

研究者：井葉野 夏実

(所属：朝日大学 口腔構造機能発育学講座 小児歯科学分野 ポストドクター)

研究題目：幹細胞特性維持のための新たな初代培養法の開発

目的：

ヒト乳歯に由来するヒト乳歯歯髄細胞（HDDPC）は、幹細胞を多量に含み、多分化能を持つことが特徴である。我々は HDDPC の持つ幹細胞が組織再生に活用できると考え、研究を行ってきた。

しかし、HDDPC の初代培養において、従来法では歯髄採取後の細胞生着率が低く、かつ取得できる細胞数が少なく、実験用に大量の細胞を取得するため継代を重ねると、歯髄幹細胞が徐々に減少してしまうことが大きな問題であった。本申請では、少量の歯髄組織からでも幹細胞特性を有する HDDPC を容易に、かつ継続的に単離できる新しい方法の有用性を証明することを目的とした。

対象および方法：

【SCRATCH 法による HDDPC の効率的取得】

10 名の健常児脱落乳歯から歯髄を採取し、各種抗生物質を含む培地に浸漬する。その後、メスで歯髄を切断し、collagenase type I などを含む溶液で 37°C、30 分加温し、酵素処理を行う。その後、歯髄を MEMα を含むゼラチンコート 35mm dish に移し、培養皿表面にメスで歯髄を擦りつける。これにより、歯髄は培養皿表面のプラスチックに食い込み、多少の pipetting でも剥がれない。その後、歯髄組織から細胞が増殖したら、トリプシン処理し細胞を回収する。これを繰り返し、SCRATCH 法による歯髄の継代可能な回数、継代までに要する日数、継代毎の取得細胞数の増減などを記録し、各歯髄組織からどの程度の細胞数が取得できるか検討する。

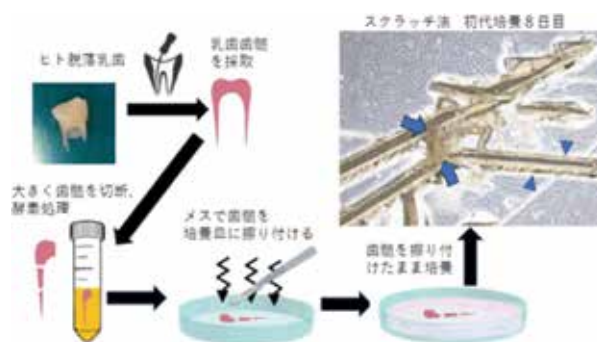


図1 SCRATCH 法による初代培養の概念図
採取した歯髄組織をメスにて培養皿の底に接着させて継続的に培養を行う。

【SCRATCH 法で採取した HDDPC の特性解析】

SCRATCH 法で取得した HDDPC から cDNA の抽出を行い、RT-PCR により幹細胞マーカー (OCT-3/4、SOX2、NANOG など) の発現を調べる。また、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色を行うことで、未分化性を確認する。一方、分化多能性の有無を調べるため、骨分化能および神経分化能を調べる。更に免疫細胞化学染色を行い、幹細胞マーカーの細胞内局在性を調べることで、HDDPC において幹細胞特性がプロテインレベルで維持されていることを確認する。

【HDDPC への遺伝子工学的処置】

単離した HDDPC に対し、pTrans + pT-EGFP + pT-neo を含むプラスミド溶液の中で Neon[®] を用いた電気穿孔法にて HDDPC に遺伝子導入を行う (図 3 参照)。遺伝子導入後培養 4 ~ 5 日目に細胞がサブコンフルエントまで増殖することを確認し、G418 含有培地にて neomycin 遺伝子導入細胞であり、かつ EGFP を発現する株を選別する。

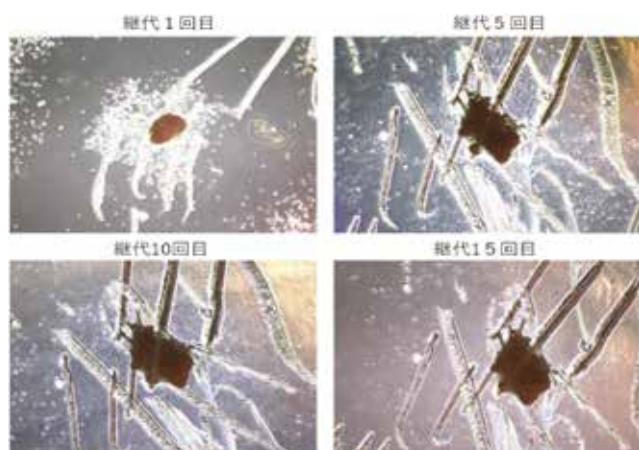


図2 繰り返し継代を行った歯髄組織と細胞増殖像
繰り返し継代し、継続的に培養を行った。歯髄組織を中心に細胞が増殖する。

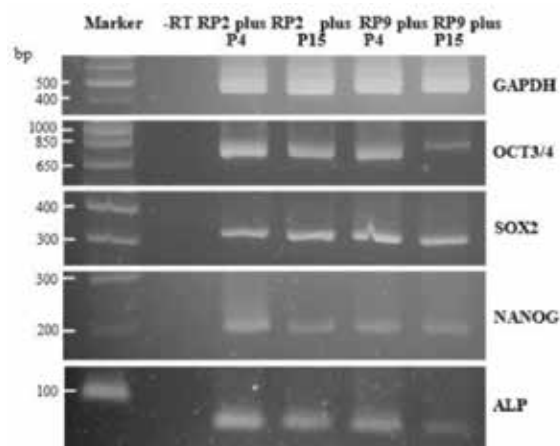


図3 RT-PCR
OCT3/4、SOX2、NANOG などの未分化マーカーはいずれの細胞においても発現が維持され、ALP については継代数が増加することで遺伝子発現が減弱していた。

結果および考察：

まずは健常児脱落乳歯から歯髄を採取して、SCRATCH 法を活用した場合において、細胞の回収を行えたものは 95% に及んでおり、非常に高い確率での初代 HDDPC の回収が可能であった。またこれは早期脱落した乳歯だけでなく、歯髄炎となっている歯髄組織を抜髄したものや、低ホスファターゼ症などの全身疾患を有している患児においても、初代 HDDPC の回収に成功していることから、健常児や全身疾患を有する患児に問わず応用することが可能であることが考えられた。また培養時におけるコンタミネーションは全例において認めなかった。また今回失敗した例においては、回収時点での歯髄組織量が極微量であったために、細胞が十分に増殖することができなかったことが考えられる。

上記で得られた SCRATCH された歯髄組織の培養においては、Trypsin による継代を行い、そこに培地を加えて再度培養を行うことが可能であった。その繰り返しの継代数はおよそ 15 回は可能であったことから、歯髄組織由来の初代 HDDPC を安定的に大量に取得することが可能であった。

これらの繰り返し継代を行って取得した細胞たちを培養し、2 回の繰り返し継代後にさらに 4 回と 15 回の継代を行った細胞と、9 回の繰り返し継代後にさらに 4 回と 15 回の継代を行った細胞について、RT-PCR を行うことで遺伝子解析を行った。その結果、OCT3/4、SOX2、NANOG などの未分化マーカーについて、いずれの細胞においても発現が維持されていた。また ALP については継代数が増加することで、遺伝子発現が減弱していた（図 3）。

また各細胞において ALP 染色を行ったところ、継代数に限らず ALP 染色が維持されていた。その染色性については、継代を繰り返すことで徐々に減退傾向をしていたが、少なくとも 10 回の繰り返し継代を行った細胞における ALP 染色性は維持されることがわかった（図 4）。

また各細胞に免疫染色を行ったところ、未文化マーカーである OCT3/4 については 2 回と 9 回の繰り返し継代を行った細胞においてほぼ同等の発現を認めた（図 5）。

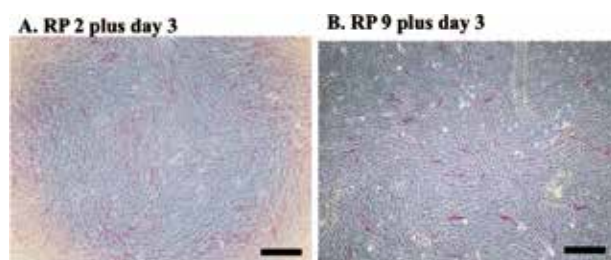


図 4 ALP 染色

A：繰り返し継代 2 回、3 日間培養

B：繰り返し継代 9 回、3 日間培養。継代数に限らず ALP 染色が維持されていた。

Bar：100 μ m

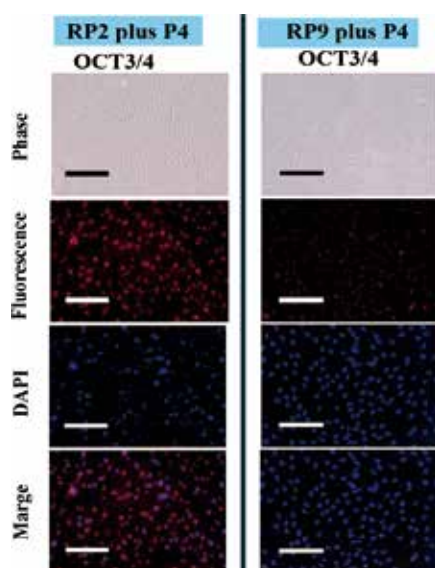


図 5 免疫染色

OCT3/4 は 2 回と 9 回の繰り返し継代を行った細胞においてほぼ同等の発現を認めた。

Bar：100 μ m

上記の結果を踏まえて、SCRATCH 法は歯髄組織における初代培養方法として、ほぼ全ての症例において活用することが可能であると考えられる。従来法においては、回収した歯髄組織を酵素処理して細胞単離する場合は、炎症のない健常な歯髄組織が求められていたが、本手法は歯髄が著しく壊死していない限りは初代 HDDPC の回収が容易である。また従来法は1個の歯髄組織からは1度の初代 HDDPC しか回収できないが、本手法では繰り返しの初代 HDDPC が回収可能であり、さらに未分化性を維持した状態で、細胞を得られることがメリットとして挙げられる。このことから、SCRATCH 法は初代 HDDPC の取得に有効であることが考えられた。

今回は、SCRATCH 法で得られた HDDPC の特性解析をメインで行っており、EGFP などの遺伝子工学処置まで行うことができなかった。今後 HDDPC に対して遺伝子導入を行うことで、患者由来の HDDPC が実際に再生研究へと応用が可能であるか検討を行っていく予定である。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

Journal of Clinical Medicine へと投稿予定