

氏名	福島 宏明
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4530号
学位授与の日付	平成24年3月23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(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	Stage-specific embryonic antigen-4を用いたヒト乳歯歯根膜
学位論文審査委員	幹細胞の同定 教授 長塚 仁 教授 山城 隆 教授 山本 敏男

学位論文内容の要旨

【緒言】

多くの成人組織には、外傷、疾患、老化が起きた組織を再生するための体性幹細胞が存在し、代表的なものとして、間葉系幹細胞、造血系幹細胞、神経幹細胞、上皮幹細胞などが知られている。間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪、臍帯血などに存在する幹細胞である。近年では、間葉系幹細胞はヒト歯髄、ヒト歯根膜、ヒト乳歯歯髄、ヒト乳歯歯根膜にも存在することが分かっている。しかし、ヒト乳歯歯根膜細胞の幹細胞特性についてはまだ十分に解明されていない。

不均一な細胞集団から幹細胞を特定することは幹細胞研究における重要な研究目標の一つであり、本研究では、stage-specific embryonic antigen(SSEA)-4がヒト乳歯歯根膜幹細胞を同定・分離しうる特異的な表面抗原マーカーとして利用できるかについて検討を行った。また、抗 SSEA-4 抗体を用いて単離された SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜クローン細胞の特性や多分化能についても検討を行った。

【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。岡山大学病院矯正科における矯正治療患者の便宜抜去乳歯からヒト乳歯歯根膜を採取した。細胞の単離および抗原の発現の解析はフローサイトメトリーを用いて行った。細胞の分化能は、それぞれの分化誘導培地を用いて、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・神経細胞・肝細胞への分化誘導を行い、評価を行った。mRNA 発現は real-time RT-PCR を用いて調べた。また、*in vivo* における骨様組織への分化能は、SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜クローン細胞を免疫不全マウスに移植し、8 週間後に回収し、HE 染色および免疫組織化学によって評価を行った。

【結果】

1. ヒト乳歯歯根膜細胞は、プラスチックディッシュに付着し、線維芽細胞様形態を呈した。また、ヒト乳歯歯根膜細胞は、間葉系幹細胞のマーカー発現と同様に CD105, CD73, CD90, CD29, CD44, CD71, CD166 を発現し、CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR を発現しなかった。さらに、ヒト乳歯

- 歯根膜細胞は脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞への分化能が認められた。
2. *In vivo* で、ヒト乳歯歯根膜組織において、SSEA-4 陽性細胞が存在することが認められた。
 3. ヒト乳歯歯根膜細胞は、SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, OCT4, NANOG, SOX2, REX1 の発現が認められた。乳歯歯根膜細胞は 22.7% の SSEA-4 陽性細胞を含んでいた。SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜細胞は SSEA-4 陰性細胞と比較して高い増殖能を有していた。
 4. SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜細胞のクローン細胞株を樹立し分化能を調べた結果、SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜クローン細胞は、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・神経細胞への分化能を有していた。また、61.5% (16/26) の SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜クローン細胞が脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化能を有していた。
 5. SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜細胞は、*in vivo* における異所性骨形成能を有していた。

【考察および結論】

ヒト乳歯歯根膜細胞は、プラスチックディッシュに付着し、間葉系幹細胞マーカーの発現パターンを示し、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化能を有していた。このことから、ヒト乳歯歯根膜細胞は、間葉系幹細胞特性を有していることが分かった。また、ヒト乳歯歯根膜細胞は、胚性幹細胞関与分子の発現を示し、培養ヒト乳歯歯根膜細胞には 22.7% の SSEA-4 陽性細胞が存在していた。SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜クローン細胞は、*in vitro* における脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞への分化能、および *in vivo* における異所性骨形成能を有していた。また、抗 SSEA-4 抗体を用いたヒト乳歯歯根膜幹細胞の純化効率 は 61.5% であり、抗 SSEA-4 抗体によってヒト乳歯歯根膜幹細胞を濃縮できた。そのため、SSEA-4 がヒト乳歯歯根膜幹細胞の同定・分離マーカーとして利用できることが示唆された。本研究の結果は、ヒト乳歯歯根膜幹細胞の新しい同定・分離法を提示するものであり、今後の幹細胞研究および再生医療の更なる発展に寄与するものであると考えられる。

学位論文審査結果の要旨

多くの成人組織には、外傷、疾患、老化が起きた組織を再生するための体性幹細胞が存在し、代表的なものとして、間葉系幹細胞、造血系幹細胞、神経幹細胞、上皮幹細胞などが知られている。間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、臍帯血などに存在する幹細胞である。近年では、間葉系幹細胞はヒト永久歯歯髄、ヒト永久歯歯根膜、ヒト乳歯歯髄、ヒト乳歯歯根膜にも存在することが分かっている。しかし、ヒト乳歯歯根膜細胞の幹細胞特性についてはまだ十分に解明されていない。不均一な細胞集団から幹細胞を特定することは幹細胞研究における重要な研究目標の一つであり、本研究では、stage-specific embryonic antigen(SSEA)-4 がヒト乳歯歯根膜幹細胞を同定・分離しうる特異的な表面抗原マーカーとして利用できるかについて検討を行った。また、抗 SSEA-4 抗体を用いて単離された SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜クローン細胞の多分化能についても検討を行った。

岡山大学病院矯正歯科における矯正治療患者の便宜抜去乳歯から乳歯歯根膜を採取した。歯根膜組織中の SSEA-4 陽性細胞の存在は蛍光免疫組織化学によって確認した。細胞の単離および抗原の発現の解析はフローサイトメトリーを用いて行った。細胞の分化能は、それぞれの分化誘導培地を用いて、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・神経細胞への分化誘導を行い、評価を行った。mRNA 発現は real-time RT-PCR を用いて調べた。

その結果、乳歯歯根膜組織中に SSEA-4 陽性細胞が存在し、培養乳歯歯根膜細胞は 22.7% の SSEA-4 陽性細胞を含んでいた。SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜細胞のクローン細胞株を樹立し分化能を調べた結果、SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜クローン細胞は、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・神経細胞への分化能を有していた。また、61.5% (16/26) の SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯根膜クローン細胞が脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化能を有していた。

本研究は、ヒト乳歯歯根膜幹細胞の新しい同定・分離法を提示するものであり、今後の幹細胞研究および再生医療の更なる発展に寄与するものである。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。