

氏名	徳田 吉彦
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第199号
学位授与の日付	2015年3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	ヒト歯髄細胞の分子生物学的解析
指導教員	(主) 教授 山田 一尋 (副) 教授 宇田川 信之 (副) 教授 高橋 直之
論文審査委員	主査 教授 川上 敏行 副査 教授 音琴 淳一 副査 講師 落合 隆永

学位論文の内容の要旨

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ンタンパク (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比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、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比べ 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比べ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。

学位論文審査の結果の要旨

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い出した。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との結論を得た。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おり、この研究は今後の再生医療において重要な示唆を与える可能性を秘めた研究であると考えられ、学位論文に値するものと判断された。

最終試験の結果の要旨

学位申請論文を中心に口頭と一部筆記による試験を行った。主要な質問事項（順不同）は次のとおりである。

- 1) 試料採取の手法について詳細に説明しなさい。
- 2) 歯髄の構成細胞の初期発生時の胚葉由来について説明しなさい。
- 3) 今回形成された「石灰化物（硬組織）」について詳細に説明しなさい。
- 4) 歯髄細胞に含まれている「外胚葉性間葉」と「中胚葉性間葉」の違いが再生医療に影響するのか。
- 5) この研究を発展させる研究の方向性について説明しなさい。

以上の質問に対して、申請者は最新の文献的知見も踏まえて適切な回答した。また、申請者は、実験より得られた結果に対して適切な考察が行える専門的知識があり、博士課程修了者として十分な知識と学力を有しているものと判断された。本審査委員会は、申請者を博士（歯学）として十分な学識を有するものと認定、最終試験合格との結論に至った。