

氏名（本籍）	武 田 知 子（愛知県）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	甲第 7 6 9 号
学位授与日付	平成 20 年 5 月 21 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Characterization of Dental Pulp Stem Cells of Human Tooth Germs
審 査 委 員	（主査）教授 清 水 克 時 （副査）教授 高 見 剛 教授 小 澤 修

論文内容の要旨

背景と目的

ヒト歯髄幹細胞(DPSCs)は歯髄から単離される組織幹細胞であり、高いコロニー形成能を持ち、多分化能を有することが報告されている。我々は、これまで報告のある成人歯髄に比べ、ヒト幼弱歯髄（発生段階が早期の歯髄）には、より未分化な細胞集団が多く存在していると考え、幼弱歯髄細胞および成熟歯髄細胞を初代培養および継代培養し、両者の比較による性状解析を行ない、ステムネス性（幹細胞性）に関する遺伝子の発現の変化を検討した。

対象・方法

岐阜大学医学部附属病院にてインフォームド・コンセントを得て抜歯された智歯(14～24歳, N=100)を歯の発生段階（歯冠完成期または歯根形成/完成期）で二分し、各智歯よりタイプ I コラゲナーゼで処理した歯髄組織を摘出した。処理によって得られた細胞を、初代培養および継代して長期培養した。分化能を検討するために、*in vitro* において、骨・象牙芽細胞、脂肪細胞および神経系への分化誘導を行ない、組織染色・免疫染色等により評価した。また継代による遺伝子発現の変化を、3 例の歯冠完成期株について DNA array およびリアルタイム PCR を用いて比較した。*In vivo* においては、リン酸カルシウム担体に細胞を播種し NOD/SCID マウスへ皮下移植し、移植後 8 週および 15 週で摘出し、組織学的に評価した。

結果

採取された細胞 100 株は、その発生状態により歯冠完成期 42 株と歯根形成/完成期 58 株に分類された。歯冠完成期の歯髄から採取した細胞の培養 5 日目の形態は、歯根形成/完成期のものに比べ、より間葉系細胞に類似し細胞間の間隔が広く分裂像も数多く見られ、細胞増殖と運動が盛んな状態が観察された。増殖能は、長期培養期間内の平均 doubling time において歯冠完成期で 42 ± 2.8 時間、歯根形成/完成期で 65 ± 6.5 時間と、発生段階が早期な歯冠完成期の方が、後期の歯根形成/完成期よりも有意に高かった。

歯冠完成期 DPSCs と歯根形成/完成期 DPSCs を共に、骨/象牙芽細胞分化誘導条件で培養すると、ア

ルカリフォスファターゼ活性が上昇し、石灰化マトリックスを形成したことから、骨/象牙芽細胞系へ分化がすすんだことが示唆された。しかし、脂肪細胞系への誘導では、小さな油滴は観察できたが、RT-PCRにおいて脂肪細胞マーカー遺伝子（PPAR γ 2, LPL）の発現は確認できなかった。神経系に分化誘導すると、nestin 陽性および β III-tubulin 陽性の細胞が多数観察された。このことから、歯冠完成期 DPSCs は、今まで報告のある歯根形成/完成期 DPSCs と同様に、多分化能を持つことが示唆された。しかし、歯冠完成期 DPSCs と歯根形成/完成期 DPSCs は共に、骨/象牙芽細胞への分化能は継代にともない低下し、また細胞形態も継代するにつれ細長く平らに変化した。歯冠完成期 DPSCs を NOD/SCID マウスへ皮下移植したところ、効率良く象牙質様組織の形成が観察されたが、継代数 10 (P10) の細胞の移植では象牙質様組織の形成がほとんど認められなかった。

3 例の歯冠完成期 DPSCs について、P4 と P10 間で遺伝子発現を DNA array を用いて比較した。3 例すべてで発現が 2 倍以上変化した遺伝子は、P4 で P10 より発現が高い (P4>P10) のものが 719 遺伝子、P4<P10 が 642 遺伝子であった。さらに発現が 5 倍以上変化した遺伝子は、P4>P10 で 38 遺伝子、P4<P10 で 30 遺伝子あった。そのうち P4 では TLR4 および ITPR1, P10 では WNT16 などの高いレベルでの発現を認めた。これらの遺伝子を歯冠完成期 DPSCs および歯根完成期 DPSCs で共にリアルタイム PCR で確認したところ、WNT16 が最も高い倍率で変動していた。また TLR4 の発現は、歯冠完成期と歯根完成期では変動に差がある傾向が見られた。

考察・結語

幼弱歯髄（歯冠完成期）の DPSCs は、成熟歯髄（歯根形成/完成期）のものに比べ、効率的に樹立でき、また高い増殖能と象牙芽細胞への分化能を持つことが示された。しかし、いずれの歯髄から得られた DPSCs も継代により分化能が低下し、これに伴い WNT16 や TLR4 の遺伝子発現が大きく変化することが示された。以上の結果は、DPSCs のステムネス性に WNT16 か TLR4 が強く関与することを示し、これを指標とする分化能の評価や制御によるステムネス性の維持が得られる可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

申請者 武田 知子は、発育段階が早期の幼弱な歯髄から、高い増殖能を持つヒト組織幹細胞が効率的に得られることを示し、継代により失われるステムネス性に WNT16 および TLR4 が強く関与することを明らかにした。本研究は、ヒト歯髄由来の組織幹細胞の有用性を示すとともに、ステムネス性維持の機序解明に貢献し、再生医療の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, Miyaki S, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. : Characterization of Dental Pulp Stem Cells of Human Tooth Germs
Journal of Dental Research 87, 676-681 (2008).