

学位論文

ヒト歯髄細胞の分子生物学的解析

徳田 吉彦

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

(主指導教員: 山田 一尋 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科 博士 (歯学) 学位申請論文

Molecular Biological Analysis of Human Dental Pulp Cells

Yoshihiko Tokuda

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine

(Chief Academic Advisor: Professor Kazuhiro Yamada)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

歯髄組織は主として神経堤由来の外胚葉性間葉からなっている。また、歯髄組織は中胚葉性間葉細胞も存在する為、骨芽細胞、軟骨細胞及び筋細胞、筋芽細胞などへの多分化能も有している。このように、歯髄細胞は様々な細胞へ分化誘導を制御できる可能性を有し、かつ脱落乳歯や抜去智歯、歯科矯正治療における便宜抜去歯などから容易に採取可能であるため、再生医療の材料として有望な細胞である。マウスを用いた研究で、歯髄細胞は、骨芽細胞に較べ石灰化の指標であるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性が著しく強く、また培養歯髄細胞をマウス筋膜下に移植し3週後に摘出した *in vivo* 実験において、マウス歯髄細胞移植部位に硬組織様構造物が形成された報告がある。そこで今回、ヒト歯髄細胞を用いた自家移植による再生医療の実現を最終目標とし、(1) ヒト歯髄細胞の特異形質を決定する遺伝子の同定、(2) ヒト歯髄細胞の石灰化能の検討、(3) ヒト歯髄細胞移植による硬組織再生能の検討を行った。

歯髄細胞が有する特異形質の同定を目的として、まず矯正治療中の便宜抜去歯からヒト歯髄細胞を抽出した。その後、ヒト歯髄細胞及びヒト骨髄由来間葉細胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。総括的遺伝子発現パターンの比較では、ヒト歯髄細胞とヒト骨髄由来間葉細胞は高い相関を示し、遺伝子発現の多くは相似していることが示された。マイクロアレイ解析において、ヒト歯髄細胞とヒト骨髄間葉細胞間で、石灰化調節因子群の中で特に顕著な差が認められたものとして、石灰化促進因子として ALP と骨誘導因子 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2)、石灰化抑制因子としてピロリン酸合成酵素 (ENPP-1) とマトリックスマグラータンパク (MGP) を認めた。ヒト歯髄細胞はヒト骨髄間葉細胞に較べ ALP では Sample1 は 1.95 倍で Sample5 は 3.92 倍、BMP2 では Sample1 は 2.63 倍で Sample5 は 3.36 倍強い発現量が認められた。一方、ヒト歯髄細胞はヒト骨髄間葉細胞に較べ ENPP1 では Sample1 は 0.35 倍で Sample5 は 0.33 倍、MGP では Sample1 は 0.031 倍で Sample5 は 0.034 倍の発現しかなく、ヒト歯髄細胞の石灰化抑制因子の発現は、ヒト骨髄間葉細胞に較べ極端に低いことが示された。また、Real Time PCR 法を用いた解析では、ヒト歯髄細胞はヒト骨髄間葉細胞と較べ ALP では Sample1 は 25.61 倍で Sample5 は 65.79 倍、BMP2 では Sample1 は 71.74 倍で Sample5 は 80.47 倍の発現量を示し、マイクロアレイ解析の結果と一致した。

ヒト歯髄細胞は、ヒト骨髄由来間葉細胞に較べ ALP 活性が強かった。ALP 活性は培養初期から強く、2週目でピークに達していた。また、BMP2 非存在下培養条件でのヒト歯髄細胞は、ヒト骨髄由来間葉細胞に較べ2週目から顕著に石灰化物の析出 (アリザリンレッド染色) が確認され、ヒト歯髄細胞は著しく高い石灰化能を有することが示された。

硬組織再生能の検討の為、培養ヒト歯髄細胞を免疫不全マウスの背側筋膜下に移植し、2ヶ月後摘出した。軟 X 線写真と CT 画像において、ヒト歯髄細胞移植部位に石灰化物

が認められた。石灰化に寄与した細胞の起源を明らかにする為、ヒト由来抗原に対する特異抗体（抗ヒトビメンチン抗体）にて免疫染色に供した。石灰化物部位においてヒト由来細胞が確認されたことから、石灰化物はヒト歯髄細胞に由来するものであることが確認できた。

以上のヒト歯髄細胞を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 実験の結果より、ヒト歯髄細胞は石灰化に非常に有利な形質を有する細胞であり、硬組織再生医療に臨床応用できる可能性を有する細胞であることが示唆された。

緒 言

現在、再生医療の材料として、胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）、成体幹細胞そして自己骨髄細胞が存在する¹⁻⁵⁾。これらの細胞には臨床応用の為の様々なハードルが存在するなかで、現在様々な研究が進められている⁶⁾。

ES 細胞を用いた再生医療においては、本人への ES 細胞の移植は不可能であり、他者の ES 細胞も免疫拒絶反応の為不可能である。また、受精卵を用いる為、倫理的問題も存在する。さらに、ES 細胞が全分化能を有する為、移植後容易に奇形腫を形成し、目的の細胞への分化制御、培養条件の検討が困難であるという欠点がある。iPS 細胞に関しては、作製に関する研究が飛躍的に発展しており、現在生体移植も行われるようになった⁷⁾。しかし、iPS 細胞の悪性腫瘍化、また全分化能を有している為、奇形腫の形成など課題も多く残されている⁸⁾。成体幹細胞は一種類以上の細胞に分化可能で、ES 細胞と異なり特定の系統の細胞にのみ分化するというメリットがあるものの、成体幹細胞治療には特定の系統の幹細胞源が必要であり、これらの細胞を採取し、培養する必要がある。自己骨髄細胞は、自家移植が可能で大変有用であるが、採取に際して患者の苦痛や危険をやや伴うという欠点が存在する。

一方、歯髄細胞は、脱落乳歯や抜去智歯、歯科矯正治療における便宜抜去歯などから容易に採取可能であり、かつ多分化能を有する幹細胞が存在する⁹⁾。

歯髄は、歯の中心部を占める疎性結合組織であり、基質と細胞から構成されている。基質中の線維は主に I 型コラーゲン線維と III 型コラーゲン線維であり、弾性線維はほとんど含まれていない。細胞成分としては、神経細胞のほか、象牙芽細胞、線維芽細胞、樹状細胞及び、免疫系血球細胞を含んでいる。また、歯髄は感覚受容組織であるだけでなく、自己修復能力も有しており、歯の摩耗や齶蝕及び切削治療などによる象牙質への機械的刺激によって形成される修復象牙質として認められる。また、歯の再植処置後の歯髄治癒過程において、炎症性細胞の浸潤の他に、象牙質様硬組織や歯髄腔内に島状に形成される骨様硬組織の存在が確認されている¹⁰⁾。すなわち、歯の自己修復における歯髄細胞の役割は、骨折の治癒過程において骨髄間質細胞が骨形成を担う骨芽細胞に分化することと同様であると考えられている¹¹⁻¹³⁾。また、マウス骨芽細胞や骨髄間質細胞のみならず、ヒト歯髄由来の間葉細胞は、マクロファージ系の細胞からの破骨細胞の分化を支持する活性を有していることが報告されている¹⁴⁾。

過去の報告において、歯髄の間葉には胎生期のみならず、出生後も多数の神経堤由来細胞が存在する。また、歯髄中の中胚葉性間葉細胞は象牙芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞など

様々な細胞に分化可能であること¹⁵⁾、帽状期歯胚の歯乳頭に中胚葉由来細胞が侵入することが報告されている¹⁶⁾。

以上のように、歯髄に存在する細胞は神経堤由来の外胚葉性間葉細胞と中胚葉由来間葉細胞の2種類の細胞から分化することが明らかになっている。したがって、歯髄の神経堤由来間葉細胞は、神経細胞や象牙芽細胞への分化能を有する。また、歯髄の中胚葉由来間葉細胞は、骨芽細胞や軟骨細胞及び筋芽細胞への分化能を有する。このように歯髄細胞は多分化能を有するのみならず、脱落乳歯や抜去智歯、歯科矯正治療における便宜抜去歯などから容易に採取可能である為、再生医療において有望な材料である。しかし、歯髄細胞に発現する石灰化に関する遺伝子群および、歯髄細胞の分化、培養条件に関する知見は極めて少ないのが現状である。

そこで、本研究の目的はヒト由来の歯髄細胞の採取培養を行い、ヒト歯髄細胞の特異形質を決定する遺伝子の同定、ヒト歯髄細胞の石灰化能の解析、及びヒト歯髄細胞のマウス筋膜下移植による硬組織再生能の検討を行い、ヒト歯髄細胞を用いて、硬組織再生の応用を目指す基礎的実験結果を蓄積することである。

実験材料及び方法

1.細胞の採取と調製

1) ヒト歯髄細胞の採取

ヒト歯髄細胞 (hDPC) は松本歯科大学病院矯正歯科を受診し、矯正治療において便宜抜歯が必要となった患者の便宜抜去歯から採取した。

患者は全身疾患の無い者を対象とした。抜歯は通法に従い、リドカインによる浸潤麻酔を用いて行った。歯の抜去時における歯髄に達する損傷を受けた歯、および歯髄への細菌感染の疑われる齲蝕罹患歯は今回の実験の材料から除外し、計 7 本の試料 (男性 3 名、女性 4 名、平均年齢 19.3 歳、上下顎小白歯) を得た (表 1)。対象歯は採取後ただちに 10 % Fetal bovine serum (FBS, JRH Biosciences, Lenxa, KS) を含む Minimum essential medium eagle alpha modification (α -MEM, ライフテクノロジーズ・ジャパン, 東京) に浸漬し、細胞培養に供した。本研究を行うにあたり、同意説明文書及び同意書を持って、検体提供者からインフォームド・コンセントを取得した。なお、本研究は松本歯科大学研究倫理委員会の承認を得ている (承認番号 0149)。

2) hDPC の調製

抜去歯から採取した歯髄組織は、ただちにあらかじめ調製した 10 % FBS を含む α -MEM 培地中にてメス (ディスポーザブルスカルペル No,11, フェザー, 大阪) を用いて細切した。FBS, α -MEM, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES buffer, Sigma-Aldrich Japan Inc, 東京), Cell Matrix Type- I A (新田ゼラチン, 東京) にて作製したコラーゲンゲル中に細切した歯髄組織を留置し、6 well dish (サーモフィッシュャーサイエンティフィック, 神奈川) にて 37 °C、5 % CO₂条件下で 2 週培養した。培養した歯髄組織から細胞がアウトグロースしたことを確認し、0.4 % collagenase (和光純薬工業, 大阪) にて細胞を回収、継代し増殖させた。培地交換は 1~2 回/週行い、継代を 2 回繰り返した。0.05 % trypsin EDTA にて処理した細胞を、遠心分離 (1200 rpm, 7 min) を行い、沈殿した細胞を hDPC とした。hDPC は、 5×10^5 cells/vial になるように調製し、細胞凍結保存液 (セルバンカー, Takara Bio Inc, 滋賀) にて -80 °C 中で保存した。

3) ヒト骨髄間葉細胞の調製

ヒト骨髄間葉細胞 (Human Marrow Stromal Cells, Cell Applications Inc. San Diego, CA HMSC) (Code No. CA49205f) 20 週胎児 (ヒスパニック系) 由来の骨髄細胞を α -MEM 培地にて 6cm dish (サンプラテック, 大阪) を使用し、37 °C、5 % CO₂条件下で培養した。2 週培養後、継代し、10cm dish (サーモフィッシュャーサイエンティフィック, 神奈川) で増

殖させた。培地交換は 1~2 回/週行い、継代を 2 回繰り返した。ヒト歯髄細胞と同様に保存を行った。以後の実験ではこの細胞を対照群として用いた。

2. 網羅的遺伝子発現の解析

1) マイクロアレイ解析による方法

hDPC は、すべての Sample をアルカリホスファターゼ (ALP) 及びアリザリンレッド (AR) 染色を行い、染色性の良い Sample 1 と Sample 5 を使用した。凍結保存中の細胞を融解し、96 well プレートにて 2 週培養した各種細胞 (Sample 1, Sample 5, HMSC) を PureLink RNA Mini Kit (ライフテクノロジーズ・ジャパン, 東京) により total RNA を抽出した。抽出した total RNA は Agilent 社 Gene Expression Microarray Sure Print G3 Human 8×60K v2 を用いた解析をバイオマトリックス研究所 (千葉) に依頼し、HMSC と Sample 1 の総括的遺伝子発現パターン比較、HMSC と Sample 5 総括的遺伝子発現パターン比較、及び Sample 1 と Sample 5 に共通の発現傾向のある遺伝子解析を行った。また、遺伝子発現量の比較を HMSC と Sample 1, Sample 5 で行った。

2) Real Time PCR 法

マイクロアレイ解析のデータについて mRNA 発現における再現性を Real Time PCR 法を用いて確認した。マイクロアレイ解析の際に得られた total mRNA から逆転写酵素 (Rever Tra Ace, 東洋紡, 大阪) とオリゴ dT₁₂₋₁₈ プライマーを用いて、一本鎖 cDNA を合成した。cDNA の合成は、電気泳動を行い確認した。合成した cDNA は各種プライマー (Takara Bio Inc, 滋賀) を用いて一本鎖 cDNA を PCR に供した。表 2 にリアルタイム PCR 法に用いたプライマー塩基配列を示す。PCR は Real Time PCR 装置 (Step One Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems) を用いて 95 °C 5 min, 60 °C 30 sec, 40 cycle 条件で、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を内部基準として用い分析を行った。

3) 統計処理

マイクロアレイ解析による総括的遺伝子発現パターンの比較には、pearson の積率相関係数を用いて Sample 1 と HMSC および Sample 5 と HMSC を比較した。相関係数は $r > 0.7$ を相関関係が強いと判断した。Real Time PCR 法により得られたデータから Student *t*-test を用いて、HMSC と hDPC における ALP 発現および BMP2 発現の比較を行った。 $p < 0.05$ で有意差有りとした。

3. hDPC の *in vitro* における石灰化能の検討

1) ALP 染色

継代培養した hDPC と HMSC は、96 well プレート（サンプルテック，大阪）を使用し、1 well に対して 1.0×10^4 cells となるように調製し培養を開始した。さらに、10 % FBS 含有 α -MEM 培地に 100 μ g/ml アスコルビン酸（AA, Sigma-Aldrich Japan Inc, 東京）及び 5 mM β -グリセロリン酸（ β -GP, ナカライテスク, 京都）を添加した条件と添加していない条件とに分け、3 週まで培養した。AA と β -GP を添加した条件と添加していない条件の hDPC は Sample 1~7 を使用した。ALP 染色液は、1 mg Naphthol AS-MX Phosphate（Sigma-Aldrich Japan Inc, 東京）を 100 μ l N-N-dimethyl formamide（和光純薬工業，大阪）に溶解させ、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) を 10 ml、Fast Blue BB salt（Sigma-Aldrich Japan Inc, 東京）6mg を加えたものを調製した。培養 1 週後、2 週後、3 週後に 96 well プレートより α -MEM 培地を除去し、Phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich Japan Inc, 東京) にて洗浄した。

その後、4 % Paraformaldehyde/PBS（和光純薬工業，大阪）で細胞を 3 分間固定した。次いで、0.1 % Triton/PBS（Sigma-Aldrich Japan Inc, 東京）を加え 1 分間処理した後、ALP 染色液を加え、37 °C で 10 分間染色した。顕微鏡下にて細胞が青色に発色したことを確認し、純水にて細胞を洗浄した。乾燥後、光学顕微鏡（Nikon eclipse TS100, ニコンインステック，東京）にて観察し、写真を倒立型電動顕微鏡（Axiovert 200, カールツァイスジャパン，東京）にて撮影した。

2) Alizarin red (AR) 染色

ALP 染色の際と同様に、96 well プレートを使用し、1 well に対して 1.0×10^4 cells の条件で培養を行った。さらに、10 % FBS 含有 α -MEM 培地に AA (100 μ g/ml) 及び β -GP (5 mM) を添加した細胞と添加していない細胞に条件を分け、4 週まで培養した。hDPC は、ALP 染色の際に使用した Sample1 を使用した。培養 1 週後、2 週後、3 週後、4 週後に 96 well プレートより α -MEM 培地を除去し、PBS にて洗浄した。その後、4 % Paraformaldehyde/PBS（和光純薬工業，大阪）で細胞を 10 分間固定した。純水にて洗浄後、95 %エタノールで 15 分間固定した。乾燥後、AR 染色液（Sigma-Aldrich Japan Inc, 東京）にて 5 分間室温にて染色を行い、純水にて洗浄、乾燥を行った。その後、ALP 染色と同様に光学顕微鏡下にて観察し、写真を撮影した。

4. hDPC の生体内での硬組織形成能の検討

1) 移植片の調製

hDPC は、すべての Sample を ALP 及び AR 染色を行い、染色性の最も良い Sample 1 をマウスへの埋入に使用した。hDPC 及び HMSC のマウス背側筋膜下への移植の為の足場としてゼルフォーム® (滅菌吸収性コラーゲンスポンジ, ファイザー, 東京) を使用した。凍結保存中の細胞を融解し、10 % FBS を含む α -MEM 培地を入れた 6 cm dish に播種し、コンフルエントになるまで 37 °C、5 % CO₂ 条件下にて培養を行った。その後、培養した細胞を 1 ml 0.05 % trypsin EDTA にて回収し、1 well に対して 1.0×10^6 cells になるように調製し、5 mm 四方のゼルフォームと共に 96 well プレートに播種した。播種した 96well プレートを遠心分離 (1200 rpm, 5 min) し、細胞をゼルフォーム®に吸着させ、1 日培養した。その後、FBS, α -MEM, HEPES buffer, Cell Matrix Type- I A にて作製したコラーゲングル中にて 37 °C、5 % CO₂ 条件下で 2 週培養を行った。培養後、顕微鏡下にて細胞がゼルフォーム®よりアウトグロースしていることを確認後、周囲のコラーゲングルを含む形でゼルフォーム®をメスで採取し、一塊を移植片とした。

2) 移植対象と方法

レシピエントとなるマウスは、成熟した T 細胞や B 細胞が存在しない免疫不全マウス (Recombination Activating Gene-1 Knock Out mouse: RAG1 KO)¹⁷⁾ 12 週齢の雄を 2 匹使用した。イソフル® (イソフルラン, DS ファーマーアニマルヘルス, 大阪) 吸入麻酔下にて免疫不全マウスの背中を約 30 mm 切開し、肋骨上部の筋膜下に移植片を埋入した。HMSC は左側、hDPC は右側の同一個体の背側筋膜下に埋入した。埋入後、傷部を縫合し、2 ヶ月経過観察した。経過観察期間終了後、頸椎脱臼法にてマウスを屠殺し、埋入部周囲の組織を含めて回収した。なお本動物実験は、松本歯科大学動物委員会の承認を得ている (承認番号 144 継)。

3) 評価方法

① X 線による評価

移植 3 週後、マウスを軟 X 線発生装置 (ソフロン, 東京) で撮影 (20 sec, 30 kV, 3.0 mA) し、移植片を確認した。移植 2 ヶ月後、摘出した組織片を軟 X 線発生装置にて再度撮影した。同組織片を micro CT (Scan Xmate-A080, Comscantecno Co, Ltd, 神奈川) にて撮影 (30 sec, 100 kV, 80 mA) し、硬組織形成の確認を行った。

② 免疫染色による評価

マウスから摘出した組織片を -80 °C へキサンを用い凍結保存した。その後、川本法^{18,19)}

に準じて凍結切片を作製した。薄切切片を 5 % acetic acid / ethanol (和光純薬工業, 大阪) に 15 分浸漬し、PBS にて洗浄した。その後 Peroxidase blocking reagent (Dako Japan, 東京) にて処理し、再び PBS にて洗浄した。免疫蛍光染色には、ヒストファインシンプルステインキット Max Po (M) (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を使用した。一次抗体として、コントロールとして Goat Anti-mouse IgG (Takara Bio Inc, 滋賀)、ヒト由来抗原に対する特異抗体として Monoclonal Mouse Anti-Human Vimentin Antibody (clone V9, Dako Japan, 東京) を用いた。二次抗体には TSA cyanine 3 kit (PerkinElmer Japan Co, Ltd, 東京) を用いた。核染色には DAPI (Vector Laboratories, Inc, USHeadquarters) を用いた。撮影には倒立型電動顕微鏡 (Axioplan2 imaging, カールツァイスジャパン, 東京) を用いた。得られた DAPI 染色像および Anti-Human Vimentin 使用ヒト由来細胞免疫染色像を Adobe Photoshop software (Adobe Systems Software Ireland Ltd, San Jose) を用いて重ね合わせ、ゼルフォーム®のコラーゲン線維を Adobe Photoshop software にて画像内に点線として描写し、その範囲を記録した。

結 果

1. hDPC に発現する形質の解析

hDPC において発現している遺伝子の種類及び発現レベルは、hDPC Sample1 と HMSC との相関係数は 0.95、また hDPC Sample5 と HMSC との相関係数は 0.98 と非常に高い数値を示した (図 1)。

さらに、石灰化調節因子群の中で hDPC が HMSC と比較して強い発現を認めるものに、ALP 及び骨誘導因子である Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) が見い出された。

hDPC は HMSC に比べ ALP では Sample1 は 1.95 倍で Sample5 は 3.92 倍 BMP2 では Sample1 は 2.63 倍で Sample5 は 3.36 倍の発現レベルが認められた (図 2)。一方、石灰化抑制因子群の中で hDPC が HMSC と比較して弱い発現を認めるものとしてピロリン酸合成酵素である Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase1 (ENPP1) 及び骨基質タンパクであるマトリックスメタタンパク (MGP) が見い出された。hDPC は HMSC に比べ ENPP1 では Sample1 は 0.35 倍で Sample5 は 0.33 倍、MGP では Sample1 は 0.031 倍で Sample5 は 0.034 倍の発現レベルしか認めず、hDPC の石灰化抑制因子の発現は、HMSC に比べ極端に低いことが示された (図 3)。

mRNA 発現レベルを Real Time PCR 法で確認した結果、hDPC は HMSC と比べ ALP では Sample1 は 25.61 倍で Sample5 は 65.79 倍、BMP2 では Sample1 は 71.74 倍で Sample5 は 80.47 倍の発現量を示し、HMSC と hDPC は全ての比較において $p < 0.05$ を示し、有意な差が認められた (図 4)。

2. hDPC の *in vitro* における石灰化能の検討

1) hDPC の ALP 活性の検討

hDPC は、HMSC と比べ培養開始 1 週で強い ALP 染色像を示した (図 5)。また、hDPC の ALP 染色は、2 週でピークに達していた。3 週での比較でも hDPC の方が強い ALP 染色像を示した。さらに、AA 及び β -GP を培地に加えた条件において、hDPC と HMSC は、ALP がより強い染色像を示した (図 5)。なお、図には示していないが、7 本の試料全てにおいて ALP 染色像は HMSC より強い結果を得た。

2) hDPC の石灰化能の検討

培養開始 1 週では AR 染色像で両者共に石灰化は認められなかった (図 6)。しかし、培養開始 2 週で AA と β -GP を加えた培養条件では、hDPC は HMSC に比べ顕著に強い AR 染色像を示した (図 6)。2 週では HMSC は石灰化物の析出はなかった。培養開始 3 週、4 週

では両細胞で石灰化物の析出が継時的に増加した。しかし、HMSCにおける石灰化物の析出が実験期間中にhDPCより強くなることはなかった。AAと β -GP非添加の培養条件では両細胞とも石灰化物の析出はなかった。なお、図には示していないが、7本の試料全てにおいてAR染色像はHMSCより強い結果を得た。

3. hDPCの生体内での硬組織形成能の検討

1) hDPC移植による石灰化物形成能の検討

軟X線撮影の結果、埋入3週では石灰化を示す不透過像は認められなかった。埋入2ヶ月後hDPCを埋入した部位には、肋骨に較べると石灰化度の低く、境界明瞭な不透過像を認めた(図7A)。

同組織片のmicro CT撮影の結果、水平に並ぶ肋骨の間に顆粒状に形成された約200 μ mの石灰化物を認めた(図7B)。

HMSCでは埋入2ヶ月後においても石灰化を示す不透過像は認められなかった。

2) 組織片の免疫染色

一次抗体にコントロールIgGを用いた染色ではDAPIによる細胞核しか染色されていない(図8A)。一次抗体にAnti-Human Vimentinを用いた染色ではhDPCの足場であるゼルフームの隙間に、赤色に染まるヒトビメンチン陽性細胞を認めた(図8B)。

考 察

本研究では歯髄の自己修復能力に着目し、hDPCの硬組織形成能について解析した。マウス歯髄細胞を実験材料とした我々のグループの研究で、マウス歯髄細胞は、マウス骨芽細胞に比べ石灰化の指標であるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性が著しく強い染色像を示し、また培養マウス歯髄細胞をマウス筋膜下に移植し3週後に摘出した *in vivo* 実験において、マウス歯髄細胞移植部位に硬組織様構造物が形成された (未発表)。

Su ら²⁰⁾は、 β -TCP を用いてヒト歯髄細胞の *in vivo* での硬組織形成に関して実験を行っている。Wang ら²¹⁾は、ナノ生体活性ガラスを用いて高いヒト歯髄細胞の硬組織形成能を解析している。Pisciotta ら²²⁾は、ヒト血清を用いた *in vivo* でのヒト歯髄細胞の高い硬組織形成能について報告している。これらの過去の報告において歯髄細胞の高い硬組織形成能が示されている。

本研究において多分化能を有している可能性のある歯髄細胞と同じく多分化能を有する HMSC を通常の細胞培養方法に準拠し、培養した場合の硬組織形成能を比較した。

hDPC の特異形質を解析する為に行ったマイクロアレイ解析の結果から、石灰化促進因子である ALP の発現が高かった (図 2)。一方、hDPC では HMSC に比べ、ピロリン酸合成酵素である ENPP1 の発現レベルは著しく低く、ピロリン酸の合成は低レベルであると考えられる。リン酸合成酵素である ALP の発現レベルが著しく高いことから (図 2)、低レベルで存在するピロリン酸は即座に正リン酸に分解され、細胞培養系で添加されている β -GP から多量の正リン酸が作られるのではないかと推測される。

一方、MGP は石灰化を抑制すると考えられている²³⁾。hMSC における MGP の発現レベルは、HMSC と比較して著しく低かった (図 3)。Yamada ら²⁴⁾は、ヒト歯髄細胞とヒト骨髄間葉細胞のマイクロアレイ解析における比較において、ALP、象牙質マトリックスタンパク質 1、象牙質シアロリントタンパクの発現がヒト歯髄細胞に高く発現していることを報告している。骨形成を促進するサイトカインである BMP2 の高い発現が hDPC において認められた (図 2, 4)。BMP2 の作用である未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化の促進により、効率的に骨の形成が促されたのではないかと推察される。

ALP は有機リン酸エステルを基質として無機リン酸を合成することにより、石灰化に関与する酵素である²⁵⁾。7本の試料から調製した全ての hDPC は、HMSC に比べ極めて強い ALP 活性を示した。Coyac ら²⁶⁾の結果では、培養1週で高い ALP 活性を示し、その後経時的に ALP 活性は下降した。本研究結果においては、培養2週で最も高い ALP 活性を示した (図 5)。このように、HMSC と比較した hDPC の強い ALP 活性は、培養初期から認

められ、内因性 ALP の活性が高いことが示唆された。*in vitro*における石灰化能の比較においても hDPC は、HMSC に較べ早期にかつ顕著に高い石灰化能を示した。

ALP 染色の結果より、HMSC に較べ hDPC は石灰化能が高いことが推察された。培養系での石灰化の過程では、細胞外マトリックス成分としてリン酸カルシウムの沈着が見られる。AR 染色においても hDPC は HMSC に較べ高い石灰化能を示した (図 6)。hDPC の高い ALP 活性により、培地中に添加した β -GP が分解され多量のリン酸が効率的に細胞に取り込まれたことに起因することが予測された。また、hDPC の石灰化は HMSC より早期に認められた (図 6)。これは、hDPC の高い内因性 ALP によるものであることが推察される。

*In vivo*における石灰化物形成能の検討の為、hDPC を免疫不全マウス (Recombination Activating Gene-1 遺伝子欠損マウス) に埋入し、2 ヶ月後に摘出した組織片を解析すると、軟 X 線写真では肋骨に較べ石灰化度の低い境界明瞭な不透過像を示し、micro CT 像では顆粒状の石灰化物を認めた (図 7)。hDPC は *in vivo* で石灰化物を形成する能力を有する細胞であることが明らかとなった。一方、hDPC 埋入 3 週後に撮影した軟 X 線写真では、当該部位に石灰化物を示す X 線不透過像が認められなかった。hDPC 埋入 3 週時点では十分な石灰化が行われていなかったことが推測される。骨折の治癒期間を考慮した場合、2 ヶ月程度の治癒期間を置かなければ臨床上視認できる程度の石灰化物形成が行われないことが報告されており²⁷⁾、今回のマウスを用いた実験結果も同様の経過をたどっていることが推察される。

摘出した組織片に認めた石灰化物の起源を証明する為、抗ヒトビメンチン抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。ゼルフォームに近接して赤色に染まるヒトビメンチン陽性細胞を認める (図 8) ことから、hDPC が石灰化物の形成に寄与したものと推察された。Hosoya ら²⁸⁾はラット歯髄組織を皮下に埋入することにより、骨もしくはセメント質様の硬組織が形成され、オステオカルシン、オステオポンチンおよび骨シアロタンパクの発現が認められるものの、象牙質の特異形質である象牙質シアロタンパクの発現は認められなかったと報告している。今回の実験により形成された石灰化物はこれらの硬組織と同様のものである可能性が考えられる。歯髄組織は外胚葉性間葉細胞と中胚葉性間葉細胞から構成される組織である。そのため起源の異なる細胞が存在することで、最終的に構成される硬組織も複数できる可能性が考えられる。マイクロアレイ解析を用いた hDPC で高発現を示す遺伝子検索の結果から、象牙質シアロタンパクが検出されなかったことを考慮すると、今回の実験で形成された石灰化物は骨組織に近いものであることが予想される。今後、石灰化能の異なる歯髄細胞による実験と共に、歯髄中の細胞のどの分画が高い硬組織形成に関わるのか

を解明することが必要とされる。

本研究では、hDPC を用いた硬組織再生について遺伝子発現解析から石灰化に関与するいくつかの遺伝子を見出した。さらに、*in vitro*における高い石灰化能および *in vivo*における hDPC が関与したと考えられる石灰化物形成を示した。hDPC における遺伝子発現の特徴から hDPC の石灰化能の高さを説明することが可能である。以上の実験結果から、hDPC は硬組織形成に非常に有利な細胞であることが示唆された。

現在、歯髄を用いた再生医療に注目が集まっている。歯髄細胞バンクもビジネス化され、将来歯髄細胞から自己の iPS 細胞を製造し、病気の治療に応用しようとする試みもある。また、近年 iPS 細胞を用いた心筋細胞移植も実施されており²⁹⁾、今後再生医療の需要は更に高まることが予想される。歯髄細胞は、今後の再生医療において重要な材料となる可能性を秘めた組織であると考えられる。歯髄細胞の今後の更なる研究に寄与したい。

結 論

hDPC は HMSC に較べ ALP 活性が高く、BMP2 の発現も高い。また、ENPP-1、MGP の発現も低い。さらに *in vivo* における石灰化物形成能から、hDPC は石灰化に非常に有利な形質を有する細胞であり、硬組織再生医療に臨床応用できる可能性を有する細胞であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始御懇篤なる御指導、御校閲の労を賜りました松本歯科大学大学院硬組織疾患制御再建学講座山田一尋教授に謹んで深甚なる感謝の意を表します。さらに、研究上有益な御指導、御教示を頂きました松本歯科大学口腔生化学講座宇田川信之教授および総合歯科医学研究所中道裕子講師に心から厚く御礼申し上げます。また本研究に際し、御協力を頂きました松本歯科大学歯科矯正学講座ならびに総合歯科医学研究所の皆様を重ねて厚く御礼申し上げます。

文 献

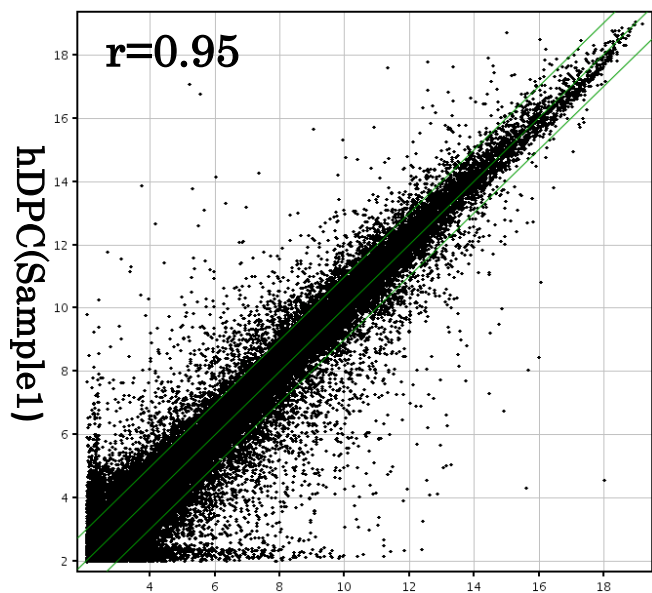
1. 多田高, 沖田圭介, 山中伸弥, 竹橋正則, 篠原美都, 篠原隆司, 山田陽一, 上田実, 青山朋樹, 戸口田淳也, 新井文用, 宮田敬士, 尾池雄一 (2009) 幹細胞の分化誘導と応用 -ES 細胞, iPS 細胞, 体性幹細胞研究最前線- 初版: 19-78. 株式会社エヌ・ティー・エス 東京
2. 大西祐一, 南野友希, 渡辺昌広, 藤井智子, 宇垣吉秀, 伊達岡聖, 井上洋士, 山本浩貴, 中嶋正博, 覚道健治 (2012) マウス ES 細胞の神経堤細胞分化に及ぼす sphere 形成と BMP4 の影響. 歯科医学 75: 59-64.
3. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282: 1145-7.
4. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126: 663-76.
5. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131: 861-72.
6. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318: 1917-20.
7. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science 321: 1218-21.
8. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 448: 313-7.
9. 上枝麻友 (2012) 炎症環境による歯髄細胞の幹細胞化 歯髄細胞分化に与える腫瘍壊死因子 (TNF- α) の影響. 岡山歯誌 31: 1-12.
10. 長畠駿一郎 (1978) 未完成歯再植に関する実験的研究. 岡山歯誌 90: 1249-74.
11. Goldberg M, Smith AJ (2004) Cells and extracellular matrices of dentin and pulp biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 15: 13-27.
12. Smith AJ (2002) Pulpal responses to caries and dental repair. Caries Res 36:

223-32.

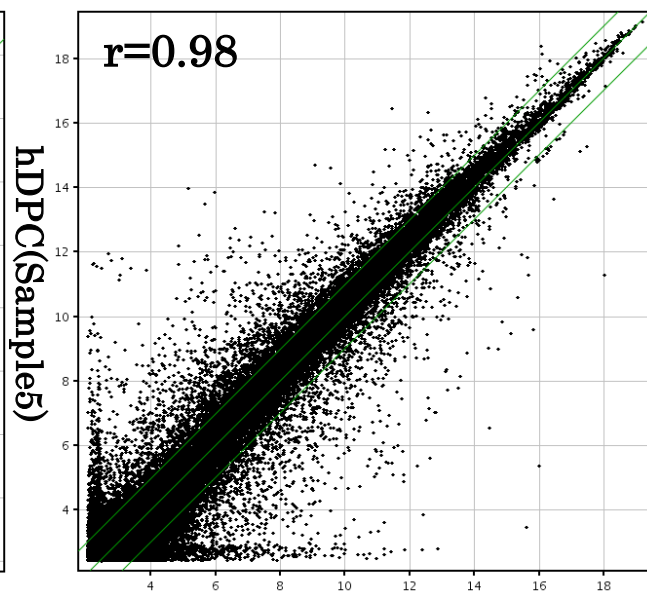
13. Muromachi K, Kamio N, Matsumoto T, Matsushima K (2012) Role of CTGF/CCN2 in reparative dentinogenesis in human dental pulp. *J Oral Sci* 54: 47-54.
14. Uchiyama M, Nakamichi Y, Nakamura M, Kinugawa S, Yamada H, Udagawa N and Miyazawa H (2009) Dental pulp and periodontal ligament cells support osteoclast differentiation. *J Dent Res* 88: 609-14.
15. Yamazaki H, Tsuneto M, Yoshino M, Yamamura K, Hayashi S (2007) Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells* 25: 78-87.
16. Yoshida T (2008) Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech Dev* 125: 797-808.
17. Miyakawa Y, Ohnishi Y, Tomisawa M, Monnai M, Kohmura K, Ueyama Y, Ito M, Ikeda Y, Kizaki M, Nakamura M (2004) Establishment of a new model of human multiple myeloma using NOD/SCID/gammac (null) (NOG) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 258-62.
18. Kawamoto T, Kawamoto K (2012) Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using Kawamoto's film method. *Methods Mol Biol* 1130: 149-64.
19. Kawamoto T (2003) Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch Histol Cytol* 66: 123-43.
20. Su YF, Lin CC, Huang TH, Chou MY, Yang JJ, Shie MY (2014) Osteogenesis and angiogenesis properties of dental pulp cell on novel injectable tricalcium phosphate cement by silica doped. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 42: 672-80.
21. Wang S, Gao X, Gong W, Zhang Z, Chen X, Dong Y (2014) Odontogenic differentiation and dentin formation of dental pulp cells under nanobioactive glass induction. *Acta Biomater* 10: 2792-803.
22. Pisciotta A, Riccio M, Carnevale G, Beretti F, Gibellini L, Maraldi T, Cavallini GM, Ferrari A, Bruzzesi G, De Pol A (2012) Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 7: e50542.
23. Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997)

Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386: 78-81.

24. Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R, Ueda M (2006) Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between humandental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering celltherapy. *Biomaterials* 27: 3766-81.
25. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Millan JL (2002) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9445-9.
26. Coyac BR, Chicatun F, Hoac B, Nelea V, Chaussain C, Nazhat SN, McKee MD (2013) Mineralization of dense collagen hydrogel scaffolds by human pulp cells. *J Dent Res* 92: 648-54.
27. 新倉隆宏, 李相亮, 古賀敬章, 堂垣佳宏, 奥町悦子, 黒坂昌弘 (2012) 低出力超音波パルスは骨折血腫由来細胞の骨・軟骨分化を促進し骨癒合促進に作用する. *骨折* 34: 1-4.
28. Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Hoshi K, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Okabe T, Sahara N, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H (2007) Hard tissue formation in subcutaneously transplanted rat dental pulp. *J Dent Res* 86: 469-74.
29. Honda M, Kiyokawa J, Tabo M, Inoue T (2011) Electrophysiological Characterization of Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J Pharmacol Sci* 117: 149-59.



ヒト骨髄由来間葉細胞



ヒト骨髄由来間葉細胞

図1 マイクロアレイ解析による総括的な遺伝子発現パターン

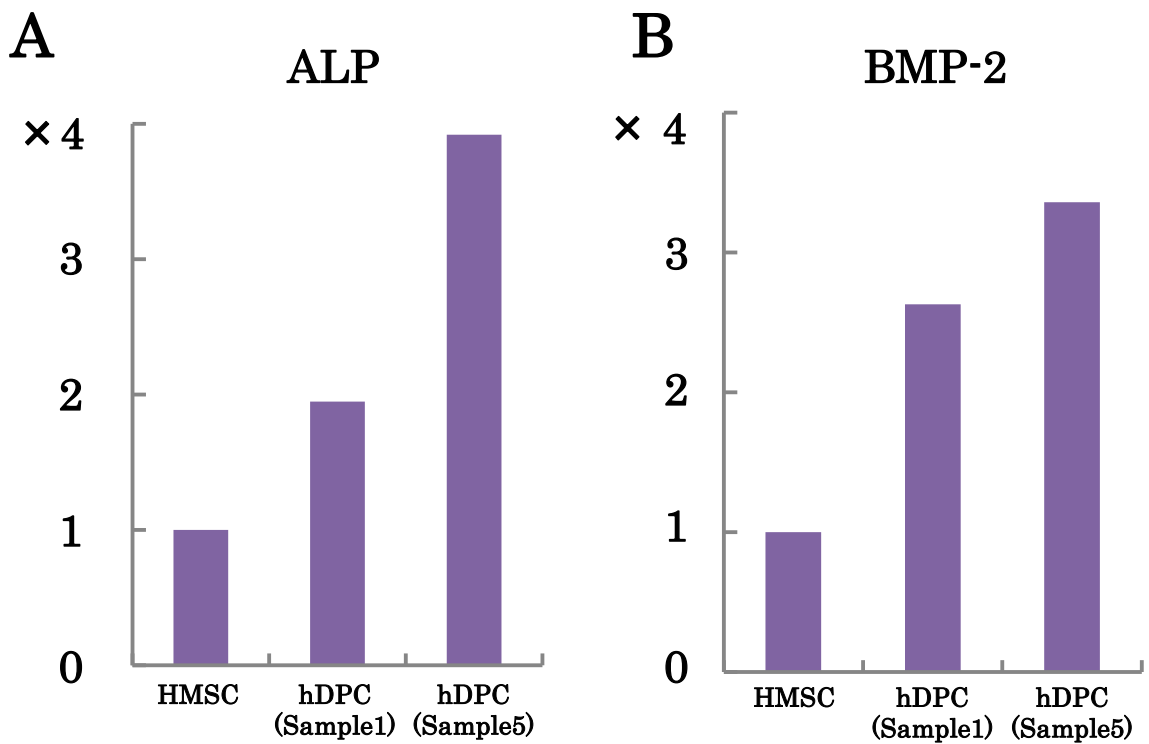
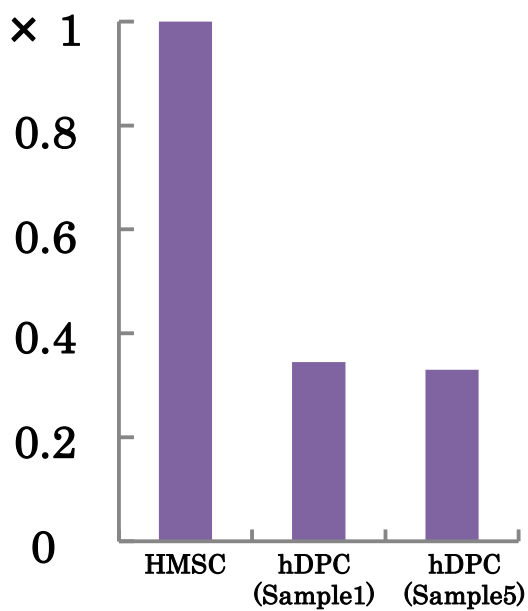


図2 マイクロアレイ解析による石灰化促進因子の発現量の比 (HMSCを1とした場合)

A

ENPP1



B

MGP

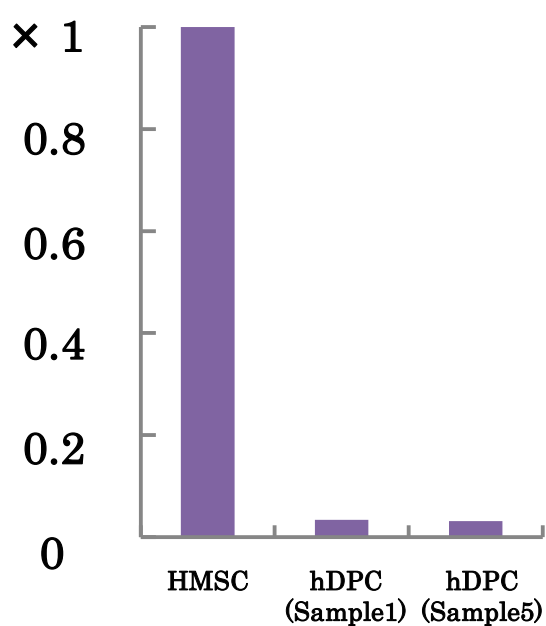


図3 マイクロアレイ解析による石灰化抑制因子の発現量の比 (HMSCを1とした場合)

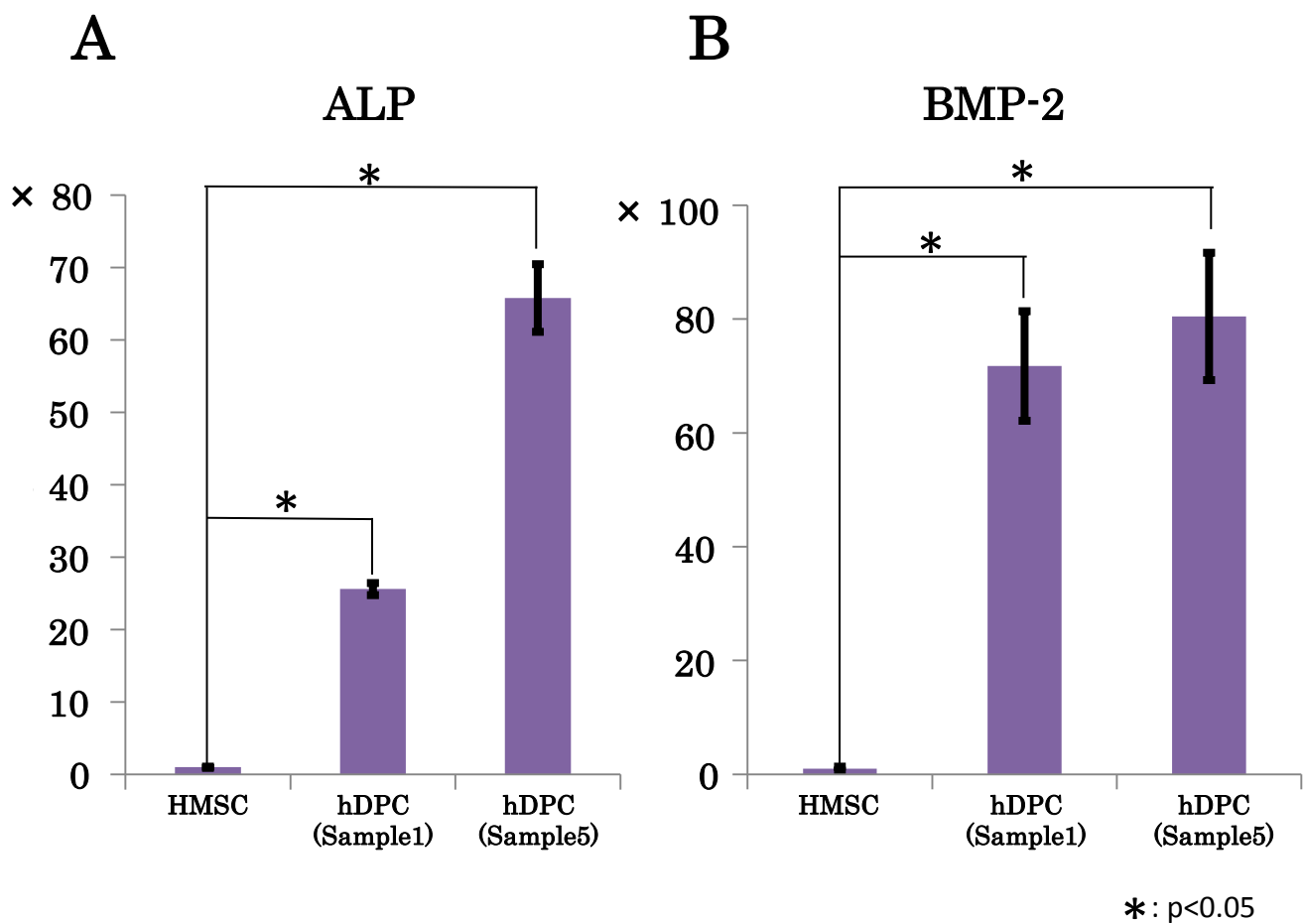


図4 リアルタイムPCR法による石灰化促進因子mRNA発現レベル (HMSCを1とした場合)

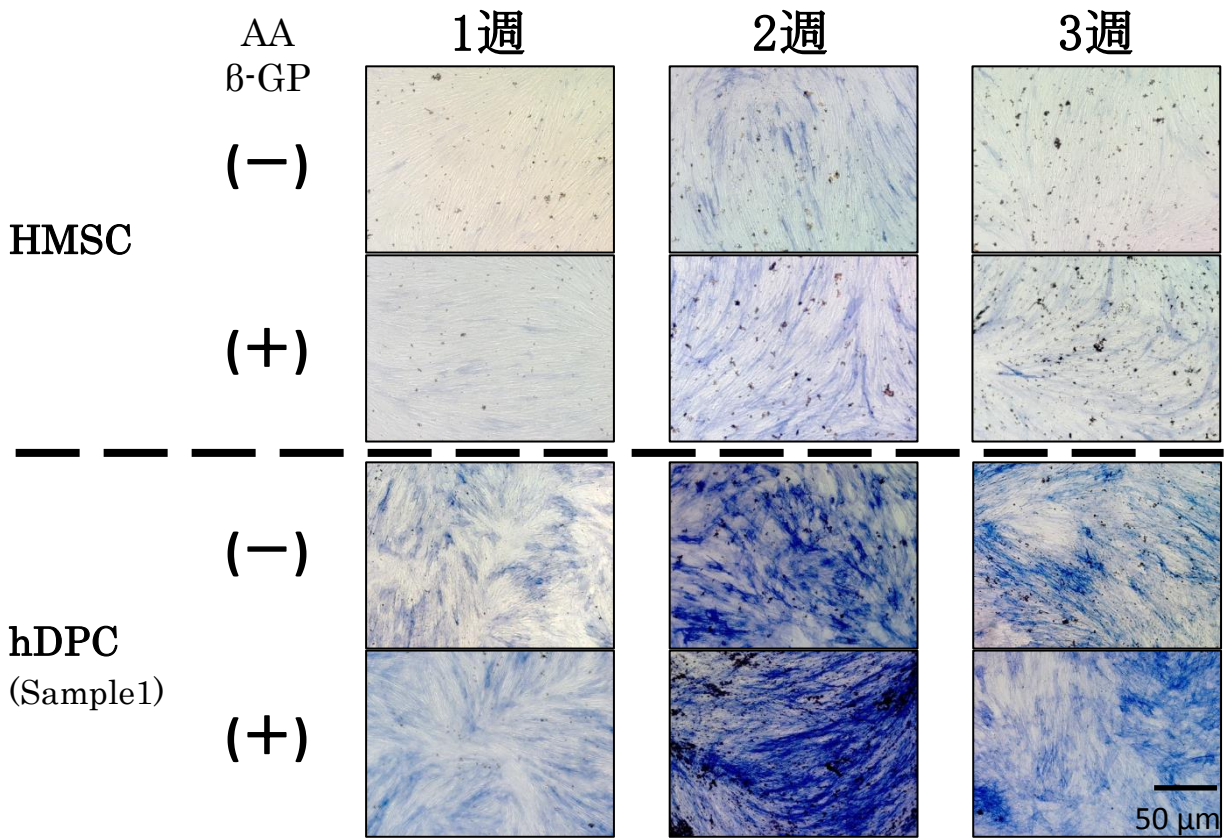


図5 hDPCとHMSCのALP染色像

hDPCは、HMSCと較べ培養開始1週で強いALP染色像を示す。
hDPCのALP染色は、2週でピークに達している。3週での比較でもhDPCの方が強いALP染色像を示している。

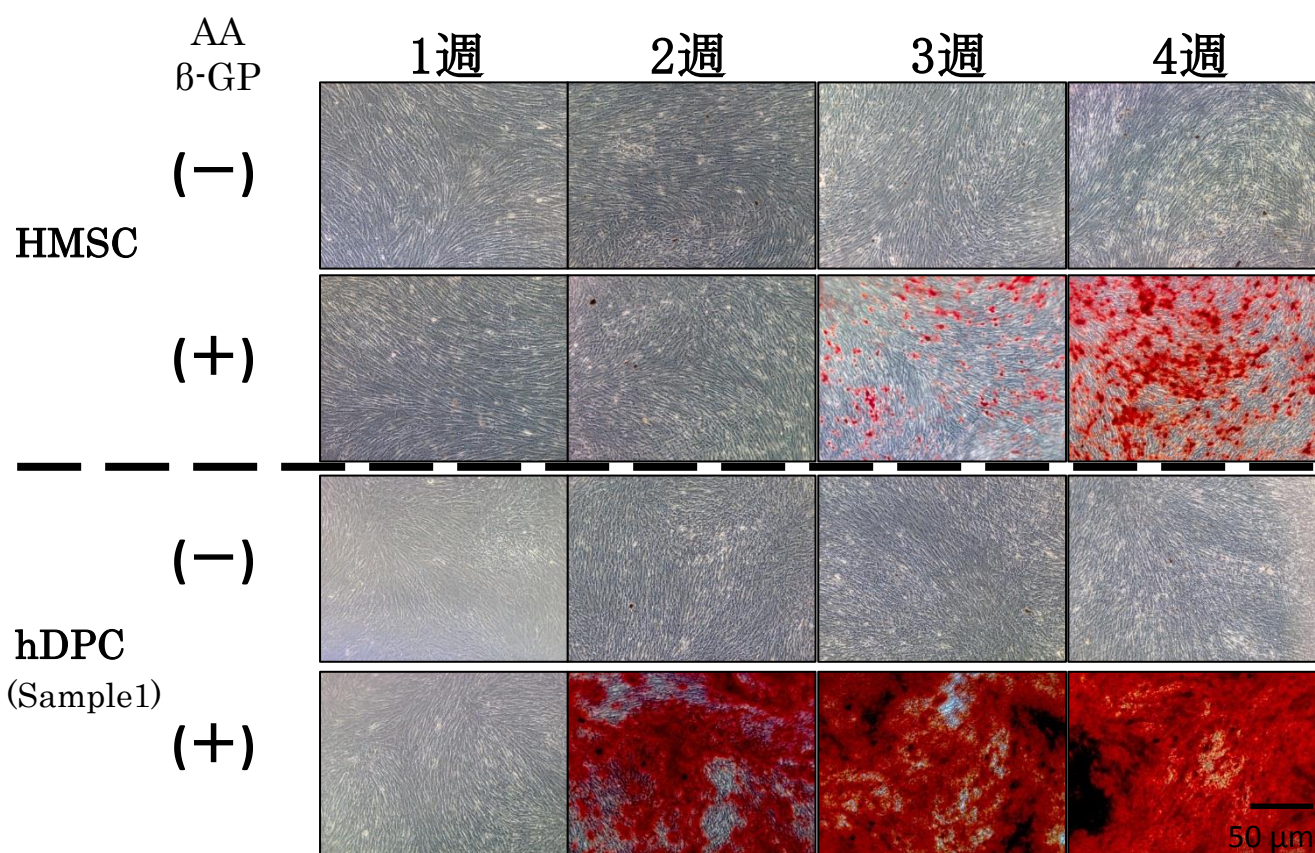


図6 hDPCとHMSCの石灰化能の検討（AR染色）

培養開始1週ではAR染色像で両者共に石灰化は認められない。

培養開始2週でAAとβ-GPを加えた培養条件では、hDPCはHMSCに較べ顕著に強いAR染色像を示している。

2週ではHMSCは石灰化物の析出を認めない。培養開始3週、4週では両細胞で石灰化物の析出が継時的に増加している。

HMSCにおける石灰化物の析出が実験期間中にhDPCより強くなることはない。AAとβ-GP非添加の培養条件では両細胞とも石灰化物の析出はなく、AR染色像は認められない。

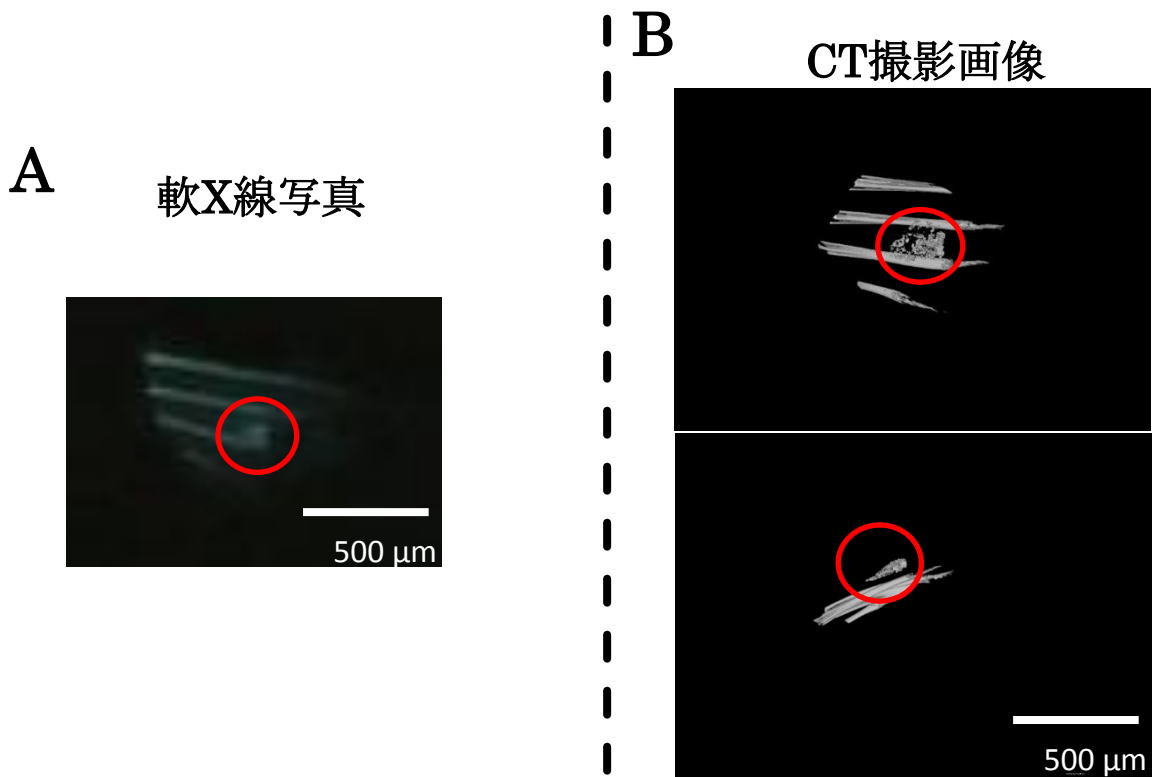
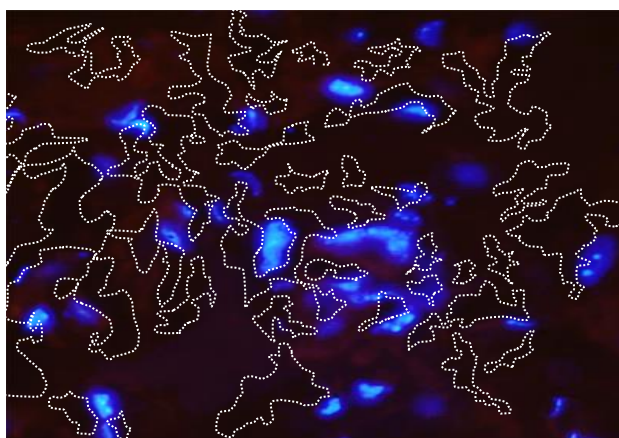


図7 hDPC埋入2ヶ月後の摘出移植片

(A)hDPCを埋入した部位には、肋骨に較べ石灰化度の低い、境界明瞭な不透過像を認める。
(B)同組織片をmicro CTにて撮影し、水平に並ぶ肋骨の間に顆粒状に形成された石灰化物を認める。

A 青 : DAPI
赤 : コントロールIgG



B 青 : DAPI
赤 : ヒト Vimentin

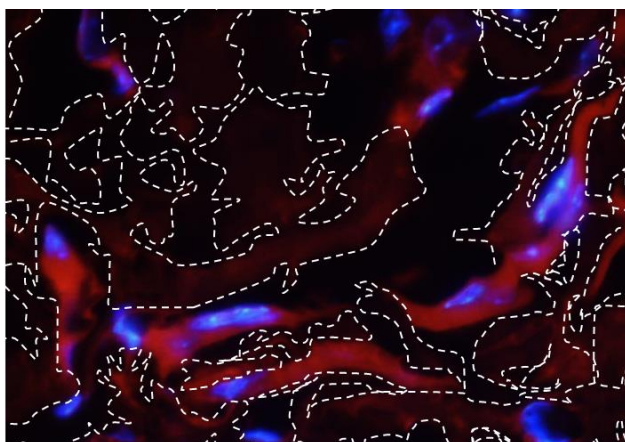


図8 *in vivo*において形成された石灰化物の組織学的解析

点線で囲まれる部分はゼルフォームのコラーゲン線維を示している。hDPCの足場であるゼルフォームに近接して赤色に染まるヒトビメンチン陽性細胞を認める。

表1 hDPCの詳細

	年齢	性別	歯種
No.1	13	女性	上顎第一小臼歯
No.2	19	男性	上顎第一小臼歯
No.3	15	女性	下顎第一小臼歯
No.4	27	女性	下顎第一小臼歯
No.5	22	女性	下顎第二小臼歯
No.6	15	男性	上顎第一小臼歯
No.7	24	男性	上顎第一小臼歯

各実験に使用したSample

マイクロアレイ解析 No.1,5

Real Time PCR No.1,5

ALP染色 No.1~7

AR染色 No.1~7

埋入実験 No.1

表2 Real Time PCR法に用いたプライマー塩基配列

Gene	Sequence
ALP	(forward)5'-CATGCTGAGTGACACAGACAAGAA-3'
	(reverse)5'-ACAGCAGACTGCGCCTGGTA-3'
BMP-2	(forward)5'-GGAACGGACATTCGGTCCT-3'
	(reverse)5'-GGAAGCAGCAACGCTAGAAG-3'