

研究者：赤澤 友基（所属：徳島大学病院 医員）

研究題目：乳歯歯髄細胞株の樹立と歯髄細胞による神経再生医療への応用 法の探索

目 的：

近年、様々な幹細胞が発見、着目される中で、通常廃棄される脱落乳歯の歯髄にも幹細胞が存在することが発見された。乳歯歯髄の間葉系幹細胞は、*in vivo* では神経細胞のマーカーを発現することが示されている。*in vitro* においても骨様組織・象牙質を形成、神経細胞への分化など、胚葉を越えて高い分化能を示すことが知られている（Miura, et al., PNAS 2003）。永久歯の萌出によって自然脱落し廃棄される乳歯歯髄は、容易に採取が可能で、細胞増殖力が高く、硬組織の内部にあることから遺伝子の損傷が少ない。これらの理由から幹細胞の供給源としての期待が高まっている。しかし、研究を行うにあたり、ヒト分離細胞での研究は細胞の供給・実験回数に限りがあり詳細な解析は困難である。そのため、本研究では乳歯歯髄の分離細胞に *human telomerase reverse transcriptase (hTERT)* 遺伝子を導入して、ヒト乳歯歯髄細胞から細胞株の樹立を行ったことを報告する。また現在、この細胞株の形質解析を行っている最中であり、その経過も報告する。今後さらに神経細胞、血管などへの分化誘導機構を解析し、再生医療への可能性を模索する。

そして、将来的には、この研究結果を利用して中枢神経疾患のうち記憶を司る海馬歯状回における再生医療への応用法を開発することを目的とする。海馬歯状回では neurogenesis が起こっているが、アルツハイマー病や頭部外傷、統合失調症や心的外傷後ストレス障害（PTSD）により海馬歯状回が委縮することも知られている。この委縮した海馬に対し、乳歯歯髄由来の幹細胞を移植するという考えから、生着した細胞が神経に分化するような条件を探索し、また、自身の神経幹細胞からの neurogenesis が促進されるような細胞環境を検討する。

対象および方法：

徳島大学病院小児歯科を受診し、治療のために抜歯を行った乳歯から採取した歯髄組織を用いて、以下の実験を行った（本研究は倫理委員会の承認を得ている）。

1. 乳歯歯髄細胞の分離

当院小児歯科を受診し、咬合誘導を目的、または晩期残存のため抜去した乳歯より歯髄組織を無菌的に分離し、組織を可及的に細切後、2 mg/ml コラゲナーゼ溶液によって 37℃、15 分消化し、径 35 mm dish に播種した。1：4 で継代後、径 100 mm dish に播種し直し、必要な細胞数を獲得し、以下の実験に使用した。

2. *hTERT* 遺伝子導入

分離した歯髄細胞に対して neomycin 耐性遺伝子を持つ pBABE-neo-*hTERT* plasmid（Addgene plasmid 1774, provided by Addgene Inc. Cambridge, MA, USA）の遺伝子導入を LipofectamineTM LTX（Invitrogen）を使用して行った。stable transfectant の細胞を分離する

ために G418 (GIBCO-BRL) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を投与して selection を行った。選択培地中で 12 – 15 日培養後、生存した細胞の継代を繰り返し、径 100 mm dish に confluent になるまで培養を行った。

3. Single cell cloning

96-well plate (Corning) に細胞が 0.5 個 /well になるように播種した。その後、細胞数が 1 個 /well の細胞の継代を繰り返して培養を行った。Single Cell Cloning で得られた clone を Deciduous Dental Pulp (DDP) と名付けた。

4. RT-PCR

DDP2, 7, 11 の 50 PDs 以上の clone について RT-PCR を行い、*hTERT* 遺伝子および歯髄発現の報告のある遺伝子の発現確認を行った。Positive control として、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 (human mesenchymal stromal cell derived from bone marrow : MSC) を使用した。

5. Odontogenic differentiation

DDP2, 7, 11 を 10% FBS α -MEM, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid (Nakarai Tesque) および 6 mM β -glycerophosphate (β -GP, Sigma, USA) で培養を行った。培地は 2-3 日毎に交換を行った。培養 4 週間後、10% formaldehyde で固定後、von Kossa 染色を行った。

6. Adipogenic differentiation

DDP2, 7, 11 を 10% FBS α -MEM, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid および 0.5 mM Isobutylmethylxanthine, 0.5 μM Hydrocortisone, 60 μM Indomethacin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin で培養を行った。培地は 2-3 日毎に交換を行った。培養 4 週間後、10% formaldehyde で固定後、Oil Red O 染色を行った。

結果および考察：

1. hTERT 遺伝子導入による乳歯歯髄細胞株の樹立

hTERT 遺伝子安定的発現細胞の single cell cloning 後、26 clone の分離に成功した。そのうち 3 つの細胞株に DDP2, 7, 11 と名付け、細胞倍加指数の検討を行った。図 1 より、Hayflic limit の 50 回を越えて細胞分裂していることから、DDP2, 7, 11 細胞株は不死化していることが考えられた。

上記 3 つの細胞株について、RT-PCR 法を用いて clone に *hTERT* mRNA の発現を確認した (図 2)。また、TRAP assay にて hTERT 活性の確認を行った (図 3)。

今回作製した DDP2, 7, 11 のそれぞれの細胞は、間葉系幹細胞マーカーである CD146 および Abcg2 の発現がみられた。また、培養後、象牙芽細胞マーカーである DSPP および DMP-1 の遺伝子発現を確認したところ、すべての細胞で遺伝子発現を認めた (図 4)。

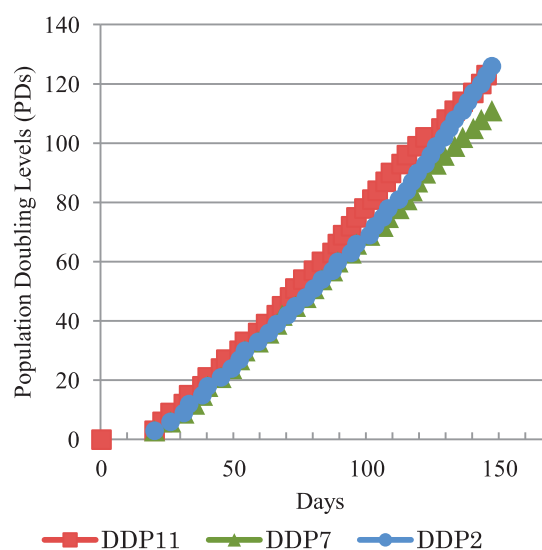


図 1 *hTERT* 遺伝子導入後の乳歯歯髄細胞の細胞倍加指数

2. 乳歯歯髄細胞株の分化能の確認

1) 骨芽細胞への分化

樹立した3つの乳歯由来歯髄細胞株の形質を解析した。歯由来の組織に含まれるとされる間葉系幹細胞は *in vitro* において骨芽細胞様細胞に分化し、石灰化結節を形成することが一般に知られている。そこでそれぞれの細胞株の骨分化能を比較した。Positive controlとして、骨芽細胞分化誘導能を有する間葉系幹細胞細胞株（MSC）を用いた。

石灰化能を確認するために、培養4週間後の von Kossa 染色を行ったところ、DDP2, DDP7は結節を形成するが、石灰化は認められなかった（図5-A）。DDP11は染色陽性であり、石灰化結節を形成すると考えられた。

また、骨芽細胞へ分化誘導した DDP2, 7, 11 細胞株において、RT-PCR 法にて骨芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現確認を行ったところ、すべての細胞で骨芽細胞分化マーカーの発現がみられた

2) 脂肪細胞への分化

歯由来の間葉系幹細胞は同様に、*in vitro* において脂肪細胞様細胞にも分化し、脂肪滴を形成することも知られている。したがって、上記と同様の細胞を脂肪細胞へ分化誘導を行い、それぞれの細胞株の解析を行った。Positive controlとして、骨芽細胞分化誘導能を有する間葉系幹細胞細胞株（MSC）を用いた。

培養4週間後に Oil Red O 染色を行ったところ、すべての細胞株で陽性細胞を確認したが、DDP11 > DDP7 > DDP2 の順であった。（図6-A）

また、それぞれの細胞株を脂肪細胞へ分化誘導し、RT-PCR 法により、脂肪細胞の分化マーカー遺伝子の発現確認を行ったところ、すべての細胞で脂肪細胞分化マーカーの発現がみられた（図6-B）。

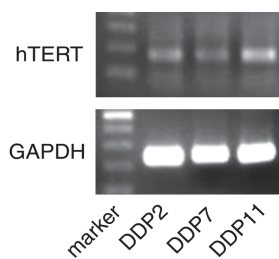


図2 hTERT 遺伝子発現の確認

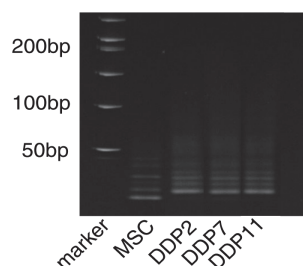


図3 hTERT 活性の確認

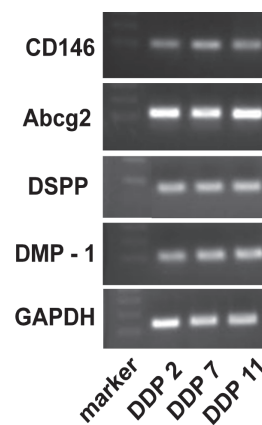


図4 歯髄マーカー遺伝子の確認

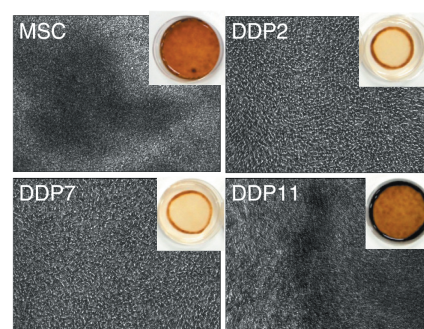


図5-A von Kossa 染色による石灰化の確認

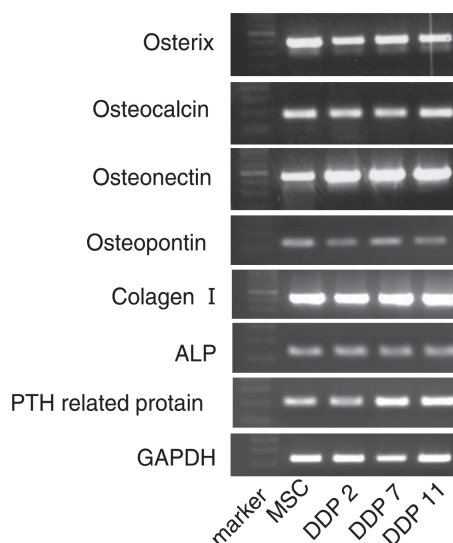


図5-B 骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現確認

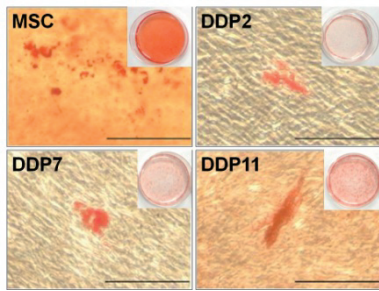


図 6-A Oil Red O 染色による脂肪細胞の確認
Scale Bar : MSC のみ 200 μm , 他 100 μm

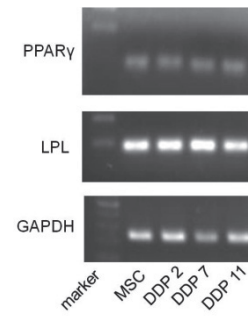


図 6-B 脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現確認

成果発表：(予定を含めて口頭発表，学術雑誌など)

* 日本小児歯科学会

* 歯科基礎医学会

* 現在，論文作成中。投稿雑誌は未定。