

## 論文要旨等報告書

氏名	岡本 洋介
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 3 8 3 1 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬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	Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells(DPSCs) in vitro and in vivo(シンバスタチンによるヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化促進)
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】

歯髄を構成する細胞を分化・増殖因子を用いて活性化することによって象牙質を再生もしくは修復象牙質の形成を促進させようとする試みがなされており、高い象牙質形成促進効果が報告されているものもある。しかしながら、これらの分化・増殖因子を用いる手法はその安全性や生産コストが問題となっており、いまだ臨床応用には至っていない。

一方、高脂血症治療薬であるスタチンは、コレステロール産生を抑制するだけでなく、BMP-2 経路を介して、骨芽細胞や間葉系幹細胞の骨系分化促進効果を持つことが知られている。しかしながら、スタチンが象牙質形成細胞に与える影響はいまだ明らかとなっていない。安価で安全性の確認されているスタチンが象牙質形成促進効果を有するならば、生物学的に象牙質形成を促進する新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

そこで、本研究では、象牙質形成能を有することで知られている歯髄幹細胞(Dental Pulp Stem Cells; DPSC)をヒトから分離し、代表的なスタチンであるシンバスタチンが本細胞の細胞動態へ与える影響を *in vitro*, *in vivo* で検討した。

#### 【方法】

1. DPSC の分離と培養:岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の許可(承認番号 # 418, # 433)のもと、便宜的に抜去したヒト第三大臼歯(5名, 7本, 22-26歳)を得た。この抜去歯より、Gronthosらの方法(2000)に準じてDPSCを分離した。分離した細胞は15%ウシ胎児血清を含む $\alpha$ -MEMで継代、培養し、Dentin Sialophosphoprotein(DSPP)遺伝子の発現を確認したうえで3-6継代の細胞を以降の実験に供した。

2. 細胞増殖:培地にスタチンを0.1, 1, 10  $\mu$ Mの濃度で添加し、1, 3, 5日後の生細胞数を、MTS法により評価した。また、シンバスタチンのDPSCにおける作用経路を確認するため同時にメバロン酸を添加して、同様に生細胞数を評価した。なお、陽性対象として象牙質形成促進作用が報告されているBMP-2(100ng/ml)を用いた。

3. 細胞骨格形成:無血清培地中で3日間培養した細胞にシンバスタチンを作用させ、2日後にファロイジンを用いてアクチン繊維を染色し、蛍光顕微鏡下でアクチン繊維の形成を評価した。

4. 細胞周期:シンバスタチン添加培地で3日間培養した細胞を propidium iodide (PI)で染色し, FACSを用いて細胞周期解析を行った。同時にアポトーシス細胞の多寡を sub-G1 測定にて評価した。
5. 分化関連遺伝子の発現:シンバスタチン添加培地で7日間培養した細胞から, RNA を抽出し, DSPP ならびに Osteocalcin (OCN) 遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR を用いて評価した。
6. 移植実験による硬組織形成:岡山大学動物実験管理委員会の承認のもと(承認番号 OKU-2007226), 以下の実験を行った。シンバスタチン添加培地で7日間培養した細胞をキャリアと混和し, 免疫不全マウス(NIH-bg-nu/nu-xid)背部皮下に移植した。8 週後に移植体を回収し, パラフィン切片を作製, HE 染色の後, 硬組織形成量を評価した。
7. 統計処理:各データの統計学的有意性は, 一元配置分散分析と多重比較検定を用いて評価した。

#### 【結果と考察】

1. 細胞増殖:培養3日目には10  $\mu\text{M}$  の濃度で, 5日目には1, 10  $\mu\text{M}$  の濃度で細胞の増殖は有意に抑制されていた。またコレステロール経路の下流に位置するメバロン酸を同時に添加すると, この細胞増殖抑制は解消された。すなわち, シンバスタチンはメバロン酸経路を介して DPSC の増殖を抑制していることが確認された。
2. 細胞骨格形成:1  $\mu\text{M}$  のシンバスタチン添加によりアクチン繊維の形成は軽度抑制された。また, 10  $\mu\text{M}$  のシンバスタチンによりアクチン繊維の形成は強度に抑制された。これは, シンバスタチン添加により, その下流に位置する Rho 経路の抑制が生じ, 細胞骨格伸張抑制が起きている結果であると考えられた。
3. 細胞周期:1  $\mu\text{M}$  のシンバスタチン添加により, G0/G1 期の集積像と G2/M 期のピークの減弱を認めた。またアポトーシス細胞を示す sub-G1 像は観察されなかった。すなわち, シンバスタチンの DPSC の増殖抑制は, G1/S 期での細胞周期の停止の結果であると考えられた。
4. 遺伝子発現:1  $\mu\text{M}$  のシンバスタチン添加により, 7日後の DSPP 遺伝子の発現量は PBS(陰性対象)と比べ 3.7 倍であり, 有意に促進されていた。OCN 遺伝子の発現量は, PBS と比べ 18.1 倍であり, BMP-2 (100ng/ml)と比較しても 2.3 倍に促進されており, ともに有意に高いものであった。
5. 移植実験による硬組織形成:1  $\mu\text{M}$  のシンバスタチンを作用させた DPSC 移植群による硬組織形成能は, PBS や BMP-2 作用群と比較しても最も高いものであった。

以上より, シンバスタチンは DPSC の増殖を抑制するが, 至適濃度で作用させるとアポトーシスを誘導することなく, 効率的にその分化を促進することが明らかとなった。スタチンは血管新生作用, 神経修復作用, 抗炎症作用なども有することが知られており, 今回得た結果をあわせて考えると, 障害を受けた歯髄に対する象牙質/歯髄複合体の再生にはたいへん適した薬剤であると考えられた。

#### 【結論】

シンバスタチンは1  $\mu\text{M}$  で作用させると, メバロン酸-Rho 経路を介して, アポトーシスを誘導することなく, 細胞周期を制御することで DPSC の増殖を抑制した。1  $\mu\text{M}$  のシンバスタチンは, DPSC における DSPP ならびに OCN 遺伝子の発現を促進させ, 細胞移植実験で高い硬組織形成誘導能を有していた。

## 論文審査結果の要旨

これまでも象牙質の形成を生物学的に促進させようとする研究が数多く行われてきたが、いまだ臨床応用に至ったものはない。

本研究は、骨系分化促進作用が報告されている高脂血症治療薬であるスタチンを用いて、その象牙質形成促進作用をヒト歯髄幹細胞 (Dental Pulp Stem Cells; DPSCs) を用いて、*in vitro*, *in vivo* で検討したものである。

その結果、スタチン添加により1)細胞増殖が抑制されること、2)細胞骨格形成が抑制されること、3)至適濃度で作用させた場合、アポトーシスを誘導することなく、細胞周期をG0/G1期で停止すること、4)その作用経路はメバロン酸-Rho経路を介していることが示唆されること、5)1  $\mu\text{M}$ の濃度で作用させると *dspp*, *ocn* 遺伝子発現が *in vitro* で強く促進されること、6)1  $\mu\text{M}$ の濃度で作用させて免疫不全マウスへ移植を行うと *in vivo* での硬組織形成が促進されることが明らかとなった。

これらの知見は、今後の象牙質再生療法の開発において、きわめて重要であると考えられた。また、本研究は、ヒトDPSCsに対するスタチンの影響、ならびにスタチンの作用機序を適切に評価しており、実験計画、実験手技、および統計学的評価も適切であると判断される。よって本論文は博士(歯学)の学位授与に十分値するものと判断した。