

論文要旨等報告書

氏	村上 薫
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3581 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	培養ヒト歯根膜細胞における幹細胞特性の解析

論文審査委員 教授 吉山 昌宏 教授 山城 隆 教授 窪木 拓男

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年、再生医療という新しい医療が注目されてきている。再生医療を実現するためには、適切な幹細胞を用いてそれぞれの組織を再生させていく必要がある。幹細胞は、胚性幹細胞 (Embryonic stem cells: ES 細胞) と体性幹細胞 (Somatic stem cells または Adult stem cells) に大別される。体性幹細胞は、ES 細胞と比較すると多分化能の面では劣ると考えられているが、自己由来の幹細胞を用いることができるため、ES 細胞を用いる際に問題となる倫理的・宗教的問題、組織適合性や奇形腫形成などの問題を克服できるという利点がある。歯科領域においては、体性幹細胞の一つとして歯根膜幹細胞の存在が知られている。歯根膜は抜去された健全歯から非侵襲的に容易に採取・単離することが可能であるため、そこに存在する歯根膜幹細胞は再生医療に用いる幹細胞の理想的な供給源の一つであると考えられる。しかし、その性質についてはまだ十分に解明されていない。そこで、本研究ではこの歯根膜幹細胞の特性を解明するために、ヒト歯根膜細胞の持つ未分化な表現型について検討を行った。

【資料および方法】

本研究は岡山大学医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認のもとに行われた。提供を受けた健全抜去歯から歯根膜を採取し、培養を行った細胞を実験に使用した。タンパク質の発現は、フローサイトメトリー、免疫細胞化学を用いて検出した。脂肪細胞・骨芽細胞・神経細胞への分化は分化誘導培地を用い培養し、光学顕微鏡もしくは蛍光顕微鏡下にて観察を行った。mRNAの発現は、RT-PCRを用いて発現量を半定量的に評価した。

【結果】

- 1.培養ヒト歯根膜細胞は、丸い核と細胞突起および紡錘形の外形を特徴とする線維芽細胞様の形態を呈し、CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD166等の間葉系幹細胞マーカーの発現が認められた。また、脂肪細胞・骨芽細胞・神経細胞への分化が認められた。
- 2.培養ヒト歯根膜細胞では、全細胞集団に対して約3.9%のSP細胞分画が認められた。また、ABCトランスポーター阻害剤である verapamil, reserpine の添加により SP細胞分画は90%以上減少した。さらに、ABCトランスポーターである ABCG2 の陽性細胞が約0.25%認められた。加えて、ABCG2 mRNA は Non-SP分画より SP分画で高い発現が認められた。
- 3.培養ヒト歯根膜細胞には、ヒト胚性幹細胞に特異的な表面抗原である SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 陽性細胞がそれぞれ約3.26%, 29.42%, 0.42%, 0.21%認められた。また、SSEA-1 陽性細胞も約1.13%検出された。ヒト胚性幹細胞関連転写因子である OCT4 (99.19%), NANOG (99.95%), SOX2 (99.91%), REX1 (96.43%) の発現はほぼすべての歯根膜細胞において認められた。蛍光免疫細胞化学でも同様に SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, OCT4, NANOG, SOX2, REX1 の全ての抗原の発現が認められた。

【考察および結論】

培養ヒト歯根膜細胞は、骨髄間葉系幹細胞と同様の形態、および表面抗原遺伝子の発現パターンおよび分化能を持っており、間葉系幹細胞表現型を有する細胞を含んでいた。また、多くの幹細胞に共通して認められるSP表現型を有する細胞を含んでおり、それはABCG2に依存的であった。さらに、胚性幹細胞に特徴的に認められる表面抗原分子、転写因子を発現しており、胚性幹細胞表現型を有する細胞を含んでいた。以上より、培養ヒト歯根膜細胞は、間葉系幹細胞表現型・SP表現型・胚性幹細胞表現型という表現型を有する細胞を含んでおり未分化な性質を持つ細胞が存在することが示された。本研究では、健全抜去歯より採取できる培養ヒト歯根膜細胞は、これまで考えられていた以上に多くの未分化な性質を持つ細胞であることが示された。これにより、培養ヒト歯根膜細胞は再生医療における今後の研究や臨床応用において、大きな可能性を持つ細胞であるということが示唆された。

論文審査結果の要旨

近年の研究により、ヒト歯根膜に未分化な幹細胞が存在することが明らかとなってきた。歯根膜は抜去された健全歯から非侵襲的に容易に採取・単離することが可能であるため、そこに存在する歯根膜幹細胞は再生医療に用いる幹細胞の理想的な供給源の一つであると考えられる。しかし、その性質についてはまだ十分に解明されていない。そこで、本研究ではこの歯根膜幹細胞の特性を解明するために、ヒト歯根膜細胞の持つ未分化な表現型について検討を行った。提供を受けた健全抜去歯から歯根膜を採取し、培養を行った細胞を実験に使用した。タンパク質の発現は、フローサイトメトリーや免疫細胞化学的手法を用いて検出した。脂肪細胞・骨芽細胞・神経細胞への分化は分化誘導培地を用い培養し、光学顕微鏡もしくは蛍光顕微鏡下にて観察を行った。mRNA の発現は、RT-PCR を用いて発現量を半定量的に評価した。

その結果、培養ヒト歯根膜細胞の一部は、骨髄間葉系幹細胞と同様の形態、表面抗原遺伝子の発現パターンおよび分化能を持っており、間葉系幹細胞表現型を有していること、また多くの幹細胞に共通して認められる SP 細胞表現型を有しており、それは代表的な ABC トランスポーターである ABCG2 に依存的であること、さらに胚性幹細胞に特徴的に認められる表面抗原分子・転写因子を発現しており、胚性幹細胞表現型を有していることが示された。以上より、培養ヒト歯根膜細胞には、間葉系幹細胞表現型や SP 細胞表現型、胚性幹細胞表現型を示し未分化な性質を持つ細胞が存在することが示された。本研究では、健全抜去歯より採取できる培養ヒト歯根膜細胞は、これまで考えられていた以上に未分化な性質を持つ細胞を含んでいることが示された。これにより、培養ヒト歯根膜細胞は再生医療における今後の研究や臨床応用において、大きな可能性を持つ細胞であるということが示唆された。

本研究は培養ヒト歯根膜細胞の一部が、間葉系幹細胞表現型や SP 細胞表現型、胚性幹細胞表現型という未分化な表現型を示すことを初めて明らかにしたという点において多大な新規性がある。また本研究は、ヒト歯根膜幹細胞に対する未知の新しい知見を確認したという点において新規性の高い基礎的研究であることが高く評価され、本論文審査委員会は、全会一致で、本学位申請論文が博士（歯学）の学位を授与されるに値する論文であると認めた。