

氏名 園 山 亘

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 乙 第 号

学位授与の日付 平成 16 年 3 月 25 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題名 ヒト歯髓由来細胞の細胞接着, 増殖, 分化に与える各種成長因子ならびに
ハイドロキシアパタイトの影響

論文審査委員 教授 滝川 正春 教授 鈴木 一臣 教授 窪木 拓男

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯髓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いるが, それらの因子がカスケードのどの段階に, どのように作用するのかについては十分明らかにされていない。また, scaffold やキャリアーの候補となりうる生体材料と歯髓内の細胞の関連も十分には検討されていない。

そこで, 本研究では結合組織成長因子 (CTGF), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF), β -1 型トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 1) の象牙質再生における役割を明らかにすることを目的に, ヒト歯髓由来培養細胞を用い, 本細胞の接着, 増殖, 分化に与える CTGF, bFGF, TGF- β 1 の影響を検討した。また, 生体材料の一つとしてハイドロキシアパタイト (HAP) 上での細胞動態について検討した。

【材料および方法】

1. 細胞単離と培養: ヒト歯髓細胞は本学部倫理委員会の許可 (承認番号26「歯科材料の生体親和性の検討と歯牙硬組織再生に関する基礎的研究」) のもと, Gronthosらの方法 (PNAS, 2000) に準じて単離した。すなわち, 27歳女性から歯列矯正の便宜抜歯の際に第一小白歯の提供を受け, その歯髓を分離, ウシ胎児血清 (FBS) を20%含む α -MEM中に播種した。その後, 培養を行い, 実験に使用した。
2. 発現遺伝子の確認: 細胞の表現型を確認するため dentin sialophospho-protein (DSPP) 遺伝子, I型コラーゲン (Col I) 遺伝子, オステオカルシン (OCN) 遺伝子の発現を RT-PCR 法で検討した。
3. 細胞接着に与える各成長因子の効果: 無血清培地で細胞を播種し, 3 時間後に各因子を吸着させた培養プレート上に残存している細胞数を MTS 法により評価した。各成長因子の吸着は Shimo らの方法 (J Biochem, 1999) に準じて, 0.1%ウシ血清アルブミンに各因子を添加, 培養プレート上で 2 日間静置することにより行った。
4. 細胞増殖に与える各成長因子の効果: 細胞播種後 8 日目までの細胞数を MTS 法により評価した。初期の細胞接着に対する各成長因子の影響をなくすため, まず 20% FBS を含む培地で細胞を播種した。細胞播種から 24 時間後に各因子を添加した 0.1% FBS を含む培地に交換し, 8 日目まで培養を行った。
5. アルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性に及ぼす各成長因子の効果: 細胞播種後 10 日目までの ALPase 活性を測定することで評価した。各成長因子は増殖の検討と同様に 0.1% FBS を含む培地に添加し, 10 日目まで培養を行った。
6. HAP への細胞接着に与える各成長因子の効果: 無血清培地で細胞を播種し, 3 時間後に各成長因子を吸着させた HAP 上に残存している細胞数を MTS 法により評価した。各成長因子の吸着は実験3と同様に Shimo らの方法に準じて行った。
7. HAP 上での遺伝子発現の検討: 20% FBS を含む培地で HAP 上に細胞を播種し, 7 日後の遺伝子発現を RT-PCR 法で検討した。
8. 統計処理: 各データの統計学的有意性は, 一元, ならびに二元配置分散分析と多重比較検定, 対応のない t 検定を用いて検討した。

【結果および考察】

1. ヒト歯髄由来細胞における遺伝子発現：DSPP 遺伝子は 3 代目からその発現が明らかとなり，8 代目以降は低下した。OCN 遺伝子は 4 代目から発現レベルが高くなり，その後 10 代目まで高い発現レベルを維持していた。Col I 遺伝子は一貫して高い発現レベルを維持していた。以上の結果から継代に伴いその遺伝子発現プロファイルは変化するものの，本細胞は象牙芽細胞，もしくは象牙芽細胞に分化しうる細胞群であると推測された。本結果をもとに以降の実験では 4 代目から 7 代目までの細胞を使用した。
2. 細胞接着に与える各成長因子の効果：各成長因子の培養プレートへの吸着により細胞接着は最高 1.43 倍にまで促進された。成長因子を吸着していないコントロールに比較して CTGF (50, 100 ng/ml)，bFGF (20, 50, 100 ng/ml)，TGF- β 1 (20 ng/ml) を吸着した群では，その効果は統計学的に有意であった（一元配置分散分析，多重比較検定）。すなわち，細胞接着に関してはこれらの因子の吸着は普く促進効果があるものの，因子の種類，濃度によりその程度は異なっていた。
3. 細胞増殖に与える各成長因子の効果：TGF- β 1 の添加により細胞増殖は播種から 8 日後に最高 1.43 倍にまで促進され，その効果は有意であった（二元配置分散分析，多重比較検定）。CTGF，bFGF の細胞増殖に与える影響は明らかではなかった。
4. ALPase 活性に与える各成長因子の効果：bFGF，TGF- β 1 の添加により ALPase 活性は有意に抑制された（二元配置分散分析，多重比較検定）。一方，CTGF の添加は影響を与えなかった。
5. HAP への細胞接着に与える各成長因子の効果：培養プレートと比較して，HAP への細胞接着は有意差に促進された（一元配置分散分析，多重比較検定）。一方，HAP への各成長因子の吸着により細胞接着は促進される傾向にあったものの，その差は有意ではなかった。
6. HAP 上での遺伝子発現の検討：HAP 上で培養することにより DSPP，OCN の遺伝子発現はそれぞれ 1.8 倍，1.9 倍にまで有意に促進された（対応のない t 検定）。COL I 遺伝子の発現に差はなかった。すなわち，HAP 上で培養することにより，歯髄細胞の分化が誘導されていると推測された。

以上から，歯髄培養細胞の接着，増殖，分化の各過程において，それぞれの成長因子に対する挙動は異なっており，象牙質の再生を具現化するには単一の因子ではなく，カスケードを考慮した複合的なアプローチが必要であることが示唆された。また，象牙質再生療法における scaffold としての HAP の有用性が示唆された。

本研究結果は一個体から単離した細胞より得られたものであるためその適応には十分注意を要するが，今後の象牙質歯髄複合体再生に向けて意義のあるものと考えられた。

【結論】

ヒト歯髄から DSPP 遺伝子を発現する細胞を単離した。この細胞を用いて，その接着，増殖，ならびに分化に及ぼす CTGF，bFGF，TGF- β 1 の影響を検討した。その結果，細胞接着はすべての因子で様々に促進された。また，細胞増殖は TGF- β 1 を培地に添加したときのみ有意に促進された。一方，アルカリフォスファターゼ活性は，bFGF，TGF- β 1 の添加により有意に抑制されたが，CTGF 添加では，その影響は明らかでなかった。

HAP に対する歯髄細胞の接着は培養プレートと比較して有意に高いものであった。また HAP 上での培養によりその遺伝子発現は変化した。

論文審査結果の要旨

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いるが、それらの因子がカスケードのどの段階に、どのように作用するかは十分には解明されていない。また、scaffold やキャリアーの候補となりうる生体材料と歯髄細胞の関連も十分には検討されていない。

本研究は結合組織成長因子 (CTGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、トランスフォーミング成長因子 β -1 (TGF- β 1) の象牙質再生における役割を明らかにすることを目的に、ヒト歯髄由来培養細胞を用い、本細胞の接着、増殖、分化に与える CTGF, bFGF, TGF- β 1 の影響を検討したものである。また、生体材料の一つとしてハイドロキシアパタイト (HAP) 上での細胞動態についての検討も行っている。

その結果、1) 単離した細胞は継代により dentin sialophosphoprotein (DSPP) 遺伝子を発現するようになり、象牙芽細胞、もしくは象牙芽細胞に分化しうる細胞群であること、2) 成長因子の培養プレート表面への吸着による細胞接着の促進はすべての因子により程度の差はあるが認められること、3) 細胞増殖は TGF- β 1 を培地に添加したときのみ促進されること、4) ALPase 活性は bFGF, ならびに TGF- β 1 の培地への添加により抑制されること、5) HAP に対する細胞接着は培養プレートと比較して有意に優れていること、6) HAP 上での培養により DSPP 遺伝子ならびにオステオカルシン遺伝子の発現が促進されることが確認された。

これらの知見は、組織再生の各過程における成長因子の影響、ならびに生体材料としての HAP との関係を適切に評価しており、きわめて重要であると考えられる。また実験計画、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。