能を検討した。

以上の実験により、以下のような細胞学的特性が示された。

1. ヒト乳歯歯髄細胞由来 iPS 細胞から分化誘導した NCCs の遺伝子発現は iPS 細胞と比較して、*PAX3*, *P75*, *SLUG*, *SNAIL*, *SOX9* の発現がそれぞれ 14.1 倍 ($P < 0.05$), 88.4 倍 ($P < 0.01$), 89.6 倍 ($P < 0.05$), 4.6 倍 ($P < 0.01$), 19.9 倍 ($P < 0.05$) 高かった。
2. NCCs の細胞表面抗原解析で、P75 は 97.5%, HNK-1 は 27.3% が陽性を示し、P75 と HNK-1 の二重染色では 23.8% が陽性を示した。CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 はそれぞれ 24.4%, 79.8%, 98.2%, 54.0%, 84.8% が陽性を示した。また SSEA-4 は陰性を示した。
3. NCCs は抗 AP2- α 抗体、抗 NESTIN 抗体、抗 P75 抗体に陽性を示したが、抗 SSEA-4 抗体には陰性を示した。

4. NCCsのコロニー形成能は、6ウェルプレートに 0.5×10^4 個/well播種した場合、49日目に平均 7 ± 2 個、 1.0×10^4 個/well播種した場合、21日目に平均 5 ± 2 個のコロニーが観察された。またNCCsはneural induction mediumおよびMSC増殖培地の両方で細胞が増殖し、さらにMSC増殖培地での培養では、neural induction mediumと比較して3, 5, 7日目の細胞増殖は有意に高かった ($P < 0.01$)。細胞周期解析において、培養5日目のS期にあるNCCsの割合はneural induction mediumと比較してMSC増殖培地で培養した方が高かった。
5. NCCsをneural induction mediumで培養した後に骨芽細胞誘導を行うと、ALP活性は低く、アリザリンレッド染色は陰性を示した。しかしNCCsをMSC増殖培地中で2週間培養後、骨芽細胞誘導を行うと、誘導7日目でALP活性の増加を、21日目でアリザリンレッド染色の陽性を示した。
6. シュワン細胞分化誘導によって、誘導5週目にNCCsは細胞突起を持つ形態に変化し、抗GFAP抗体および抗S100B抗体に陽性を示した。
7. *in vivo*において、移植後16週目に摘出した移植体には、骨および軟骨組織が観察できた。蛍光抗体法の結果、骨芽細胞と骨細胞は抗ヒト核抗体および抗ヒトオステオカルシン抗体に陽性を示した。さらに軟骨基質はアルシアンブルー染色に陽性を示すと共に、軟骨細胞は抗ヒト核抗体に陽性を示した。

以上の結果から、ヒト乳歯歯髄細胞より作製したiPS細胞をNCC誘導によって得られた細胞は、NCCsの細胞学的特性を有していることが明らかになった。またNCCsは、骨芽細胞、シュワン細胞への分化能、および骨、軟骨への組織形成能を有することから、再生医療にとって有益な細胞源となる可能性を示すものである。