

## ヒト歯髄組織幹細胞を応用した歯髄再生療法の開発 を目指した橋渡し研究

園田, 聡一郎

<https://hdl.handle.net/2324/1937190>

---

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (歯学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

ヒト歯髄組織幹細胞を応用した歯髄再生療法の  
開発を目指した橋渡し研究

Translational Research for Development of Human  
Dental Pulp-Derived Stem Cells-Based Dental Pulp  
Regeneration Therapy

2018年5月

園田 聡一郎

九州大学大学院歯学府

口腔機能修復学講座 歯周病学分野

九州大学大学院歯学研究院  
口腔機能修復学講座 歯周病学分野

指導教員 教授 西村 英紀 先生

九州大学大学院歯学研究院  
口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野

研究指導者 准教授 山座 孝義 先生

本研究の一部は下記の論文にて報告した。

Sonoda, S., Yamaza, H., Ma, L., Tanaka, Y., Tomoda, E., Aijima, R., Nonaka, K., Kukita, T., Shi, S., Nishimura, F., Yamaza, T. Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. *Scientific Reports*. 6, 19286. (2016)

本研究に関連する研究を下記の論文にて報告した。

Ma, L., Aijima, R., Hoshino, Y., Yamaza, H., Tomoda, E., Tanaka, Y., Sonoda, S., Song, G., Zhao, W., Nonaka, K., Shi, S., Yamaza, T. Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates secondary osteoporosis through interleukin-17-impaired functions of recipient bone marrow mesenchymal stem cells in MRL/lpr mice. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 104 (2015).

Sonoda, S., Tomoda, E., Tanaka, Y., Yamaza, T. Properties and possibilities of human dental pulp-derived stem cells. *Arch. Stem Cell. Res.* 2, 1012 (2015).

Yamaza, H., Tomoda, E., Sonoda, S., Nonaka, K., Kukita, T., Yamaza, T. Bilirubin reversibly affects cell death and odontogenic capacity in SHED. *Oral Diseases*. *In press*.

Sonoda, S., Mei, Y., Atsuta, I., Danjo, A., Yamaza, H., Hama, S., Nishida, K., Tang, R., Kyumoto-Nakamura, Y., Uehara, N., Kukita, T., Nishimura, F., Yamaza, T. Exogenous nitric oxide stimulates the odontogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *Scientific Reports*. *In press*.

本研究の一部を特許出願中である。

発明者; 山座 孝義、園田 聡一郎

発明の名称 「歯髓組織由来細胞から歯髓幹細胞を調製する方法」

整理番号; SISP1602

本研究の一部は、下記学術大会にて報告した。

“Improvement of dentinogenesis of Irreversible pulpitis-derived DPSCs.”  
The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. Hiroshima.  
2011.10.

“Can irreversible inflamed dental pulp-derived dental pulp stem cells be suitable for dental pulp regeneration?” The 57th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology. Niigata. 2015. 9.

Interferon-gamma improves impaired dentinogenic function and immunosuppressive properties in irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. Fukuoka. 2015. 10.  
炎症性サイトカイン刺激による不可逆性歯髄炎組織由来歯髄幹細胞の象牙質形成能ならびに免疫抑制能の改善. 日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部 合同研修会. 福岡. 2015. 11.

“Patient-derived dental pulp stem cells based regeneration of dentin/pulp-complex.”  
Kyudai Oral Bioscience 2016. School of Dentistry Kyushu University, Fukuoka, 2016.  
2. 27.

「不可逆性歯髄炎組織由来歯髄幹細胞を応用した象牙質／歯髄複合体の再生」  
第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会、栃木総合文化センター、宇都宮市、  
2016. 6.

## 目 次

付録. 略語表	・
§ 1. 要旨	・ 1
§ 2. 緒言	・ 3
§ 3. 研究 I : 「不可逆性歯髄炎組織由来歯髄幹細胞の歯髄再生療法への応用を 指した橋渡し研究」	・ 6
3-1. 目的	・ 7
3-2. 材料と方法	・ 7
3-3. 結果	・ 26
3-4. 小括	・ 48
§ 4. 研究 II : 「歯髄組織幹細胞の単離における血清濃度の影響に関する試験」	・ 49
4-1. 目的	・ 50
4-2. 材料と方法	・ 50
4-3. 結果	・ 53
4-4. 小括	・ 59
§ 5. 考察	・ 60
5-1. 研究 I の考察	・ 61
5-2. 研究 II の考察	・ 66
§ 6. 総括	・ 71
§ 7. 謝辞	・ 73
§ 8. 引用文献	・ 74

## 付録. 略語集

1-MT: 1-methyl-L-tryptophan

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

ALP: alkaline phosphatase

$\alpha$ -MEM: alpha modification of Eagle's medium

BMMSCs: bone marrow-derived mesenchymal stem cells

BMSCs: bone marrow stromal cells

BrdU: bromodeoxyuridine

CFU-F: colony-forming unit-fibroblasts

CM: conditioned Medium

ConA: concanavalin A

COX: cyclooxygenase

DPSCs: dental pulp stem cells

DSPP: dentin sialo phosphoprotein

FBS: fetal bovine serum

GFAP: glial fibillary acidic protein

H&E: hematoxylin and eosin

HA/TCP: hydroxyapatite/tricalcium phosphate

HSCs: hematopoietic stem cells

IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN- $\gamma$ : Interferon gamma

IP-DPSCs: irreversible pulpitis derived-dental pulp stem cells

L-NAME: N-nitro-L-arginine methyl ester

LT-HSCs: long-term self-renewing HSCs

MSCs: mesenchymal stem cells

NOS: nitric oxide synthase

NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

PBMNCs: peripheral blood mononuclear cells

PBS: phosphate-buffer saline

PFA: paraformaldehyde

qRT-PCR: quantitative RT-PCR

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

SHED: stem cell from human exfoliated deciduous teeth

SSEA-4: stage specific antigen-4

ST-HSCs: short-term self-renewing HSCs

TERT: telomerase reverse transcriptase

TGF: transforming growth factor

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha

TRAP: telomere repeat amplification protocol

## §1. 要旨

歯髄は再生しない組織である。そのため、不可逆性歯髄炎に罹患した場合、歯髄組織は抜髄処置を受け、ガッタパーチャポイントなどの人工材料により置換される。歯髄再生を基盤とする歯内治療の開発は、幹細胞特性 (stemness) を考慮すると、ヒト歯髄組織幹細胞の利用が非常に望ましい。歯髄再生治療において自家永久歯の歯髄幹細胞 dental pulp stem cells (DPSCs) の応用は、その安全性面から、優れた方法と考えられる。しかし、患者自身の健常歯を得る機会が限定されているため、現状では健常歯 DPSCs (健常 DPSCs) を用いた自家移植治療の有用性は限られている。不可逆性歯髄炎組織より単離される DPSCs irreversible pulpitis-derived dental pulp stem cells (IP-DPSCs) の歯髄再生への応用は、安全性の担保に加えて、ドナー不足の解消、つまり細胞ソースの確保の観点から、自家移植による治療への有用性が高いと考えられる。しかし、IP-DPSCs の細胞特性が十分に明らかになっておらず、それを応用した再生治療は不確実である。そこで、本研究の研究 I では、まず IP-DPSCs の stemness を解析した。IP-DPSCs は、コロニー形成能および細胞増殖能、多分化能、*in vivo* における象牙質再生能、免疫抑制能を示した。しかし、健常 DPSCs と比較して、それら全ての能力は劣っていた。これらの結果から、IP-DPSCs を用いた自家移植治療は、歯髄再生を十分に期待できない可能性が示唆された。そこで、障害を受けた IP-DPSCs の象牙質再生能ならびに免疫抑制能の改善を試みた。*Ex vivo* における interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) 前処理により、IP-DPSCs の *in vivo* における象牙質再生能と *in vitro* における免疫抑制能が改善した。一方、tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) 前処理では、それらの能力に対して改善効果を示さなかった。以上の結果から、IFN- $\gamma$  は障害された IP-DPSCs の機能を回復させる上で有効な制御因子であることが示された。従って、IFN- $\gamma$  前処理により機能が回復された IP-DPSCs の応用は、将来



の歯内療法における、IP-DPSCs 自家移植による歯髄再生治療を確立する上での新規の基盤技術と考えられる。

歯髄組織を用いた歯髄再生治療を実現するにあたり、ドナー細胞の量と質の検討が必要である。従って、ドナー歯から高い stemness を維持し、かつ大量の幹細胞を得ることが望ましい。研究 II では、歯髄組織幹細胞の単離過程における条件検討により、より良質で大量の歯髄幹細胞が得られるのではないかと仮説を立てた。そこで、歯髄組織幹細胞の単離過程において使用するウシ胎児血清 fetal bovine serum (FBS) の濃度が、単離される歯髄組織幹細胞の stemness ならびに単離数へ与える影響を解析した。5%、10%、15%の FBS 濃度条件下にて、脱落乳歯歯髄組織より幹細胞の単離ならびに stemness 解析を行った。単離方法は、間葉系幹細胞 mesenchymal stem cells (MSCs) の単離で最も標準的な手法である colony forming unit-fibroblasts (CFU-F) 法を用いた。また、stemness の解析は、細胞増殖能ならびにフローサイトメトリーによる表面抗原の発現にて行った。形成したコロニー数、コロニー毎の細胞数、細胞増殖能、免疫学的表現型から、10%FBS 濃度の培地で単離を行った群は、他の 2 群よりも幹細胞としての高い特性を示した。従って、CFU-F 法による歯髄由来幹細胞の単離過程において、FBS 濃度を 10%と変更することにより、従来法 (FBS 濃度 15%) と比べて、より幼若で stemness の優れた歯髄組織幹細胞を単離する技術を確立した。

## §2. 緒言

歯髄組織は自己再生能を備えていない。しかし、様々な組織障害による歯髄炎に反応して、修復象牙質を付加形成する [引用文献 1, 2]。歯髄炎は、臨床的に可逆性歯髄炎と不可逆性歯髄炎に分類される [3]。不可逆性歯髄炎において障害を受けた歯髄組織は、完全に除去される必要がある。そして、除去された組織に代わり、セメントやガッタパーチャポイントのような人工材料による補填治療を受けることとなる。このような歯内治療を受けた歯は、機械的強度や知覚、免疫防御力を含む正常な生体活性を失い、最終的に歯の破折やう蝕により抜歯に至る場合が知られている。従って、生体活性を持った歯髄の再生は、抜歯歯に対する歯内療法として理想的な治療方法であると考えられる。

DPSCs は、ヒト第三大臼歯の健常歯髄組織にて同定された [4]。また、自己複製能や象牙芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への多分化能を備えているため、MSCs に属する幹細胞であると考えられている。最近の研究において、DPSCs は、生体内における象牙質／歯髄複合体の再生能および免疫調節能を含む様々な特性を備えていることが報告されている [4-7]。従って、DPSCs を含む健常歯髄は、歯髄再生への有望な細胞ソースであると考えられる [8]。

免疫学的安全性を考慮した場合、自家 DPSCs の利用が望ましい。自家移植による歯髄再生を目指す上で、細胞ソースを考えた場合、患者の口腔内の埋伏智歯などの健常歯と、患歯そのものが候補となる。しかし、抜歯処置を受ける患者に、埋伏智歯などの抜歯が適用可能な健常歯が存在しているとは限らず、健常 DPSCs を応用した歯髄再生には適用制限がある。

抜歯された患者由来の歯髄組織もまた、象牙質形成能を有する DPSCs を含んでいることから、歯髄再生に利用可能な幹細胞ソースと考えられる [9, 10]。最近の研究において、臨床的に不可逆性歯髄炎と診断された永久歯の歯髄組織か

ら、IP-DPSCs の単離と特性解析が報告されている [9-12]。また、IP-DPSCs は象牙質／歯髄複合体の再生と免疫抑制能が劣っていることが報告されている [11, 12]。しかし、この障害された IP-DPSCs の機能を改善させる技術は開発に至っていない。

本研究の研究 I では、CFU-F 形成法 [13] を用いて不可逆性歯髄炎に罹患したヒト歯髄組織から歯髄組織幹細胞を単離し、自己複製能および象牙芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞、神経細胞への多分化能、*in vivo* での象牙質再生能、異質性、免疫調節能を含む MSCs としての様々な特性を解析した。さらに、TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  を用いた *ex vivo* 処理による IP-DPSCs の機能改善法の開発を試みた。

ロシアの幹細胞学者 A. J. Friedenstein らの研究グループは、骨髄中に、プラスチック製カルチャーディッシュ上に容易に付着する細胞を発見した [13]。その形態は、線維芽細胞に類似した紡錘形を呈し、さらに、付着した単一細胞がコロニーを形成することを見出した。この CFU-F 形成能を有する細胞を骨髄間質細胞 bone marrow stromal cells (BMSCs) とした。BMSCs は *in vitro* 実験にて、骨基質を形成する細胞へ分化すること、*in vivo* 移植実験にて、骨基質を形成するのみならず、骨髄様組織も誘導することが示された [13]。その後の研究により、BMSCs から軟骨細胞や脂肪細胞などの間葉系細胞への分化が証明された。これらの結果に基づき、BMSCs は組織幹細胞とみなされるようになり [14]、由来胚葉を意識した MSCs という名称を用いるようになった [15]。その後、MSCs が免疫調節能を備えていることが示された [8]。また、神経細胞やグリア細胞などの外胚葉系細胞や、血管内皮細胞、肝細胞、膵島  $\beta$  細胞などの内胚葉性細胞へ分化することも明らかになった [8]。さらに、様々な全身疾患への細胞移植治療による治療効果が報告され、MSCs は細胞移植治療における有望な細胞ソースであ

ると考えられている [8]。

MSCs の治療上の有効性が明らかになると、多くの研究室によって骨髄や骨髄以外の様々な組織から MSCs と共通の特徴を有した細胞が単離された。しかし、由来組織に多様性があり単離方法も統一されたものでなかったため、報告される MSCs の特性が一致せず、特に細胞治療の効果について不一致が生じた。この問題を解決するために、Dominici らは、プラスチック製ディッシュ付着性であることと、多分化能を有していることの他に、特定の細胞表面抗原 (CD105, CD73, CD90 が陽性かつ CD34, CD45, CD14, HLA-DR が陰性) を発現していることを MSCs が最低限満たすべき条件とした [16]。その後の研究による改善が許容されているが、単離した細胞を MSCs として臨床応用する上で、満たすべき性質であると考えられる。

幹細胞が幹細胞としての特性を維持する能力を stemness といい、stemness の低下した細胞は、分裂能や多分化能が低下することが報告されている [17]。歯髄組織幹細胞による歯髄再生治療の実現にあたり、より良い治療効果を上げるためには、stemness の高い細胞を得ることが望ましいと考えられる。免疫学的安全性から自家移植による治療の実現に向けて研究開発が進む一方で、治療コストの観点から細胞バンキングを基礎とした他家移植実現のための研究事業も盛んに行われている。

研究 II では、高い stemness を維持したままで大量の歯髄組織幹細胞を得るべく、CFU-F 形成法による歯髄組織幹細胞単離過程における FBS 濃度について、条件検討を行うとともに、各 FBS 濃度における stemness を、コロニー形成能、表面抗原発現状態、細胞増殖に着目して解析を行った。

### §3. 研究 I

「不可逆性歯髄炎組織由来歯髄幹細胞の歯髄再生療法への  
応用を目指した橋渡し研究」

### §3-1. 目的

ヒト永久歯歯髄組織より単離される DPSCs は MSCs としての特性を有しており、象牙質／歯髄複合体再生能を示すことから、歯髄再生療法への応用が進められている。自家移植におけるドナー供給の観点から、不可逆性歯髄炎患者に由来する抜髄歯髄組織が、歯髄再生療法のための細胞ソースの候補として考えられる。しかし、最近の研究で、IP-DPSCs の歯髄組織再生能／免疫抑制能が低下していることが報告されている。しかし、IP-DPSCs の特性は十分に解明されていない。

研究 I の目的は、IP-DPSCs を単離し、その stemness を含めた性質を十分に解明することにある。まず、臨床的に不可逆性歯髄炎と診断されて抜髄された組織から IP-DPSCs を単離し、健常 DPSCs と比較して自己複製能や表面抗原の発現、象牙芽細胞や、脂肪細胞、軟骨細胞への多分化能を含む stemness を詳細に解析することとした。次に、*in vivo* における象牙質／歯髄複合体再生能ならびに *in vitro* における免疫調節能を解析し、歯髄再生療法への適格性を評価するとともに、IP-DPSCs の能力改善を試み、歯髄再生療法への適格化を探求することとした。

### §3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. ヒト歯髄サンプル

全てのヒト由来試料は、九州大学病院にて全身的には健常な 19 歳から 25 歳の歯科受診の患者から生物学的／臨床的試料に破棄される抜去歯髄組織を用いた。つまり、不可逆性歯髄炎と診断された永久歯より抜去された歯髄組織 (n=4) を無菌条件下で抜髄処置により得た。健常歯髄組織 (n=3) は、抜去した埋伏第三大臼歯より得た。ヒト末梢血単核球 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

は、26歳から38歳の健常なボランティアより得た。ヒト由来試料の取り扱いにはヘルシンキ宣言に従って実施され、九州大学ヒトゲノム・遺伝子研究倫理審査委員会より承認を受けている（承認番号：393-01）。全ての試験項目について、書面でのインフォームドコンセントを取得し、実験は承認されたプロトコールに従って実施された。

### 3-2-2. マウス

BALB/cAJcl-nu/nu マウス（雌、7-10週齢）はCLEA Japan（日本、東京）から購入した。これら動物は、九州大学動物実験委員会にて承認された動物実験プロトコール（承認番号：A21-044-1）に従って実験に供した。

### 3-2-3. 不可逆性歯髄炎由来歯髄の組織学的解析

臨床的に、不可逆性歯髄炎と診断された患者より抜去されたヒト永久歯歯髄組織を、phosphate buffered saline（PBS, pH 7.4）緩衝4% paraformaldehyde（PFA）にて固定し、O. C. T. compound（Sakura Finetek Japan、東京、日本）に包埋した。厚さ6  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した[18]。一部の切片は、hematoxylin and eosin（H&E）で染色した。その他の切片は、SuperPicture kit（Invitrogen、Waltham、MA、USA）を用いて、マウス由来抗STRO-1 IgM抗体（R&D Systems、Minneapolis、MN、USA）にて染色した。ネガティブコントロールとして、非免疫性のマウス由来IgM抗体（R&D Systems）を用いた。切片は、正立顕微鏡Axio Imager M2（Carl Zeiss Microscopy、Jena、Germany）にて観察した。

### 3-2-4. DPSCsの単離と培養

歯髄組織を0.3% collagenase type I（Worthington Biochemicals、Lakewood、NJ、

USA)、および 0.4% dispase II (三光純薬、東京、日本) を混合した滅菌 PBS に浸し、37°C、60 分間処理した。70- $\mu\text{m}$  のフィルターに通し、シングルセルの懸濁液とした。単核細胞を T-75 フラスコ当たり  $0.1 \times 10^6$  個で播種した。3 時間後、滅菌 PBS にて非付着細胞を洗い流した。付着した細胞を、alpha modification of Eagle's medium ( $\alpha$ -MEM) (Invitrogen) を基礎培地とし、15%FBS (Equitech-Bio、Kenville、TX、USA)、100  $\mu\text{M}$  L-ascorbic acid 2-phosphate (和光純薬、大阪、日本)、2 mM L-glutamine (ナカライテスク、京都、日本)、100 U/ml penicillin/100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin (ナカライテスク) を組成とする増殖培養液で培養した。培養期間中、培養液は 1 週間に 2 度交換した。付着したコロニーが十分に成長した後、細胞を継代し、上記培養液にて増殖させた。原則的に、3 継代目 passage 3 (P3) の細胞を実験に供した [5, 19]。

### 3-2-5. CFU-F 解析

単離された単核細胞を、増殖培養液に 100-mm ディッシュに  $1 \times 10^5$  個播種した。3 時間後、培養ディッシュを滅菌 PBS で洗い、付着した細胞を培養した。16 日間培養後、PBS で 3 回洗浄し、PBS 緩衝 0.1% toluidine blue および 4%PFA との混合液 (pH 7.4) にて、一晚室温でインキュベートした。倒立顕微鏡 Primovert (Carl Zeiss Microscopy) にて検鏡し、50 個以上の紡錘状の細胞を含む細胞集団を単一コロニー (CFU-F) として計測した [18-20]。



### 3-2-6. 免疫表現型解析

IP-DPSCs ならびに健常 DPSCs (1 x 10<sup>6</sup>/100  $\mu$ l、5%熱非働化 FBS [Equitech-Bio] 含有 PBS にて調整) を蛍光色素標識細胞表面抗原特異的抗体 (1  $\mu$ g/100  $\mu$ l) と 45 分間、4°Cにて染色した。ネガティブコントロールとして、それぞれのアイソタイプ抗体 (1  $\mu$ g/100  $\mu$ l) を使用した。本解析で用いる全ての 1 次抗体は表 3-1 に列挙した。サンプルは 5%熱非働化 FBS (Equitech-Bio) 含有 PBS で洗浄した後、FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences、San Jose、CA、USA) にて計測し、10 x 10<sup>3</sup> 個の細胞を BD FACSuite software (BD Biosciences) を用いて解析した。陽性細胞率は、偽陽性率を 1%以下とした各コントロール細胞との比較で定義した [18-20]。

表 3-1 : フローサイロメトリー用抗体リスト [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用]

<u>Names of antibodies</u>	<u>Types of antibodies</u>	<u>Names of Suppliers</u>
anti-CD14 antibody	R-PE -conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD34 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD45 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD73 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD90 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD105 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD146 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
<u>anti-STRO-1 antibody</u>	<u>R-PE-conjugated</u>	<u>abcam (Cambridge, MA)</u>

R-PE: R-phycoerythrin

### 3-2-7. ポピュレーションダブリング解析

細胞を T-75 フラスコに増殖培養液で播種した。細胞がサブコンフルエントの状態に達した際に継代し、同様に培養した。これらの手順を分裂能が失われるまで繰り返した。各継代でポピュレーションダブリングスコアを計算した。(数式 =  $\log_2$ [培養後に得られた細胞数/播種した細胞数])。その総計を PD scores とした [18-20]。

### 3-2-8. Bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み試験

P3 の IP-DPSCs と健常 DPSCs を 8-well chamber slide (Nunc、Waltham、MA、USA) 上に 1 ウェルにつき  $1 \times 10^3$  個にて播種し、増殖培養液で培養した。細胞を BrdU 試薬(1:100) (Invitrogen) にて 24 時間処理し、BrdU 染色キット (Invitrogen) を用いて染色した。その後、hematoxylin で対比染色を施した。各ウェルの 7 箇所を無作為に選択し、正立顕微鏡 Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy) を用いて撮影を行った。各画像で BrdU 陽性細胞核と BrdU 陰性細胞核を Image-J software (National Institutes of Health [NIH]、Bethesda、MD、USA) により計測し、細胞増殖能を全有核細胞に対する BrdU 陽性核数の割合で表した [18-20]。

### 3-2-9. テロメラーゼ活性試験

IP-DPSCs と健常 DPSCs のテロメラーゼ活性は、telomere repeat amplification protocol (TRAP) 法にて解析した。Quantitative telomerase detection kit (Allied Biotech、Ijamsville、MD、USA) を用いて、Light Cycler 96 real-time PCR system (Roche、Basel、Switzerland) にて増幅、シグナル検出を行った。HEK293T 細胞をポジティブコントロールとして用いた。各サンプルの一部を 85°C で 10 分間処理し、ネガティブコントロールとした。蛍光ユニットの平均初期量を用いてサンプル間の

テロメラーゼ活性を比較した [18-20]。

### 3-2-10. *In vitro* 多分化能試験

IP-DPSCs の象牙芽細胞／骨芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞、神経細胞への多分化能を健常 DPSCs と比較し、解析した [18, 19]。

*In vitro* 象牙芽細胞／骨芽細胞分化誘導解析：

IP-DPSCs ならびに健常 DPSCs を 60-mm ディッシュに  $5 \times 10^3$  の割合で播種し、増殖培養液にてフルコンフルエント状態になるまで培養した。その後、象牙芽細胞／骨芽細胞分化誘導培地に変更した。象牙芽細胞／骨芽細胞分化誘導培地は、 $\alpha$ -MEM (Invitrogen) を基礎培地とし、15% FBS (Equitech-Bio)、100  $\mu$ M L-ascorbic acid 2-phosphate (和光純薬)、2 mM L-glutamine (ナカライテスク)、1.8 mM potassium dihydrogen phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、10 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich)、100 U/ml penicillin/100  $\mu$ g/ml streptomycin (ナカライテスク) を組成とする培地を用いた。象牙芽細胞／骨芽細胞分化誘導培地は 1 週間に 2 回交換した。誘導開始から 1 週間で細胞を回収し、象牙芽細胞／骨芽細胞の分化に特異的な遺伝子の発現を半定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ならびに定量的 RT-PCR quantitative RT-PCR (qRT-PCR) にて解析した。結果は、それぞれのコントロール群の mRNA 発現量を 1 として標準化した。また、誘導開始から 1 週間の細胞を alkaline phosphatase (ALP) 活性試験に用いた。ALP 活性試験は、LabAssay ALP キット (和光純薬) を使用して、Multiskan GO スペクトロフォトメーター (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) にて、405 nm の吸光度を測定した。カルシウム沈着量の解析のために、分化誘導開始から 4 週間後の培養系を 1% alizarin Red-S (Sigma-Aldrich) で染色した。石灰化領域を Image-J software (NIH) にて計測し、総面積に対する alizarin Red 陽性面積の割合として表した。

*In vitro* 脂肪細胞分化誘導解析：

IP-DPSCs ならびに健常 DPSCs を 60-mm ディッシュに  $5 \times 10^3$  の割合で播種し、増殖培養液でフルコンフルエント状態になるまで培養した。その後、脂肪細胞誘導培地で誘導した。脂肪細胞分化誘導培地は、増殖培養液に 500  $\mu$ M isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich)、60  $\mu$ M indomethacin (Sigma-Aldrich)、0.5  $\mu$ M hydrocortisone (Sigma-Aldrich)、10  $\mu$ M insulin (Sigma-Aldrich) を添加した培地を用いた。誘導開始から 6 週間後、脂肪滴を検出するために培養細胞を 0.3% Oil red O (Sigma-Aldrich) で染色し、倒立顕微鏡 Primovert (Carl Zeiss Microscopy) にて観察した。各サンプルから isopropanol により Oil red O を抽出し、Multiskan GO スペクトロフォトメーター (Thermo Scientific) を用いて 520 nm の吸光度を測定した。脂肪細胞特異的遺伝子を半定量的 RT-PCR と qRT-PCR にて解析した。

*In vitro* 内皮細胞分化誘導解析：

IP-DPSCs ならびに健常 DPSCs を fibronectin-coated 8-well chamber slides (Nunc) に 1 ウェルにつき  $1 \times 10^3$  個の割合で播種し、endothelial growth medium 2 kit (Lonza, Basel, Switzerland) で 7 日間培養した。メディウムは 2 日間毎に交換した。その後、抗 CD31 抗体 (Affymetrix, San Diego, CA, USA) と Alexa flour 647 標識 2 次抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて、免疫蛍光染色を行った。核は 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (同仁堂化学研究所、熊本、日本) にて染色した。各ウェル 7 箇所を無作為に選択し、正立顕微鏡 Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy) で撮影を行った。各画像で CD31 陽性細胞と CD31 陰性細胞を Image-J software (NIH) により計測し、内皮細胞分化率を全細胞に対する CD31 陽性細胞の割合で表した。

*In vitro* 神経細胞分化誘導解析：

IP-DPSCs ならびに健常 DPSCs を Poly-D-lysine/laminin-coated 8-well chamber

slides (Nunc) 1 ウェルにつき  $1 \times 10^4$  個の割合で播種し、Neurobasal A (Invitrogen) に  $1 \times N2$  supplement (Invitrogen)、10 ng/ml fibroblast growth factor 2 (PeproTech、Rocky Hill、NJ、USA)、10 ng/ml epidermal growth factor (PeproTech)、100 U/ml penicillin/100  $\mu$ g/ml streptomycine (ナカライテスク) を添加した分化誘導培地で 21 日間培養した。培養期間中、3-4 日間毎に新しいメディウムを半量交換した。その後、抗 glial fibillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Sigma-Aldrich) および抗 neurofilament M 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 tubulin  $\beta$ III 抗体 (Sigma-Aldrich) と Alexa flour 647 標識 2 次抗体 (Dako) を用いて、免疫蛍光染色を行った。核は DAPI (同仁堂化学研究所) にて染色した。各ウェル 7 箇所ずつ無作為に選択し、正立顕微鏡 Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy) で撮影を行った。GFAP、neurofilament M、tubulin  $\beta$ III 陽性細胞を Image-J software (NIH) により計測した。神経細胞分化率は総細胞数に対する GFAP、neurofilament M、tubulin  $\beta$ III 陽性細胞数の割合で表した。

多分化に対するコントロール：

増殖培養液にて培養した DPSCs もしくは IP-DPSCs を各分化能に対するネガティブコントロール細胞として用い、解析に供した。

### 3-2-11. *In vivo* 象牙質形成能解析と自己複製能解析

*In vivo* 象牙質形成能を解析するため、増殖培養液にて培養した IP-DPSCs ならびに健常 DPSCs ( $4 \times 10^6$  個) を、hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) セラミック粉末 (40 mg、Zimmer Inc.、Warsaw、IN、USA) と 90 分、37°C にて混合した (図 3-2-1)。その混合物を 8-10 週齢の Balb/cAJcl-*nu/nu* マウスの背部皮下に移植した。移植後 8 週にて移植体を取り出し、組織学的解析を行った [15-18]。

IP-DPSCs の自己複製性能を解析するために、連続移植法を行った (図 3-2-1)。つまり、上記手法にて IP-DPSCs ( $4 \times 10^6$  個) を HA/TCP 担体 (40 mg) (Zimmer Inc.) と共に Balb/cAJcl-*nu/nu* マウスの背部皮下に 1 次移植した。移植から 8 週間後、1 次移植体を取り出し、0.4% dispase II (三光純薬) にて 37°C で 60 分間処理した。得られた細胞を再播種し、CFU-F の形成培養を行った。CFU-F 形成細胞 ( $4 \times 10^6$  個) を HA/TCP 担体 (40 mg) (Zimmer Inc.) の混合体を Balb/cAJcl-*nu/nu* マウスの背部皮下に 2 次移植した。移植 8 週間後、2 次移植体を組織学的に解析した [18, 19]。

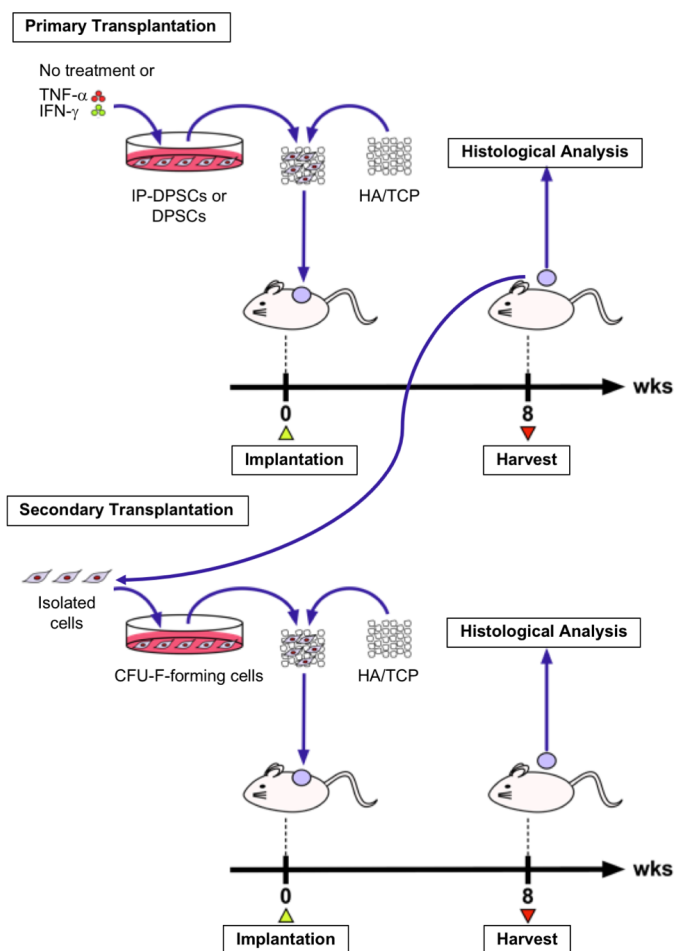


図 3-2-1. *In vivo* 象牙質形成能解析および自己複製能解析のスキーム

[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

### 3-2-12. ヒト象牙質上での *in vivo* 象牙質再生能

治療上抜去されたヒト臼歯の根管の内部表面を H ファイルで薄く削り取り、滅菌水にて洗浄後、1% Acetic acid で 10 分間室温処理し、PBS で洗浄した (図 3-2-2)。根管孔を吸収性ゼラチンスポンジであるスポンゼル (アステラス製薬、東京、日本) にて塞いだ。増殖培養液にて懸濁した IP-DPSCs ならびに健常 DPSCs を ( $2 \times 10^6$  個/100  $\mu$ l) を根管内に添加し、37°C で 24 時間インキュベートし、培養液を除去した。その後、歯根を Balb/c *nu/nu* マウス背部皮下に移植した。移植から 8 週間後、移植体を取り出し、組織学的解析を行った [6]。

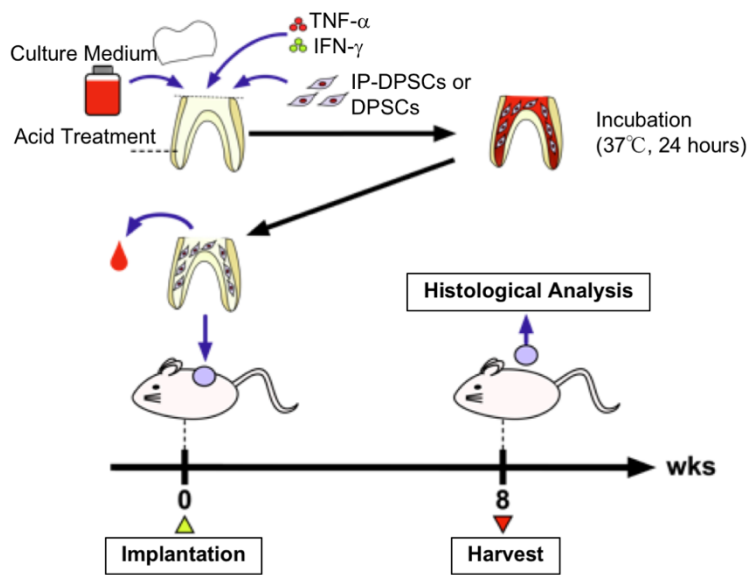


図 3-2-2. ヒト象牙質上における *in vivo* 象牙質再生能解析のスキーム

[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用]

### 3-2-13. 移植体の組織学的解析

取り出した移植体を 4% PFA 含有 PBS (pH 7.4) にて 4°C で一晩固定し、10% EDTA 溶液 (pH 8.0) で脱灰した。サンプルを脱水処理し、パラフィン包埋後、厚さ 6  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。パラフィン切片に H&E 染色もしくは alcian blue 染色を施した。H&E 染色画像を Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) にて色調反転処理した。免疫組織化学染色のために、パラフィン切片を抗ヒトミトコンドリア抗体 (Millipore, Billerica, MA, USA) でインキュベートし、SuperPicture kit (Invitrogen) で処理した。その後、切片を hematoxylin にて対比染色した。

免疫蛍光染色のために、パラフィン切片を抗ヒト CD146 抗体 (eBioscience, San Diego, CA, USA) もしくは抗 dentin sialo phosphoprotein (DSPP) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) にてインキュベートし、その後 Alexa fluor 647 標識 2 次抗体 (DAKO) でインキュベートした。切片は最後に DAPI (同仁化学研究所) で染色した。全ての切片は、正立顕微鏡 Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy) を用いて観察した [18-20]。

*In vivo* 象牙質再生能を解析するために、H&E 染色切片から無作為に 7 か所選択した。各範囲内で新規に形成された石灰化組織領域を Image-J software (NIH) にて計測し、全領域に対する石灰化組織領域の割合で表した [21, 22]。

### 3-2-14. シングルコロニー由来細胞解析

歯髄組織より単離した IP-DPSCs もしくは健常 DPSCs を 1 ウェルにつき 1、2 もしくは 4 個の割合で 24-well プレートに播種し、増殖培養液にて培養した。細胞が 2 個以上付着したウェルはその後の解析から除外した。単一細胞のみ付着したウェルのみ 14-16 日間培養した。培地は 1 週間に 2 度交換した。単一コロニ



一形成細胞を、その後のポピュレーションダブリング試験、BrdU 取り込み試験、*in vitro* 象牙質形成試験に供した [18, 19, 23]。

### 3-2-15. 遺伝子発現解析

TRIzol (Invitrogen) を用いて、培養細胞から RNA を抽出し、DNase I (Promega、Madison、WI、USA) で酵素処理し、RNeasy Mini kit (Qiagen、Venlo、Netherlands) を用いて total RNA を精製した。1  $\mu\text{g}$  の total RNA を、Revertra Ace qPCR kit (TOYOBO、大阪、日本) を用いて逆転写した。

半定量的 RT-PCR 解析のために、Quick Taq HS DeyMix (TOYOBO) と特異的プライマーペア (表 3-2) を用いて、T-100 thermal cycler (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) にて cDNA の増幅を行った。各 PCR 増幅産物から 5  $\mu\text{l}$  を用いて 2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、ethidium bromide により染色を行った。ゲルはゲル撮影装置 Gel Doc (Bio-Rad) を使用して、画像を取得した。

qRT-PCR 解析のために、TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) と標的の TaqMan Probe (Applied Biosystems) (表 3-3) を用いて、Light Cycler 96 real-time PCR system (Roche) にて cDNA の増幅を行った。18S ribosomal RNA を標準化に用いた [24, 25]。

### 表 3-2 : RT-PCR 用プライマーペアリスト

[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

*alkaline phosphatase (ALP)* (X14390)

sense: 5'-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3' (nucleotide 322-341)

antisense: 5'-CTGGTAGGCGATGTCCTTA-3' (nucleotide 779-797)

*CD271* (NM\_002507)

sense: 5'-CACCTCCAGAACAAGACCTC-3' (775-794)

antisense: 5'-GAGCCGTTGAGAAGCTTCTC-3' (1167-1186)

*dentin sialophosphoprotein (DSPP)* (NM\_014208)

sense: 5'-GGCAGTGAAGTCAAAAAGGAGC-3' (1630-1649)

antisense: 5'-TGCTGTCAGTCACTGCTG-3' (1815-1834)

*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (M33197)

sense: 5'-AGCCGCATCTTCTTTTGCCTC-3' (12-32)

antisense: 5'-TCATATTTGGCAGGTTTTTCT-3' (807-827)

*lipoprotein lipase (LPL)* (X14390)

sense: 5'-ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC-3' (118-138)

antisense: 5'-GTTAGGTCCAGCTGGATCGAG-3' (661-681)

*NANOG* (NM\_024865)

sense: 5'-TCCTCCATGGATCTGCTTATTCA-3' (382-404)

antisense: 5'-CAGGTCTTCACCTGTTTGTAGCTGAG-3' (616-641)

*NESTIN* (NM\_006617)

sense: 5'-CAGCGTTGGAACAGAGGTTGG-3' (852-872)

antisense: 5'-TGGCACAGGTGTCTCAAGGGTAG-3' (1218-1240)

*NOTCH1* (NM\_017617)

sense: 5'-CACCCAGAACTGCGTGCA-3' (3840-3857)

antisense: 5'-GGCAGTCAAAGCCGTCGA-3' (4547-4564)

*octamer4 (OCT4)* (NM\_203289)

sense: 5'-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG-3' (1495-1518)

antisense: 5'-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC-3' (1613-1638)

*osteocalcin (OCN)* (X53698)

sense: 5'-CATGAGAGCCCTCACA-3' (18-33)

antisense: 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3' (316-332)

*peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2)* (AB451337)

sense: 5'-CTCCTATTGACCCAGAAAGC-3' (23-42)

antisense: 5'-GTAGAGCTGAGTCTTCTCAG-3' (350-369)

*runt-related gene 2 (RUNX2)* (L40992)

sense: 5'-CAGTTCCCAAGCATTTCATCC-3' (880-900)

antisense: 5'-TCAATATGGTCGCCAAACAG-3' (1304-1323)

表 3-3 : qRT-PCR 用 TaqMan Probe リスト

[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

---

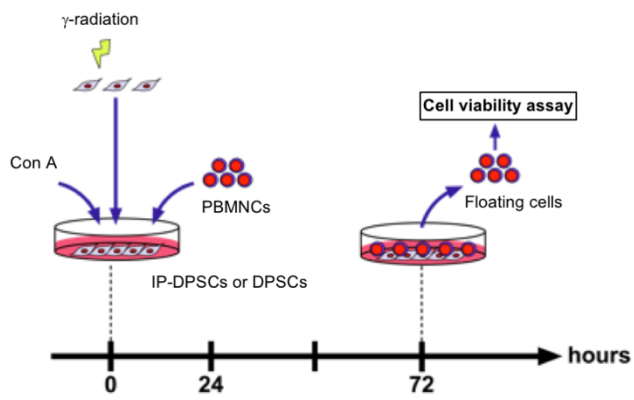
<b>Gene names</b>	<b>Gene assay ID numbers</b>
alkaline phosphatase ( <i>ALP</i> )	Hs00171172_m1
dentin sialophosphoprotein ( <i>DSPP</i> )	Hs00171962_m1
indoleamine 2,3-dioxygenase ( <i>IDO</i> )	Hs00984148_m1
lipoprotein lipase ( <i>LPL</i> )	Hs00173425_m1
osteocalcin ( <i>OCN</i> )	Hs01587814_g1
peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ 2 ( <i>PPARG2</i> )	Hs00234592_m1
ribosomal RNA, 18S ( <i>18S</i> )	Hs03928985_g1
runt-related gene 2 ( <i>RUNX2</i> )	Hs01047973_m1

---

### 3-2-16. PBMNC の細胞増殖試験

全末梢血から、Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) を用いて PBMNCs を分離した。P3 の IP-DPSCs と健常 DPSCs に、MBR-1520R-3 (Hitachi、東京、日本) を使用して、照射量 30 Gy の $\gamma$ 線照射を行った。 $\gamma$ 線照射した IP-DPSCs と健常 DPSCs を 96-well プレーットの 1 ウェル当たり  $0.1 \times 10^3$ 、 $10 \times 10^3$ 、 $100 \times 10^3$  個播種し、一晚インキュベートした。培養には RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) を基礎培地とし、10%熱非働化 FBS (Equitech-Bio)、2 mM L-glutamine (ナカライテスク)、1 mM sodium pyruvate (ナカライテスク)、100 U/ml penicillin/100  $\mu$ g/ml streptomycine (ナカライテスク) を組成としたコンプレート培地を使用した。その後、各ウェルに  $100 \times 10^3$  個のヒト PBMNCs を播種した。この時、培地に concanavalin A (ConA) (10  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) を添加もしくは無添加の条件にて、混合培養した (図 3-2-3 a)。また、トランスウェルシステム HTS Transwell-96 permeable support (Corning, Acton, MA, USA) を用いて、PBMNCs と $\gamma$ 線照射済みの IP-DPSCs もしくは健常 DPSCs を共培養した。IP-DPSCs と健常 DPSCs をウェル下部に、PBMNCs をトランスウェルに播種した (図 3-2-3 b)。72 時間後、浮遊細胞の細胞生存を Cell Counting Kit-8 (同仁科学研究所) にて解析した。吸光度は 450 nm で Multiskan GO スペクトロフォトメーター (Thermo Scientific) を用いて測定した。

**a**



**b**

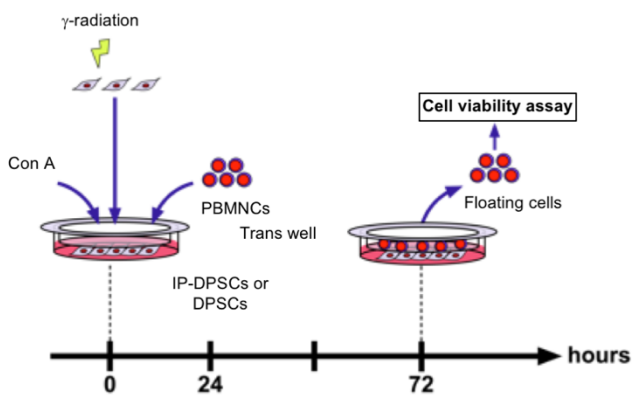


図 3-2-3. IP-DPSCs および健常 DPSCs と PBMNCs の共培養系

[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

IP-DPSCs もしくは健常 DPSCs を cyclooxygenase (COX) および nitric oxide synthase (NOS)、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の各インヒビターである indomethacin (20  $\mu$ M; Sigma-Aldrich)、N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (1 mM; Sigma-Aldrich)、1-methyl-L-tryptophan (1-MT) (500  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) により前処理した (図 3-2-4)。また、抗ヒト IL-10 抗体 (10  $\mu$ g/ml; R&D Systems) および抗ヒト transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 1 抗体 (10  $\mu$ g/ml; R&D Systems)、もしくは同一アイソタイプモノクローナル抗体 (10  $\mu$ g/ml; R&D Systems) にて前処理した (図 3-2-4)。Conditioned Medium (CM) を回収し、15,000 rpm で 30 分間遠心分離した。それらを 0.45- $\mu$ m フィルターに通し、L-kynurenine ならびに IL-10 の産生を解析した [7, 26]。

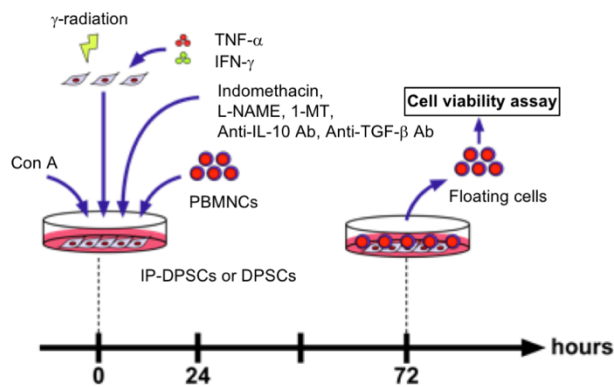


図 3-2-4. インヒビターもしくは中和抗体を添加した IP-DPSCs および健常 DPSCs と PBMCs の共培養系 [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

### 3-2-17. TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ による処理

IP-DPSCs もしくは健常 DPSCs を通常培養液にて培養し、TNF- $\alpha$  (100 ng/ml; PeproTech) または IFN- $\gamma$  (100 ng/ml; PeproTech) により 24 時間処理した後、各実験に供した。

### 3-2-18. IDO 活性解析

IDO 活性は、ConA にて活性化した PBMNCs と IP-DPSCs もしくは健常 DPSCs を共培養した培養上清中の L-kynurenine を計測した [7]。

### 3-2-19. IL-10 測定

ConA にて活性化した PBMNCs と IP-DPSCs もしくは健常 DPSCs を共培養した培養上清中のヒト IL-10 産生量を、Human IL-10 Quantikine ELISA kit (R&D Systems) を用いて、ELISA にて解析した。

### 3-2-20. Western blot 解析

培養細胞をそれぞれの培養期間で回収した。プロテアーゼインヒビターカクテル (ナカライテスク) と PhoSTOP ホスファターゼインヒビター (Roche) を添加した M-PER mammalian protein reagent (Life Technologies, Carlsbad, USA) にて溶解し、総タンパク質を抽出した。プロテインサンプルを NuPage LDS Sample buffer (Life Technologies) と混合し、70°C で 7 分間処理した。10  $\mu$ g のタンパク質を 10% TGX gels (Bio-Rad) を用いて電気泳動にて分離し、Trans-Blot Turbo Transfer System RTA Transfer Kit (Bio-Rad) と Trans-Blot Turbo blotting system (Bio-Rad) を用いて、polyvinylidene difluoride メンブレン (Bio-Rad) へ転写した。メンブレンを、5% skim milk を含有した Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM

Tris-HCl、pH 7.2) を用いて 1 時間室温でブロッキングした。その後、1 次抗体にて 4°C で一晩インキュベートした。本解析で使用した 1 次抗体は抗 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B p65) 抗体 (Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA)、抗 phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 Fas 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗  $\beta$ -actin 抗体 (Sigma-Aldrich) である。その後、horseradish peroxidase 標識 donkey 抗 rabbit IgG2 次抗体もしくは抗 mouse IgG 2 次抗体 (各 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) にて室温で 1 時間処理した。SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) にてメンブレンを処理し、ImageQuant LAS 4010 (GE Healthcare Life Sciences、Pittsburgh、PA、USA) にて撮影した [20, 21]。

### 3-2-21. 統計解析

すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準誤差として表した。全ての解析は、各サンプルにつき少なくとも 3 回繰り返した。2 群間の比較解析には独立 2 群の two-tailed Student's t-tests を用いた。多群間の比較解析には Tukey's post hoc test による一段階多重比較法を用いた。0.05 以下の P 値を有意差ありと見なした。



## §3-3. 結果

### 3-3-1. IP-DPSCs の幹細胞特性

組織学的解析にて、不可逆性歯髄炎の歯髄組織は、血管と神経線維を含む密性結合組織であった (図 3-3-1 a)。早期の MSC マーカーである STRO-1 の発現が、不可逆性歯髄炎の歯髄組織内の細胞に認められた (図 3-3-1b)。この所見は、健常ヒト歯髄組織における報告と同様であり [27]、不可逆性歯髄炎の歯髄組織内にも MSCs が存在する可能性を示唆する所見であった。

健常 DPSCs は、クローン形成能および自己複製能、特定表面抗原の発現能、多分化能、*in vivo* 象牙質再生能、免疫抑制能など、MSC の特性を有している [4, 5, 7]。IP-DPSCs の特性を詳細に検討するために、標準法である CFU-F 法を用いて不可逆性歯髄炎の歯髄組織より幹細胞を単離した [13]。単一の細胞が独立して培養用プラスチックディッシュに付着し、その後、細胞集団 (コロニー) を形成した (図 3-3-1 c)。各コロニーは様々な大きさと密度を呈した (図 3-3-1 d)。しかし、健常歯髄と比べて不可逆性歯髄炎の歯髄組織はコロニー形成効率が有意に低下していた (図 3-3-1 e)。

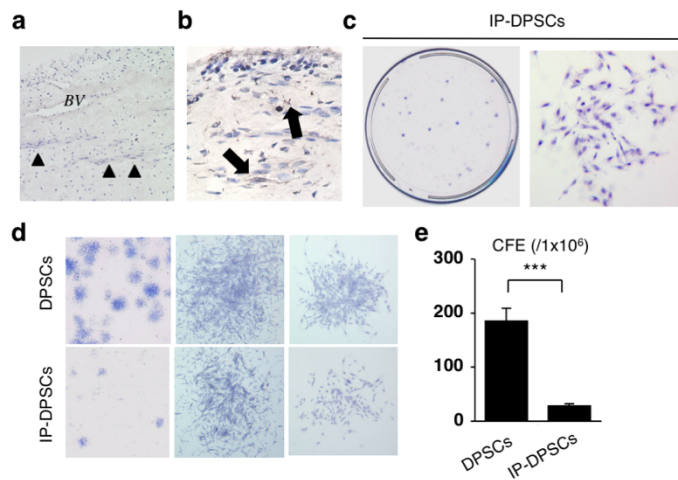


図 3-3-1. ヒト不可逆性歯髄炎歯髄組織の組織学的解析とヒト不可逆性歯髄炎由来歯髄幹細胞のコロニー形成能解析

(a) 組織化学的解析。ヒト不可逆性歯髄炎歯髄組織の組織解析。Hematoxylin and eosin (H&E) 染色。BV：血管，矢印：神経線維。(b) ヒト不可逆性歯髄炎歯髄組織における STRO-1 の局在。免疫組織学的解析。Hematoxylin 染色。矢印：STRO-1 陽性細胞。(c-e) 不可逆性歯髄炎歯髄組織より単離した細胞のコロニー形成解析。(c) Toluidine blue 染色。培養ディッシュ上の細胞コロニー像 (左)。コロニー形成細胞は、線維芽細胞様の形態を示した (右)。(d) コロニーの大きさならびに密度の相違。(e) DPSCs および IP-DPSCs におけるコロニー形成能力。初期播種細胞数  $1 \times 10^5$  個に対するコロニーの形成数で表示。a-e：DPSCs: ヒト健常歯髄組織由来歯髄幹細胞 human dental pulp stem cells from healthy dental pulp tissues, IP-DPSCs：ヒト不可逆性炎歯髄組織由来歯髄幹細胞 irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells。e：n=3。\*\*\*；危険率  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値 ± 標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

フローサイトメトリー解析にて、IP-DPSCsはSTRO-1、CD146、CD105、CD73、CD90に陽性を示し、造血細胞マーカーであるCD34、CD45、CD14に陰性を示した(図3-3-2)。この結果は、健常DPSCsと同様であった。

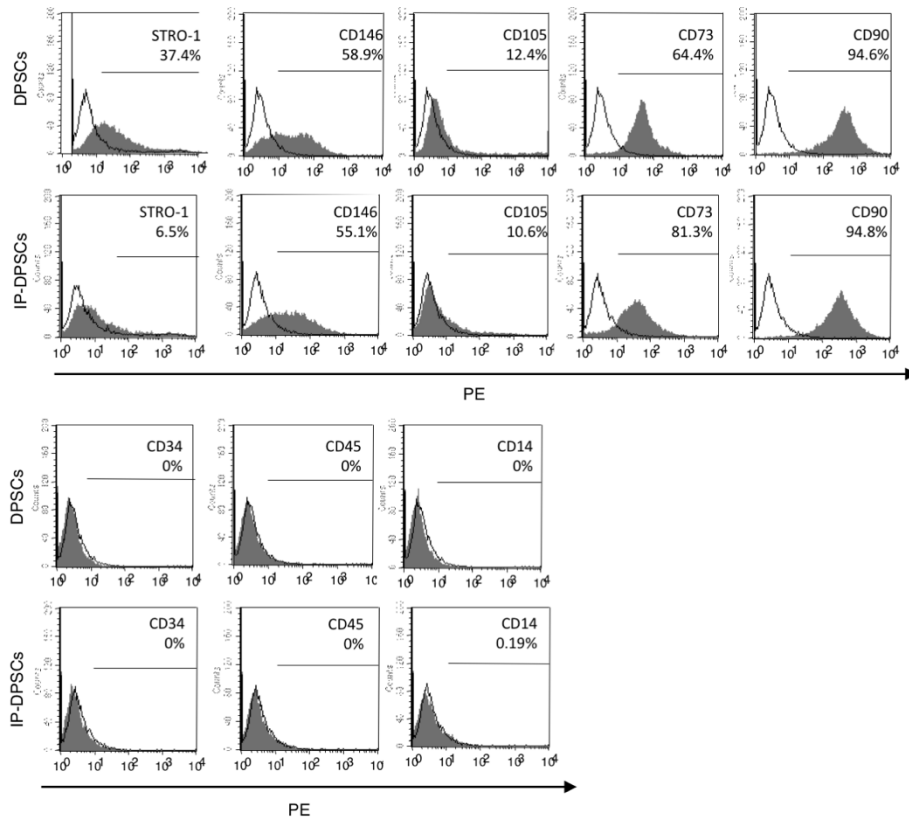


図3-3-2. IP-DPSCsの免疫表現型解析

フローサイトメトリー解析によるヒストグラム。白色：コントロール抗体反応群，灰色：細胞表面マーカー特異的抗体反応群。数値は陽性細胞数の百分率の平均を示す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

RT-PCR 解析にて、IP-DPSCs は胚性幹細胞マーカー遺伝子の *NANOG* と *OCT4*、神経堤細胞マーカー遺伝子の *NESTIN*、*NOTCH1*、*CD271* の発現を示した (図 3-3-3 a)。健常 DPSCs と比較して、IP-DPSCs は *CD271* 遺伝子の発現が顕著に低下していた。ポピュレーションダブリングおよび BrdU 取り込み試験にて、健常 DPSCs と比較して、IP-DPSCs の細胞増殖能力は有意に低下していた (図 3-3-3 b-d)。また、IP-DPSCs は健常 DPSCs より低いテロメラーゼ活性を示した (図 3-3-3 e)。これらの結果から、IP-DPSCs は健常 DPSCs と同様に、MSCs としての特性を備えていた。しかし、健常 DPSCs と比較して stemness が劣っている可能性が示唆された。

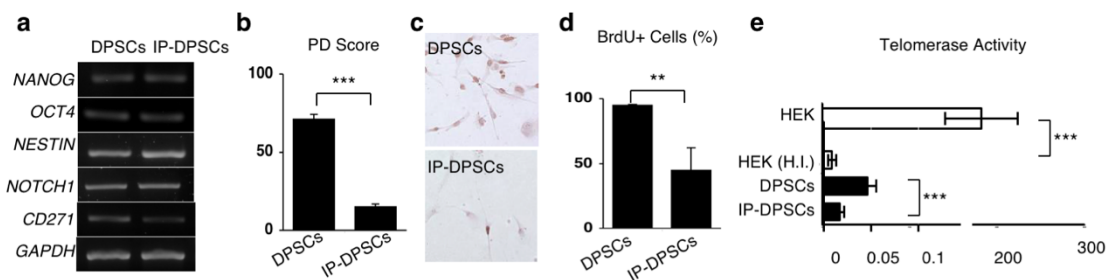


図 3-3-3. IP-DPSCs の幹細胞特性解析

(a) 胚性幹細胞ならびに神経堤細胞に対する特異的遺伝子の発現。半定量的 RT-PCR 解析。  
 (b) ポピュレーションダブリング試験。(c) Bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み試験。BrdU 陽性細胞像。Hematoxylin 染色。(d) BrdU 陽性細胞率。全有核細胞数に対する百分率で算出。  
 (e) テロメア反復配列増幅法試験。リアルタイム PCR による解析。HEK: HEK 293 細胞。H.I.: 熱不活化処理。b、d、e: n=3。\*\*\*; 危険率  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値 ± 標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

### 3-3-2. IP-DPSCs の多分化能

象牙芽細胞分化条件下で IP-DPSCs を 4 週間培養すると、Alizarin red 染色陽性のカルシウム沈着を示す石灰化結節が形成されていた (図 3-3-4 a, b)。RT-PCR と qRT-PCR にて、分化誘導後 1 週間の IP-DPSCs では、象牙芽細胞特異的遺伝子である *RUNX2*、*ALP*、*OCN*、*DSPP* が発現していた (図 3-3-4 c, d)。

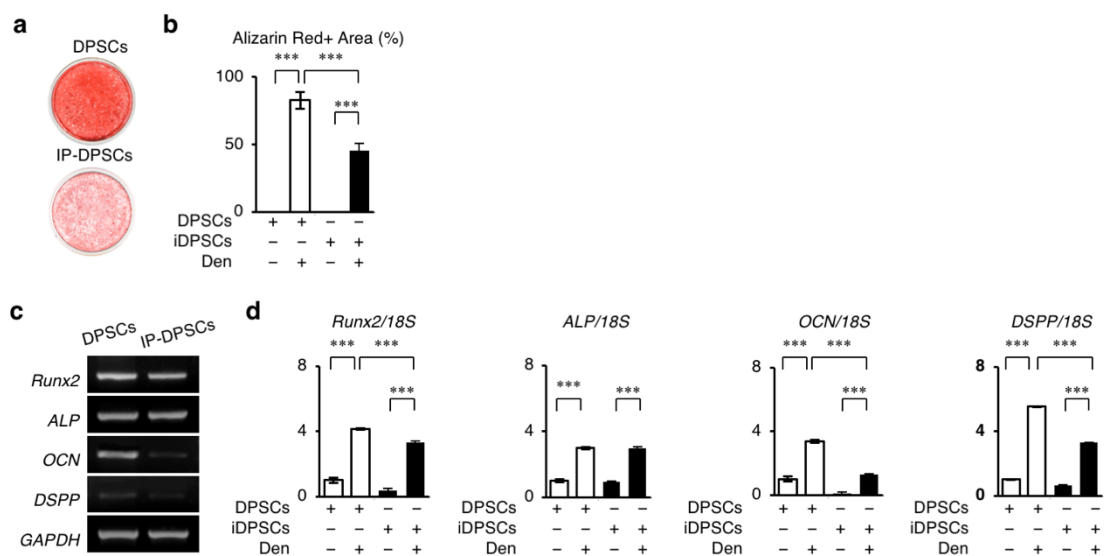


図 3-3-4. IP-DPSCs の象牙芽細胞分化能解析

(a) Alizarin red 染色像。(b) Alizarin red 陽性面積の割合。ディッシュ面積に対する百分率で算出。(c, d) 象牙芽細胞特異的遺伝子の発現。(c) 半定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析。(d) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) 解析。18S rRNA (18S) に対する割合で算出。b, d: Dentinogenic induction (Den) b, c: n=3。\*\*\* ;  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値±標準誤差で表す。 [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

次に IP-DPSCs を脂肪細胞分化条件下で 6 週間培養した。IP-DPSCs は Oil red O 染色法にて脂肪滴の蓄積を示した (図 3-3-5 a, b)。また RT-PCR と qRT-PCR にて、脂肪細胞特異的遺伝子である *LPL*、*PPARG2* の発現が確認された (図 3-3-5 c, d)。

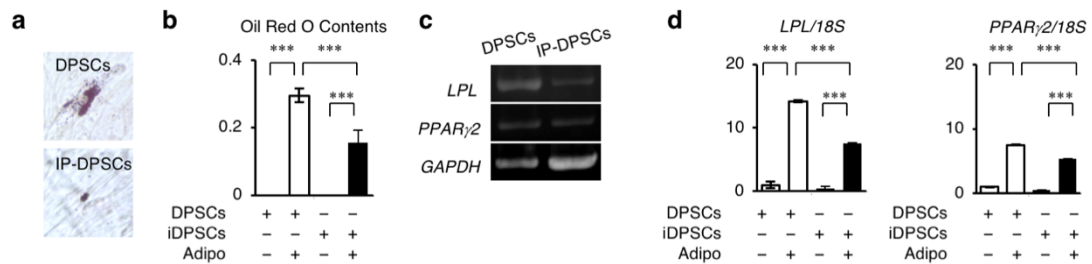


図 3-3-5. IP-DPSCs の脂肪細胞分化能解析

(a) Oil red O 染色像。(b) Oil red O 含有量測定。(c, d) 脂肪細胞特異的遺伝子の発現。(c) 半定量的 RT-PCR 解析。(d) 18S rRNA (18S) に対する割合で算出。b, c: n=3。\*\*\* ;  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値 ± 標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

IP-DPSCs を内皮細胞分化条件下で 7 日間培養した。免疫蛍光染色法にて、IP-DPSCs に CD31 の局在を認めた (図 3-3-6 a, b)。

IP-DPSCs を神経細胞分化条件下で 7 日間培養した。免疫蛍光染色にて、IP-DPSCs に GFAP、neurofilament M、tublin  $\beta$ III の局在を認めた (図 3-3-6 c, d)。

これらの結果から、IP-DPSCs は象牙芽細胞および脂肪細胞、内皮細胞、神経細胞への多分化能を示した。しかしながら、健常 DPSCs と比較して、IP-DPSCs において全ての分化能が劣っていた (図 3-3-4, 3-3-5, 3-3-6)。

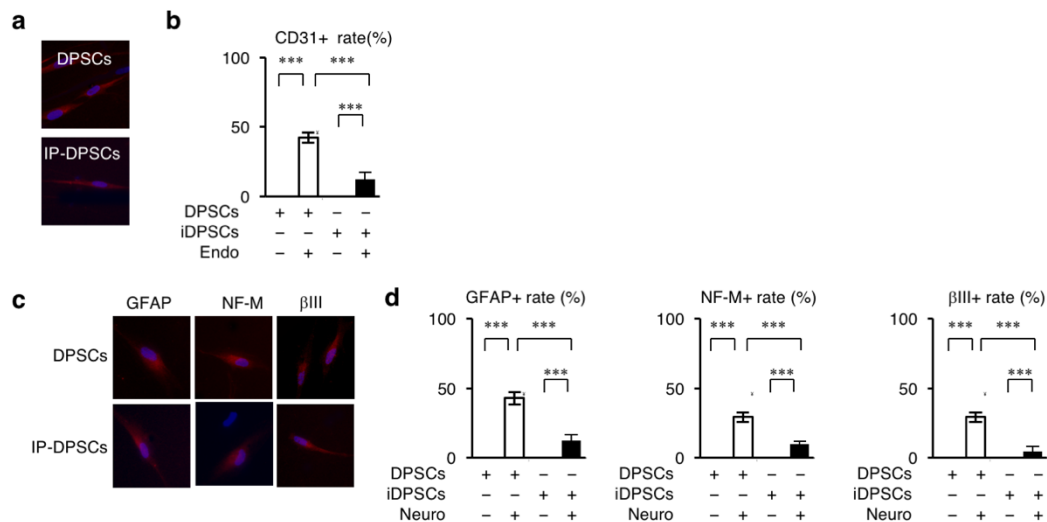


図 3-3-6. IP-DPSCs の内皮細胞および神経細胞分化能解析

(a) CD31 陽性細胞像。免疫蛍光法。DAPI 核染色。(b) CD31 陽性細胞率。全細胞に対する百分率で算出。(c, d) *in vitro* 神経細胞分化能 (c) 神経細胞特異的マーカー陽性細胞像。免疫蛍光法。DAPI 核染色。(d) 全細胞中の神経マーカー陽性細胞率。c, d :  $\beta$ III : tublin  $\beta$ III、GFAP : glial fibrillary acidic protein, NF-M : neurofilament M。b, d: n=3。\*\*\* ;  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値  $\pm$  標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用 改変]

### 3-3-3. IP-DPSCs による *in vivo* 象牙質／歯髄複合体再生

BALB/c nu/nu マウスの背部皮下に、HA/TCP を担体として IP-DPSCs を移植し、8 週間静置した (図 3-2-1)。組織学的解析にて、移植組織に象牙質／歯髄複合体様の構造物を認めた (図 3-3-7 a, b)。この結果は、以前の健常 DPSCs での報告と同様 [4, 5]、象牙質／歯髄複合体の再生能力を示す所見と考えられる。免疫蛍光染色法にて、ヒト CD146 もしくは DSPP 陽性細胞が新たに形成された石灰化組織と線維性結合組織の境界に沿って配列していた (図 3-3-7 c, d)。HA/TCP のみを移植した組織では、新たな石灰化物やヒト CD146 陽性細胞は認められなかった (データ未提示)。しかしながら、健常 DPSCs と比較した場合、IP-DPSCs は *in vivo* における象牙質／歯髄複合体再生能力が低下していた (図 3-3-7 e)。

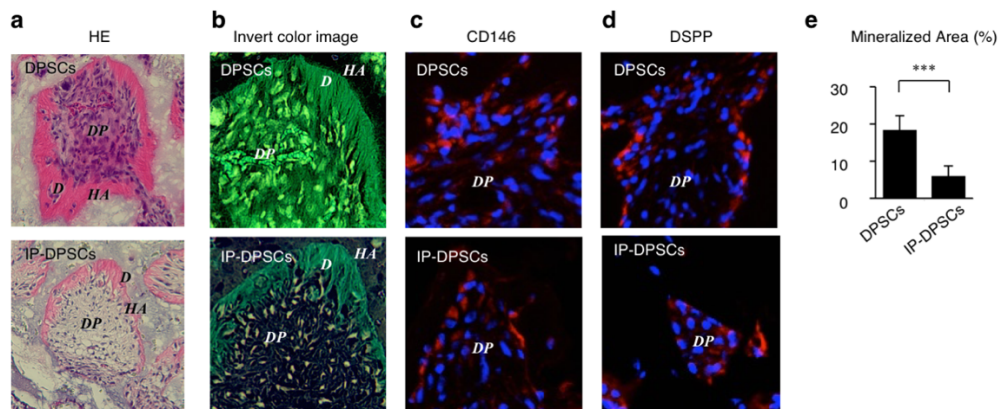


図 3-3-7. IP-DPSCs の *in vivo* での象牙芽細胞分化能解析

(a) 移植体の組織像。H&E 染色。(b) H&E 染色像の色調反転画像。(c, d) 免疫蛍光染色によるヒト CD146 (c) と DSPP (d) の局在。DAPI 染色。a-d: D: dentin, DP: dental pulp, HA: HA/TCP 担体。(e) 総面積に対する新生象牙質面積率。各群 n=3。\*\*\* ;  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値±標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]



### 3-3-4. IP-DPSCs の自己複製能

連続移植法は、DPSCs を含む幹細胞の自己複製能を証明するための最もスタンダードな方法である [4-6] (図 3-2-1)。IP-DPSCs を HA/TCP とともに免疫不全マウスの背部皮下へ 8 週間 1 次移植した。1 次移植体から単離した CFU-F 形成細胞を、HA/TCP とともに別の免疫不全マウスの背部皮下へ 2 次移植して、8 週間静置した。組織学的解析にて、2 次移植体に新たに形成された構造体は、1 次移植体と同様の象牙質/歯髄複合体様の構造を呈していた (図 3-3-8 a, b)。さらに、ヒトミトコンドリア陽性細胞と DSPP 陽性細胞が新たに形成された石灰化組織の境界部に配列していた (図 3-3-8 c, d)。ポピュレーションダブリング能ならびにテロメラーゼ活性は、幹細胞の自己複製能と深い関連性が報告されている [28]。IP-DPSCs ではこれらの能力が示されており (図 3-3-3 b, e)、連続移植法の結果と併せて、IP-DPSCs が自己複製能を備えていることが示された。

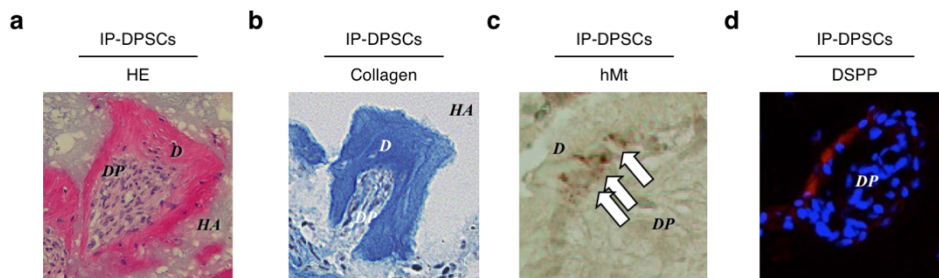


図 3-3-8. IP-DPSCs の自己複製能解析

(a) 2 次移植体の組織像。H&E 染色。(b) Alcian blue collagen 染色。(c) 免疫組織化学染色によるヒトミトコンドリア (hMt) 陽性細胞の局在 (矢印)。Hematoxylin 染色。(d) 免疫蛍光染色による DSPP の局在。DAPI 染色。 [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

### 3-3-5. IP-DPSCs の異質性

MSCs に認められる異質性 [23, 29] は、健常 DPSCs の特徴的な性質の一つである [5]。IP-DPSCs の異質性を検討するために、シングルコロニー解析を行った。不可逆性歯髄炎組織より計 12 個の単一コロニーに由来する細胞を単離し、ポピュレーションダブリング試験 (図 3-3-9 a)、BrdU 取り込み試験 (図 3-3-9 b)、*in vitro* 象牙芽細胞分化試験 (図 3-3-9 c) を行った。その結果、それぞれのコロニーに由来する細胞が示す増殖能や象牙芽細胞分化能に違いが認められた。従って、IP-DPSCs も異質性を示した。

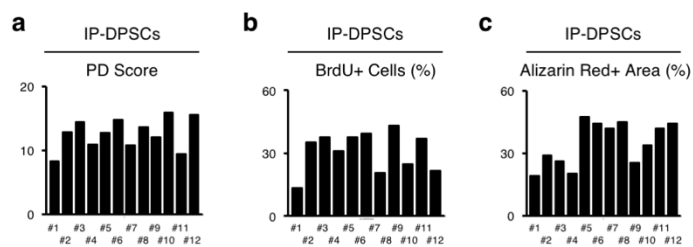


図 3-3-9. IP-DPSCs の異質性解析

シングルコロニー解析。(a) ポピュレーションダブリング試験。(b) 総有核細胞に対する BrdU 陽性細胞率。(c) 総面積に対する alizarin red 陽性面積率。 [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

### 3-3-6. IP-DPSCs の免疫抑制能

健常 DPSCs は T 細胞抑制能を示すことが報告されている [7]。γ 線照射を行った IP-DPSCs および PBMNCs を ConA (10 μg/ml) の刺激下または非刺激下で混合培養した (図 3-2-3 a)。ConA の非刺激下では IP-DPSCs の培養数にかかわらず、PBMNCs の生存には影響が認められなかった (図 3-3-10 a)。ConA 刺激下では、IP-DPSCs の細胞数依存的に、PBMNCs の生存は抑制されていた (図 3-3-10 b)。しかし、健常 DPSCs と比較すると、IP-DPSCs では ConA により活性化された PBMNCs の生存を抑制する能力が劣っていた (図 3-3-10 b)。

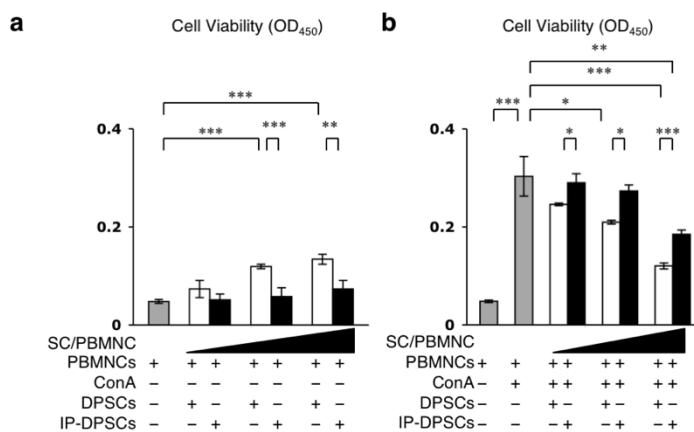


図 3-3-10. IP-DPSCs の免疫抑制能試験

(a, b) IP-DPSCs または健常 DPSCs との混合培養によるヒト末梢血単核細胞 human peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) の生存率。Concanavalin A (Con A) 非刺激下 (a) または刺激下 (b) にて、PBMNC と歯髄幹細胞 (SC) を種々の割合 (SC/PBMNC=0.01, 0.1, 1) で共培養した。a, b: n=3。\* ; 危険率  $P<0.05$ , \*\* ;  $P<0.01$ , \*\*\* ;  $P<0.005$  を示す。グラフは、平均値±標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

次に、トランスウェルカルチャーシステムを用いて、PBMNCs と IP-DPSCs もしくは健常 DPSCs を共培養した (図 3-2-3 b)。ConA による刺激、非刺激、また IP-DPSCs の培養数にかかわらず、PBMNCs の細胞生存へ影響は認められなかった (図 3-3-11 a,b)。

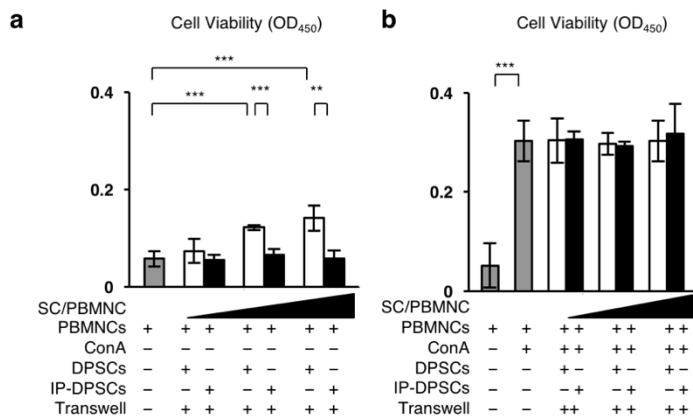


図 3-3-11. IP-DPSCs の免疫抑制能試験

(a, b) トランスウェルカルチャーシステムを用いた IP-DPSCs または健常 DPSCs との共培養による PBMNC の生存率。Con A 非刺激下 (a) または刺激下 (b) にて、PBMNC と歯髓幹細胞 (SC) を種々の割合 (SC/PBMNC=0.01, 0.1, 1) で共培養した。a, b : n=3。\*\* ; 危険率  $P<0.01$ , \*\*\* ;  $P<0.005$  を示す。グラフは、平均値±標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

MSCs に発現している Fas ligand が、T 細胞に発現している Fas に直接結合して、T 細胞の生存を抑制することが報告されている [30]。一方で、MSCs より分泌される多くの因子も T 細胞の免疫抑制に関与している [26, 31-33]。本研究で、IDO のインヒビターである 1-MT、NOS のインヒビターである L-NAME、COX のインヒビターである indomethacin にて、ConA により刺激された PBMNCs と IP-DPSCs もしくは健常 DPSCs の共培養系を処理した。さらに、IL-10 と TGF- $\beta$  の中和抗体にて処理した (図 3-2-4)。L-NAME と indomethacin、抗 TGF- $\beta$  抗体は PBMNCs の生存抑制を解除出来なかった (図 3-3-12)。一方で、1-MT もしくは抗 IL-10 抗体による処理では、IP-DPSCs または健常 DPSCs による PBMNCs の生存抑制を効果的に解除した (図 3-3-12)。

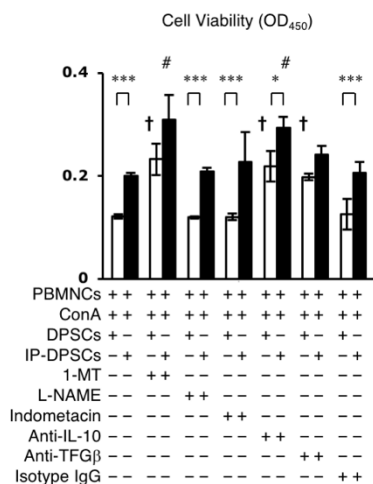


図 3-3-12. 阻害剤と中和抗体を用いた IP-DPSCs の免疫抑制能阻害試験

種々の阻害剤、中和抗体を添加し、Con A 刺激下で PBMNC と SC を 1 : 1 の割合で共培養した。1-MT: 1-Methyltryptophan, L-NAME: N-Nitro-L-arginine methyl ester, Anti-IL-10: anti-IL-10 antibody, Anti-TGF $\beta$ : anti-TGF $\beta$  antibody. n=3. \* ; 危険率  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$ , \*\*\* ;  $P < 0.005$  を示す。グラフは、平均値  $\pm$  標準誤差で表す。c : † ;  $P < 0.05$  無刺激下での PBMNC と DPSC との共培養した群との危険率。# ;  $P < 0.05$  無刺激下での PBMNC と IP-DPSC との共培養した群との危険率。 [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

ConA 刺激を受けた PBMNCs との共培養下で、IP-DPSCs では IDO mRNA を発現し (図 3-3-13 a)、その培養液中に L-kynurenine ならびに IL-10 の産生が認められた (図 3-3-13 b, c)。しかし、健常 DPSCs と比較すると、IDO mRNA 発現、L-kynurenine ならびに IL-10 の分泌は低下していた (図 3-3-13 a, b, c)。これらの結果から、IP-DPSCs は、PBMNCs との直接的な接触により、その細胞内で IDO が誘導され、L-kynurenine 産生に伴う、制御性 T 細胞からの IL-10 分泌によるリンパ球の増殖抑制に働く事が示唆された。しかし、健常 DPSCs と比較すると IDO 誘導が低いため IP-DPSCs の免疫抑制能は低下していた。

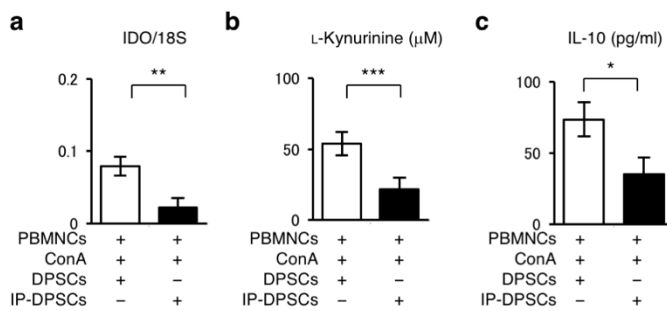


図 3-3-13. IP-DPSCs における免疫抑制能関連因子発現解析

(a) IP-DPSCs および健常 DPSCs における indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 発現。リアルタイム RT-PCR 解析。18S rRNA に対する IDO mRNA の割合。(b) ヒト歯髄幹細胞培養上清における L-Kynurenine 量。ELISA 解析。(c) ヒト歯髄幹細胞培養上清における IL-10 発現。ELISA 解析。a-c : n=3。\* ; 危険率  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$ , \*\*\* ;  $P < 0.005$  を示す。グラフは、平均値 ± 標準誤差で表す。 [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

### 3-3-7. IFN- $\gamma$ 処理による IP-DPSCs の象牙芽細胞分化能改善

TNF- $\alpha$ ならびに IFN- $\gamma$ の刺激が健常 DPSCs における象牙芽細胞分化能と免疫調節能に関与することが報告されている [7, 11]。そこで、まず、TNF- $\alpha$ もしくは IFN- $\gamma$ の刺激による、IP-DPSCs の劣った *in vitro* 象牙芽細胞分化能および *in vivo* 象牙質形成能の改善効果を検討した。IP-DPSCs に対する TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ の *ex vivo* における刺激は全て、*in vitro* 象牙芽細胞分化誘導ならびに *in vivo* 象牙質形成誘導を行う直前に行った。

まず、*in vitro* 象牙芽細胞分化への TNF- $\alpha$ または IFN- $\gamma$ 前処理の効果を検討した。IFN- $\gamma$ で前処理を行った IP-DPSCs (IFN- $\gamma$ 前処理群) は、象牙芽細胞分化誘導開始から 4 週間後にて、非前処理群と比較して非常に多くのアリザリンレッド陽性の石灰化小結節を形成していた (図 3-3-14 a, b)。また分化誘導後 1 週で、IFN- $\gamma$ 前処理群は、非前処理群と比較して、高い ALP 活性を示し (図 3-3-14 c)、象牙芽細胞/骨芽細胞特異的な遺伝子である *RUNX2*、*ALPL*、*OCN*、*DSPP* の発現が顕著に増加していた (図 3-3-14 d, e)。

一方、TNF- $\alpha$ 前処理群は、非前処理群と IFN- $\gamma$ 前処理群と比較して、*in vitro* 象牙質形成能が顕著に低下していた (図 3-3-14)。

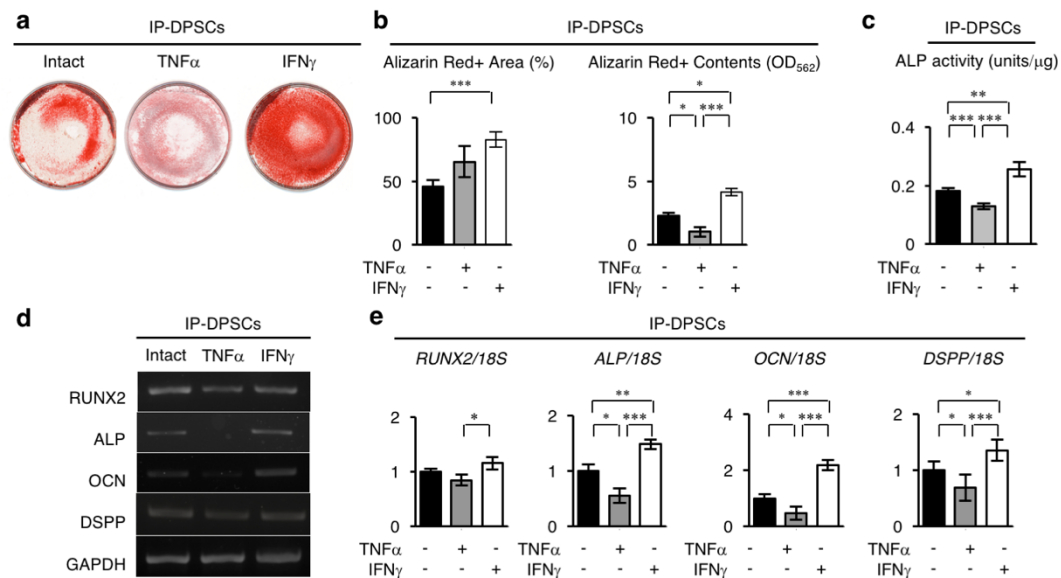


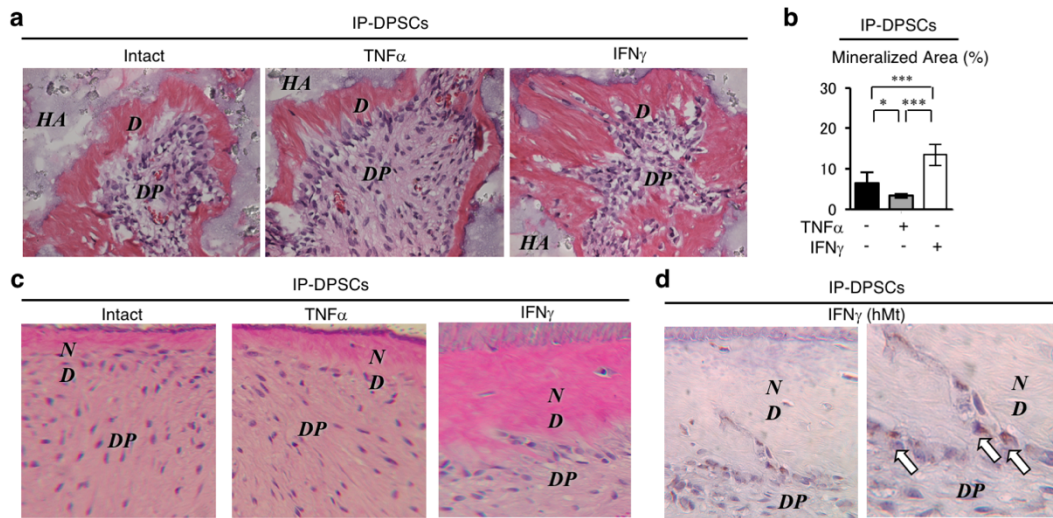
図 3-3-14. IFN- $\gamma$ および TNF- $\alpha$ 前処理した IP-DPSCs の *in vitro* における象牙芽細胞分化能  
 (a) Alizarin red 染色像。(b) ディッシュ面積に対する Alizarin red 陽性面積の割合と Alizarin red 含有量。(c) ALP 活性試験。(d) 象牙芽細胞特異的遺伝子の半定量的 RT-PCR 解析。  
 (e) 18S rRNA (18S) に対する象牙芽細胞特異的遺伝子の発現割合。b, e: n=3。\* ; 危険率  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$ , \*\*\* ;  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値  $\pm$  標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]



次に、*in vivo* 象牙質形成能への影響を検討するために、TNF- $\alpha$ または IFN- $\gamma$ による前処理を行った IP-DPSCs を HA/TCP と共に免疫不全マウスの皮下へ移植した。組織学的解析にて、IFN- $\gamma$ 前処理群では、非前処理群と比べて、移植組織内にて *in vivo* 象牙質／歯髄複合体様構造物を形成する能力が増加していた (図 3-3-15 a, b)。一方で、TNF- $\alpha$ 前処理群では、IFN- $\gamma$ 前処理群ならびに非前処理群と比較して、*in vivo* 象牙質／歯髄複合体様構造物の形成能が低下していた (図 3-3-15 a, b)。

象牙質／歯髄複体の再生へ与える影響をさらに調べるために、TNF- $\alpha$ または IFN- $\gamma$ により前処理した IP-DPSCs をヒト歯牙の根管へ移植した (図 3-2-2)。IP-DPSCs 移植によりヒト歯根象牙質表面に直接、象牙質様構造が形成されていた (図 3-3-15 c)。また、新規の象牙質様組織に面する根管には、線維性結合組織が観察された。IFN- $\gamma$ 前処理群では、ヒト歯根象牙質上に豊富な新規の象牙質様構造物が形成されていたが、一方で TNF- $\alpha$ 前処理群では、その様な新規の構造物は認められなかった (図 3-3-15 c)。新たに形成された象牙質様構造物では象牙細管が認められなかった。また、細胞がその表面に配列するとともに、その構造体内部に埋入している像も観察された。免疫組織染色解析にて、象牙質様構造物の表面に配列している細胞ならびに埋入している細胞は、ヒトミトコンドリア (図 3-3-15 d) ならびに DSPP (データ未提示) に陽性を示した。

これらの結果から、IP-DPSCs によるヒト象牙質上への象牙質／歯髄複合体再生は、IFN- $\gamma$ 前処理により促進されることが示唆された。



**図 3-3-15. IFN- $\gamma$ および TNF- $\alpha$ 前処理した IP-DPSCs の *in vivo* における象牙芽細胞分化能**  
 (a) 移植組織像。H&E 染色。D：象牙質，DP：歯髄，HA:HA/TCP。(b) 全面積中の新規に形成された石灰化基質面積率。(c, d) *In vivo* 象牙質形成能解析。(d) DP：歯髄, ND：新規に形成された象牙質。(d) 免疫化学組織学的解析。矢印：ヒトミトコンドリア。Hematoxylin 染色。b: n=3。\*;危険率  $P<0.05$ , \*\*\*;  $P<0.005$ 。グラフは、平均値±標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

### 3-3-8. IFN- $\gamma$ 処理による IP-DPSCs の免疫抑制能改善

STRO-1 の発現に対する TNF- $\alpha$ と IFN- $\gamma$ 処理の影響を調べた。フローサイトメトリー解析にて、非処理の IP-DPSCs と比較して、TNF- $\alpha$ 処理によって IP-DPSCs の STRO-1 発現が有意に減少しており、一方、IFN- $\gamma$ 処理によって IP-DPSCs の STRO-1 発現は有意に増加した (図 3-3-16 a)。BrdU 取り込み試験にて、非処理の IP-DPSCs と比較して、TNF- $\alpha$ 処理によって IP-DPSCs の増殖能は顕著に低下し、一方で IFN- $\gamma$ 処理によって IP-DPSCs の増殖能は有意に向上した (図 3-3-16 b)。

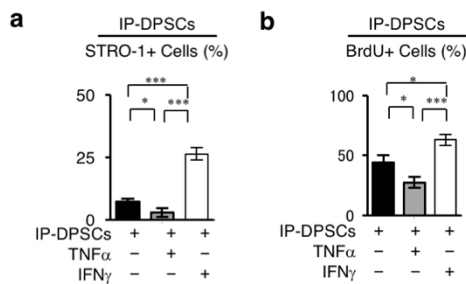


図 3-3-16. IFN- $\gamma$ および TNF- $\alpha$ 処理した IP-DPSCs の STRO-1 発現解析と増殖能解析

(a) STRO-1 の発現。フローサイトメトリー。(b) BrdU 取り込み試験。全有核細胞中の BrdU 陽性細胞率。n=3。\* ; 危険率  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$ , \*\*\* ;  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値  $\pm$  標準誤差で表す。 [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より改変]

次に、TNF- $\alpha$ と IFN- $\gamma$ が、ConA で刺激し活性化させた PBMNCs と共培養下で IP-DPSCs の免疫抑制能に対する影響について調べた。RT-qPCR 解析と L-kynurenine 産生試験にて、IFN- $\gamma$ 前処理は、ConA で刺激し活性化させた PBMNCs との共培養下で、IP-DPSCs における IDO mRNA の発現と L-kynurenine の産生を増加したが、一方で TNF- $\alpha$ 前処理では増加しなかった (図 3-3-17 a, b)。同様に、ELISA にて、IFN- $\gamma$ 前処理により、IL-10 産生が増加したが、一方で TNF- $\alpha$ 前処理では低下した (図 3-3-17 c)。

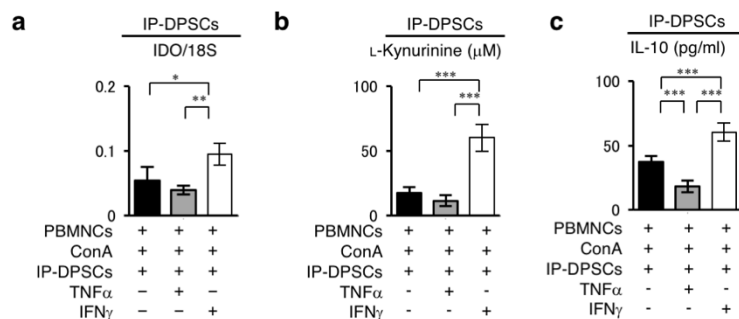


図 3-3-17. IFN- $\gamma$ および TNF- $\alpha$ 前処理した IP-DPSCs の免疫抑制能関連因子発現解析

(a) IDO の発現。qRT-PCR 解析。18S rRNA に対する IDO mRNA の発現割合。(b) 培養上清中の L-kynurenine の発現。ELISA。(c) 培養上清中の IL-10 の発現。ELISA。n=3。\* ; 危険率  $P<0.05$ , \*\* ;  $P<0.01$ , \*\*\* ;  $P<0.005$ 。グラフは、平均値±標準誤差で表す。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

続いて、TNF- $\alpha$ もしくはIFN- $\gamma$ にて前処理したIP-DPSCsとConAで刺激したPBMNCsを共培養した。この共培養系にて、PBMNCsの細胞生存は顕著に抑制された(図3-3-18)。IFN- $\gamma$ 前処理はTNF- $\alpha$ 前処理より抑制効果が高かった(図3-3-18)。上記の実験系におけるPBMNCの生存抑制は、1-MTと抗IL-10抗体処理により顕著に阻害された(図3-3-18)。これらの結果から、IFN- $\gamma$ 前処理はIP-DPSCsの免疫調節能を回復することが示唆された。

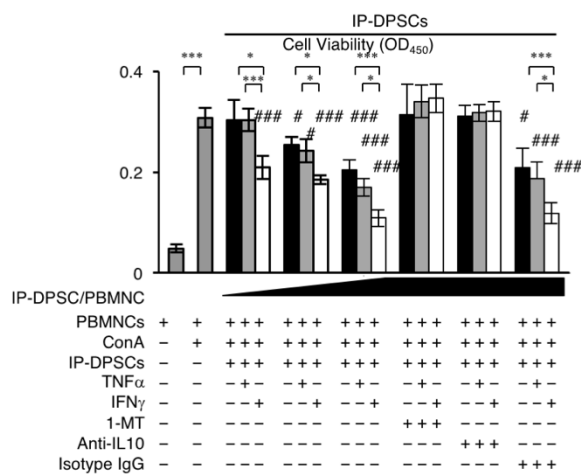


図3-3-18. IFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ 前処理したIP-DPSCsの免疫抑制能解析

IP-DPSCとの混合培養によるPBMNCの生存率。種々の阻害剤、中和抗体を添加し、ConA刺激下でPBMNCとIP-DPSCsを種々の割合(SC/PBMNC=0.01,0.1,1)で共培養した。n=3。

\* ; 危険率  $P<0.05$ , \*\* ;  $P<0.01$ , \*\*\* ;  $P<0.005$ 。グラフは、平均値±標準誤差で表す。# ;  $P<0.05$ , ###;  $P<0.005$  無刺激下でPBMNCをIP-DPSCsと共培養した群との危険率。[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

更に TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  処置による、IP-DPSCs における NF- $\kappa$ B の時間依存的な発現の変化を調べた。TNF- $\alpha$  処理によって IP-DPSCs における NF- $\kappa$ B のリン酸化が亢進したが、一方で IFN- $\gamma$  処理と未処理の IP-DPSCs では認められなかった (図 3-3-19 a)。

TNF- $\alpha$  処理と IFN- $\gamma$  処理が IP-DPSCs のテロメラーゼ活性に与える影響を調べた。TNF- $\alpha$  は、IP-DPSCs のテロメラーゼ活性を顕著に低下していた (図 3-3-19 b)。未処理の IP-DPSCs と比較して、IFN- $\gamma$  処理の IP-DPSCs は、有意にテロメラーゼ活性が増加していた (図 3-3-19 b)。

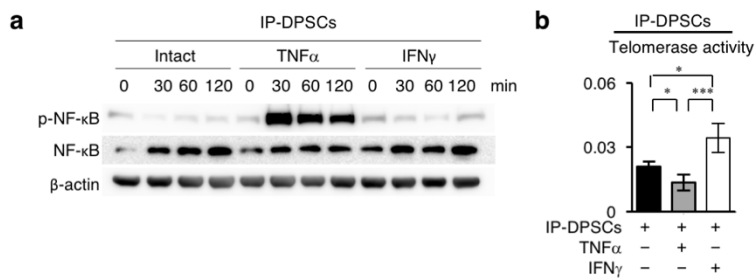


図 3-3-19. IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  処理した IP-DPSCs の NF- $\kappa$ B シグナル解析とテロメラーゼ活性解析

(a) 象牙質形成ならびに免疫抑制能活性経路のシグナル解析。ウエスタンブロット解析。

(b) TRAP assay。qRT-PCR 解析。n=3。\* ; 危険率  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$ , \*\*\* ;  $P < 0.005$ 。グラフは、平均値  $\pm$  標準誤差で表す。 [Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]

### §3-4. 小括

実験 I から以下のことが分かった。

IP-DPSCs は、

1. *in vitro* にて CFU-F を形成した。
2. MSCs と同様の幹細胞性を備えていた。
3. *in vitro* にて、象牙芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞、神経細胞への多分化能を示した。
4. *in vivo* にて、象牙質／歯髄複合体再生能を示した。
5. 自己複製能を有していた。
6. 異質性を有する幹細胞集団であった。
7. 免疫抑制能を有していた。
8. 健常 DPSCs と比較して、1-7 の能力が抑制されていた。
9. IFN- $\gamma$ 前処理によって、*in vitro* における象牙芽細胞が改善した。
10. IFN- $\gamma$ 前処理によって、*in vivo* における象牙質／歯髄複合体再生能が改善した。
11. IFN- $\gamma$ 処理によって、STRO-1 陽性率、細胞増殖能が向上した。
12. IFN- $\gamma$ 前処理によって、免疫抵抗性、免疫抑制能が向上した。
13. IFN- $\gamma$ 処理によって、NF- $\kappa$ B シグナル非依存的かつ、テロメラーゼ活性の向上を介して機能改善することが示唆された。
14. TNF- $\alpha$ 前処理では、9-13 の効果は認められなかった。

#### §4. 研究 II

「歯髓組織幹細胞の単離における血清濃度の影響に関する  
試験」



## §4-1. 目的

従来より、MSCs の単離方法として、クローナル性に基づく CFU-F 形成法が標準プロトコールとして採用されている [34]。この CFU-F に基づく歯髄組織幹細胞の単離では、15% FBS を添加した培養液を用いてきた [4, 19]。この標準プロトコールでは、骨髄由来間葉系幹細胞 bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) において、初期接着時間の及ぼす影響について検討されている [15]。しかし、細胞付着に対する FBS 濃度の影響については、これまで検討されていない。また、骨髄液中にはこの標準法では、付着しない浮遊型 BMMSCs の存在も報告され、この浮遊型 BMMSCs は付着型 BMMSCs と比べると、免疫調節能が優れていることが判明している [35]。

研究 II では、5%、10%、15% の FBS 濃度条件下において、CFU-F 形成プロトコールにて歯髄組織幹細胞を単離し、stemness、特に表面抗原の発現と細胞増殖能を各 FBS 濃度間で検討し、単離に最適な FBS の条件を探求することとした。

## §4-2. 材料と方法

### 4-2-1. ヒト乳歯サンプル

全てのヒト乳歯試料は、九州大学病院小児歯科にて全身的に健常な歯科受診の患児 (6 歳-8 歳、n=3) から、生物学的／臨床的に破棄される試料として得た。ヒト由来試料の取り扱いにはヘルシンキ宣言に従って実施され、九州大学ヒトゲノム・遺伝子研究倫理審査委員会承認を受けている (Protocol Number: 393-01)。全ての試験項目について、患児の保護者より、書面でのインフォームドコンセントを取得した。実験方法は承認されたガイドラインに従って実施された。

#### 4-2-2. 細胞の単離 (CFU-F コロニー形成法)

乳歯歯髄組織からの stem cell from human exfoliated deciduous teeth (SHED) の単離と培養は、**3-2-4.**での方法と同様に行った。ただし、培地の FBS 濃度を、5、10、15%の三種で行った。また、可能な限り初期付着細胞を増加させる目的で、初期付着時間を 48 時間へ変更した。

#### 4-2-3. CFU-F 解析

**3-2-5.**と同様の手法を用いて解析を行った。ただし、培地の FBS 濃度を 5、10、15%の3段階とした。

#### 4-2-4. 単離細胞数解析

滅菌 PBS で培養ディッシュを洗浄した。2.5 g/l trypsin / 1 mM EDTA 溶液 1 mL 加え、37°C、5 分間処理した。4 mL の 5, 10, 15% FBS 含有培地を加え、懸濁した。懸濁液を回収し、遠心機 Allegra X-30R (Beckman Coulter、Indianapolis、IN、USA) を使用し 2,000 rpm、4°Cにて遠心分離を行った。上清を捨て、1mL の $\alpha$ -MEM で十分に混和した。0.4% trypan blue 染色液 (Bio-Rad) にて染色を施し、細胞数を T20 Cell Counter (Bio-Rad) にて計測した。

#### 4-2-5. 細胞増殖解析

96-well プレート 1 well 当たり  $10 \times 10^3$  個の有核細胞を播種。各種 FBS 含有培養液 200  $\mu$ L で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。播種後 1 日目に、BrdU 試薬 (Roche) を添加した。BrdU 試薬添加から 24 時間後に、Cell Proliferation ELISA (Roche) を用いて培養細胞を処理した。Multiskan GO スペクトロフォトメーター (Thermo Scientific) をもちいて 370 nm の吸光度を測定した。

#### 4-2-6. 免疫表現型解析

3-2-6.と同様の手法を用いて解析を行った。本解析で用いる全ての1次抗体は表 4-2-1 に列挙した。

表 4-2-1 : フローサイロメトリー用抗体リスト

<b>Names of antibodies</b>	<b>Types of antibodies</b>	<b>Names of Suppliers</b>
anti-CD14 antibody	R-PE -conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD29 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD34 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD45 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD73 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD90 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD105 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD146 antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-HLA-DR antibody	R-PE-conjugated	eBioscience (San Diego, CA)
anti-SSEA4 antibody	R-PE-conjugated	R&D systems (Minneapolis, MN)

R-PE: R-phycoerythrin

#### 4-2-7. 統計解析

3-3-21.と同様に解析を行った。

## § 4-3. 結果

### 4-3-1. CFU-F 解析

乳歯歯髓組織を、collagenase/dispase 混合酵素液にて処理し、細胞を単離した。単離細胞を 15%、10%、5%FBS 濃度の培地を用いて、CFU-F 形成法に基づき培養を行った。その後、toluidine blue にて染色した。各濃度の FBS を用いても線維芽細胞様細胞から構成されるプラスチックディッシュ付着性の細胞集団、CFU-F が観察された (図 4-3-1 a)。細胞数 50 以上からなる付着細胞集団を CFU-F コロニーと見なし、培養ディッシュ上で形成された CFU-F コロニーを計測した。10%FBS 単離群では、15%FBS 単離群と比較して有意に形成コロニー数が多かった ( $p=0.0009$  vs. 15%FBS 単離群) (図 4-3-1 b)。一方、5%FBS 単離群と比べるとコロニー数に差が認められなかった。

CFU-F コロニーを形成した細胞数を計測したところ、10%FBS 単離群が、他の FBS 単離群と比較して有意に細胞数が多かった ( $p=0.0004$  vs. 15%FBS 単離群 ;  $p=0.000004$  vs. 5%FBS 単離群) (図 4-3-1 c)。

形成されたコロニー当りの単離細胞数を解析した。15%および 10%FBS 単離群では、ほぼ同等の細胞数が得られた (図 4-3-1 d)。一方、5%FBS 単離群では、15%および 10%FBS 単離群と比較すると有意に少なかった ( $p=0.0006$  vs. 15%FBS 単離群 ;  $p=0.000003$  vs. 10%FBS 単離群)。

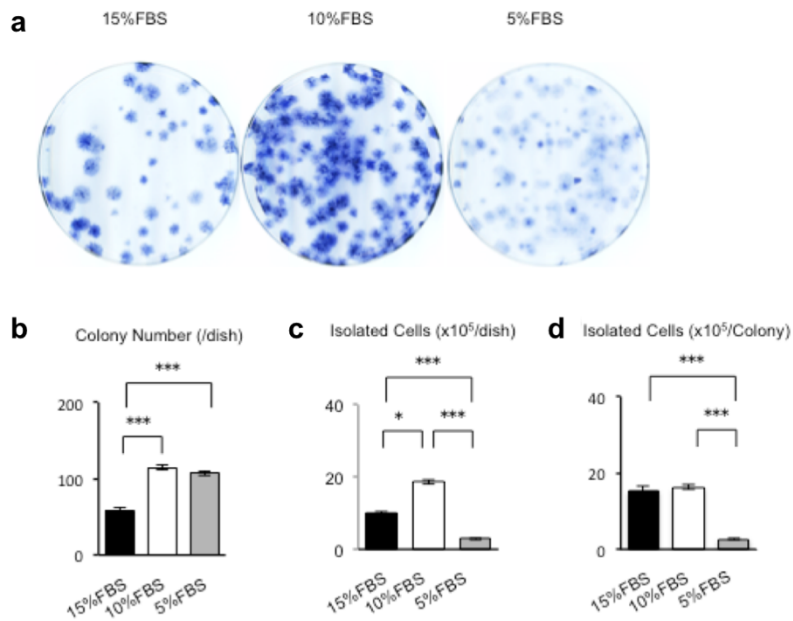


図4-3-1. コロニー形成能の解析

乳歯歯髄より単離した有核細胞を  $0.1 \times 10^6$  個で播種した。(a) CFU-F コロニー。toluidine 染色。

(b) CFU-F コロニー形成数。(c) CFU-F コロニー形成細胞数。(d) CFU-F コロニー当りの細胞数。n=3。15%FBS : 15%FBS 単離群、10%FBS : 10%FBS 単離群、5%FBS : 5%FBS 単離群。グラフは、平均値±標準誤差で表す。\* :  $p < 0.05$ 、\*\*\* ;  $p < 0.005$ 。

#### 4-3-2. 細胞増殖能解析

MSCs の特性である細胞増殖能を BrdU 取り込みアッセイにて解析した。まず、各 FBS 濃度単離群を、15%FBS 含有培地存在下で培養した。10%FBS 単離群が最も高い細胞増殖能を示した。しかし、10%FBS 単離群は 15%FBS 単離群と比較して有意に細胞増殖能が上昇していたが ( $p=0.033$  vs. 15%FBS 単離群)、5%FBS 単離群とは差が認められなかった (図 4-3-2 a)。次に、10%FBS 条件下で各 FBS 濃度単離群の細胞増殖能を比較した所、10%FBS 単離群が最も高い細胞増殖能を示した。しかし、10%FBS 単離群は 15%FBS 単離群と比較して有意に細胞増殖能が上昇していたが ( $p=0.006$  vs. 15%FBS 単離群)、5%FBS 単離群とは差が認められなかった (図 4-3-2 b)。さらに、5%FBS 条件下で培養を行った場合、10%FBS 単離群が最も高い細胞増殖能を示したが、各群との有意差は認められなかった (図 4-3-2 c)。最後に、単離時に用いた各 FBS 濃度にて増殖能力を比較したところ、10%FBS 濃度単離群が最も高い細胞増殖能を示した。10%FBS 濃度単離群は 15%FBS 濃度単離群と比較して有意に細胞増殖能が上昇していたが ( $p=0.006$  vs. 15%FBS 単離群)、5%FBS 単離群とは差が認められなかった (図 4-3-2 d)。

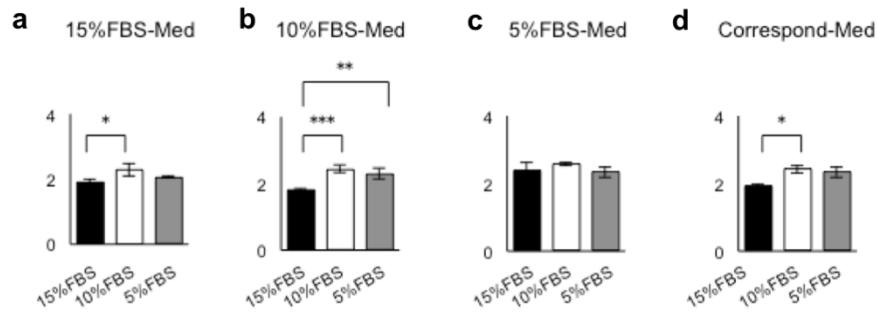


図4-3-2. 細胞増殖能の解析

乳歯幹細胞の細胞増殖力を BrdU 取り込みアッセイで解析した。(a) 15%FBS 培地 (15%FBS-Med) を用いた解析。(b) 10%FBS 培地 (10%FBS-Med) を用いた解析。(c) 5%FBS 培地 (5%FBS-Med) を用いた解析。(d) 細胞単離と同じ培地 (Correspond-Med) を用いた解析。n=3。15%FBS : 15%FBS 単離群、10%FBS : 10%FBS 単離群、5%FBS : 5%FBS 単離群。グラフは平均値±標準誤差で表す。\* : p<0.05、\*\* : p<0.01、\*\*\* ; p<0.001。

### 4-3-3. フローサイトメトリー解析

MSCs の特性を示す表面抗原の発現状態を検討した。標的表面抗原として、CD146, CD105, CD73, CD90, CD29, stage specific antigen-4 (SSEA-4) , HLA-DR, CD34, CD45, CD14 の 10 抗原を解析対象とした (図 4-3-3 a)。

各 FBS 濃度単離群とも造血系細胞のマーカーである CD45 および CD14 は陰性反応を示していた。一方、CD34 については、15%および 5%FBS 単離群では陰性であったが、10%FBS 単離群では  $7.4 \pm 0.3\%$  (平均値 $\pm$ 標準誤差) と有意に陽性を示していた ( $p=0.0001$  vs. 15%FBS 単離群, 10%FBS 単離群) (図 4-3-3 b)。

HLA-DR は各 FBS 濃度単離群とも陰性を示していた (図 4-3-3a)。

MSCs のマーカーである CD146, CD105, CD73, CD90, CD29 は各 FBS 濃度単離群ともに陽性反応を示した。CD105, CD73, CD90, CD29 は全ての群において 94%以上の高い陽性率を示した。しかし、CD146 の発現は、15%FBS 単離群では  $15.6 \pm 0.1\%$ 、10%FBS 単離群では  $14.9 \pm 0.1\%$ 、5%FBS 単離群では  $9.0 \pm 0.0\%$  を呈し、単離群間で相違が認められ、5%FBS 単離群は他の FBS 濃度単離群と比較して有意 ( $p=0.000001$  vs. 15%FBS 単離群 ;  $p=0.000002$  vs. 10%FBS 単離群) に CD146 の発現が低下していた (図 4-3-3 b)。

多能性幹細胞のマーカーである SSEA-4 は各 FBS 濃度単離群とも陽性反応を示した。15%FBS 単離群では  $35.06 \pm 0.12\%$ 、10%FBS 単離群では  $42.23 \pm 0.23\%$ 、5%FBS 単離群では  $26.00 \pm 0.27\%$  であり、単離群間で相違が認められ、10%FBS 単離群は他の FBS 濃度単離群と比較して有意に SSEA-4 の発現が上昇 ( $p=0.000001$  vs. 15%FBS 単離群, 5%FBS 単離群) していた (図 4-3-3 b)。



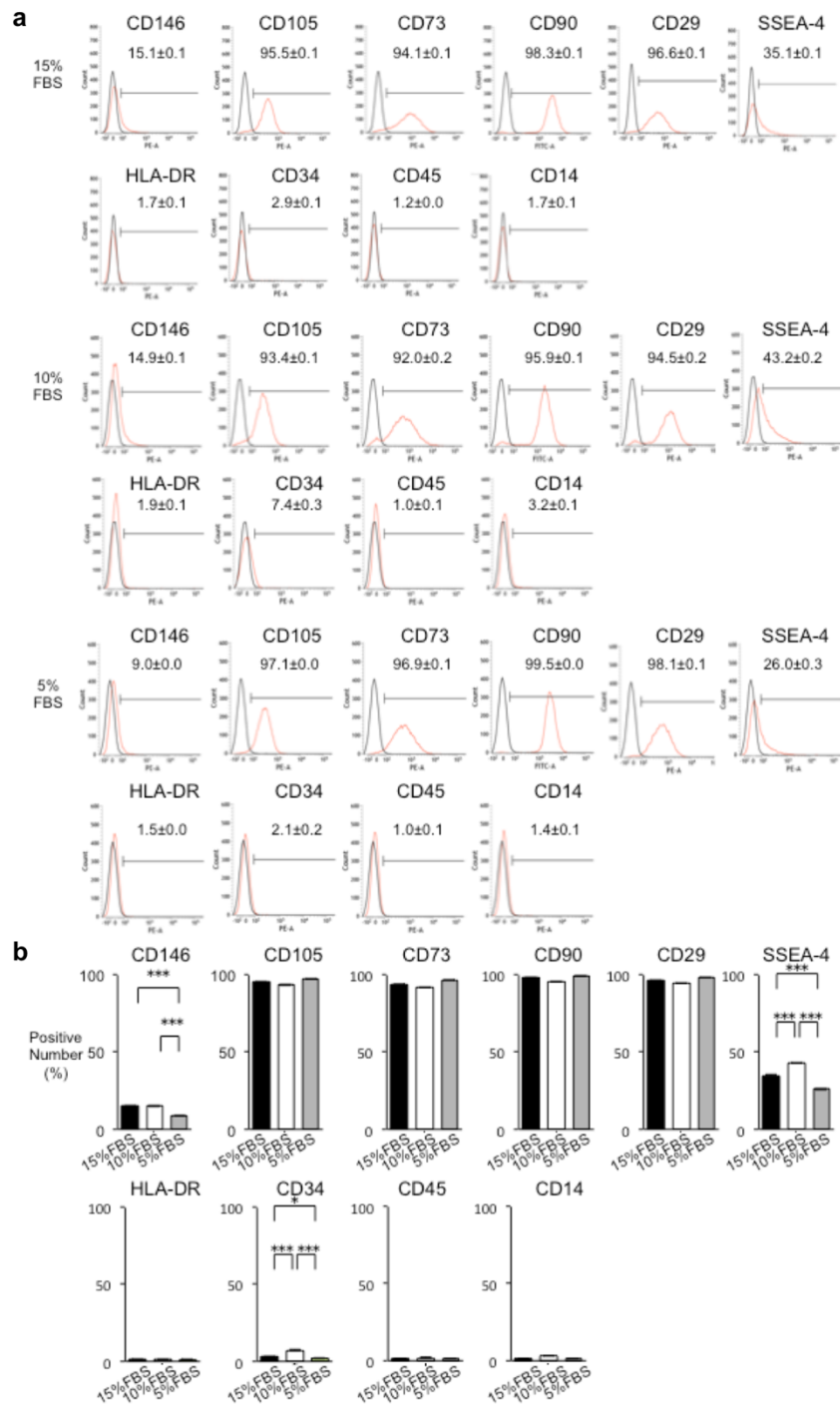


図 4-3-3. フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の解析

(a) ヒストグラム。赤線：表面抗原抗体染色群、黒線：非染色群。平均値±標準誤差(%)。  
 (b) 陽性率を表すグラフ。n=3。15%FBS：15%FBS 単離群、10%FBS：10%FBS 単離群、5%FBS：5%FBS 単離群。グラフは、平均値±標準誤差で表す。\*：p<0.05、\*\*\*：p<0.005。

#### § 4-4. 小括

実験 II から以下のことが分かった。

1. 5%、10%、15%のいずれの FBS 濃度でも CFU-F が形成された。
2. 10%FBS 単離群では、15%FBS 単離群と比較して有意に形成コロニー数が多かったが、5%FBS 単離群と比べるとコロニー数に差は認められなかった。
3. コロニー当たりの単離細胞数は、15%FBS 単離群と 10%FBS 単離群の間で有意な差は認められなかったが、5%FBS 単離群では有意に少なかった。
4. BrdU 取り込み試験にて、5、10、15%FBS 濃度の培地で増殖させた場合、いずれも 10%FBS 単離群が最も高い増殖能力を示した。
5. フローサイトメトリー解析にて、The International Society for Cellular Therapy が提唱する MSCs としての免疫学的表現型における必須条件を満たしていた。
6. フローサイトメトリー解析にて、10%FBS 単離群では他の FBS 濃度単離群と比較して、CD34 ならびに SSEA-4 陽性細胞率が有意に上昇していた。
7. フローサイトメトリー解析にて、5%FBS 単離群では他の FBS 濃度単離群と比較して、CD146 陽性細胞率が有意に減少していた。

## §5. 考察

## §5-1. 研究 I の考察

研究 I では、まず不可逆性歯髄炎の歯髄組織に CFU-F 形成能を呈する細胞集団が存在することを明らかにした。その CFU-F 形成細胞が、特徴的な表面抗原を発現する免疫表現型および象牙芽細胞と脂肪細胞などへの多分化能を細胞特性として呈していた。更に、これらの細胞は *in vivo* 象牙質／歯髄複合体の再生能や自己複製能、異質性、免疫抑制能を備えることも明らかにした。以上の研究 I の結果は、不可逆性歯髄炎組織より単離された CFU-F 形成細胞が、MSCs や健康 DPSCs と非常に類似した幹細胞集団であることを示している (図 5-1-1)。

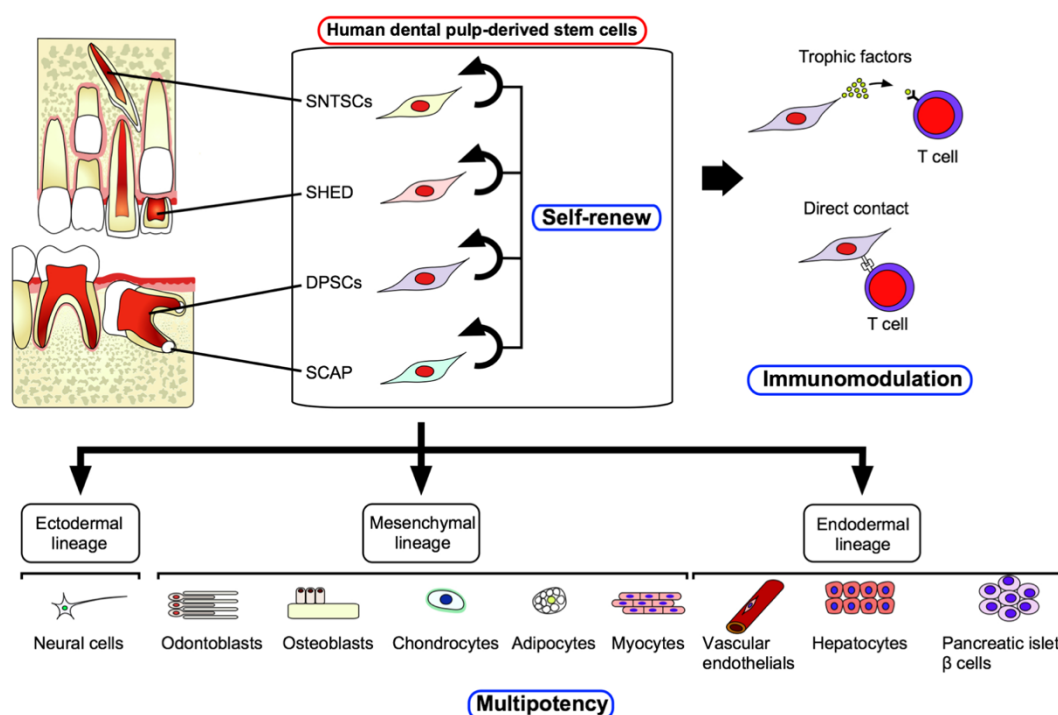


図 5-5-1. 歯髄組織に由来する幹細胞のソースと MSCs に類似した特性

[Sonoda, S. et al. Arch. Stem Cell. Res. (2015) より引用改変]

従って、研究 I ではこの細胞を IP-DPSCs と呼ぶこととした。しかしながら、健常 DPSCs と比較した場合、IP-DPSCs ではコロニー形成能、増殖能、多分化能、*in vivo* 象牙質形成能、免疫抑制能が低下していた。これは、不可逆性歯髄炎という病的環境が、組織幹細胞の特性にダメージを与えた可能性を示唆するものと考えられる。

最近の組織工学技術の発展により、DPSCs を用いた免疫不全マウスの皮下への異種移植システムにおいて、HA/TCP をキャリアとする象牙質歯髄複合体の再生評価系が確立している [4]。また、抜去歯をキャリアとして用い、ヒト象牙質上での象牙質／歯髄複合体の再生評価系も報告されている [6, 36]。イヌにおいて、抜歯直後の歯牙から得られた歯髄組織幹細胞を自家移植すると、抜歯歯牙に血管の供給を伴う歯髄組織が再生することが報告されている [37]。また、granulocyte colony-stimulating factor と組み合わせ、前臨床グレードのヒト DPSCs の製造工程が開発されており、自家移植による健常 DPSCs 治療を用いた臨床応用が進められている [38, 39]。しかしながら、患者自身の口腔内より、埋伏智歯などの健常なドナー歯を得る機会は非常に限られている。それゆえ、う蝕などの罹患歯から DPSCs が採取可能であり、加えて、その再生能および免疫調節能が十分な能力を備えているとすれば、患歯に由来する DPSCs が、自家移植により歯髄再生を行う上で、非常に有用なソースとなりうると考えられる。[9, 10]。

歯髄の炎症反応は、様々な刺激により引き起こされる [3]。不可逆性歯髄炎を呈する歯髄組織では、ヘルパーT 細胞から分泌される主要な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  が高発現している [40]。ところで、TNF- $\alpha$  ならびに IFN- $\gamma$  は、健常 DPSCs の免疫調節能と象牙質形成能に影響を与えることが報告されている [7, 11, 41-44]。最近の研究において、短時間の TNF- $\alpha$  刺激が健常

DPSCs の象牙質形成能を増強することが報告されており、可逆性歯髄炎に反応して修復象牙質形成が生じることが示唆された [42, 45, 46]。また、長期にわたる高濃度の TNF- $\alpha$ 刺激実験では、DPSCs の石灰化能を減弱させることが明らかにされている [11, 47]。一方、IFN- $\gamma$ 刺激については、*in vitro* ならびに *in vivo* でヒト MSCs の骨芽細胞への分化を促進すること [48]、BMMSCs および DPSCs において、IDO の産生を促進し、T 細胞の生存抑制への効果を増強すること [7, 49, 50] が報告されている。しかし、TNF- $\alpha$ ならびに IFN- $\gamma$ が IP-DPSCs の免疫調節能と象牙質形成能に与える影響については明らかにされていない。研究 I では、*ex vivo* での IFN- $\gamma$ 前処理が、IP-DPSCs の *in vitro* ならびに *in vivo* での象牙質再生能と IDO を介した T 細胞抑制能を改善させることに成功した。しかし、TNF- $\alpha$ 前処理ではそれらの能力を改善しなかった。これら研究 I の成果から、IP-DPSCs への *ex vivo* IFN- $\gamma$ 治療は、自家 DPSCs を応用した、歯髄再生による新規の歯内療法の開発を進める上での重要な技術基盤なりうると考えられる。

ヒト BMMSCs において、ヒト telomerase reverse transcriptase (TERT) 遺伝子を導入することにより、骨芽細胞の分化における最重要なマスター転写因子である *RUNX2* の発現を上昇させ、*in vitro* ならびに *in vivo* における骨形成能が促進されることが報告されている [22, 51]。また、TERT は、BMMSCs の FasL 発現を増強し、T 細胞のアポトーシスを誘導することが知られている [52]。最近の研究において、非ステロイド性抗炎症薬であるアセチルサリチル酸にて刺激を行うと、BMMSCs および SHED のテロメラーゼ活性が増加され、*in vitro* ならびに *in vivo* における骨形成能と T 細胞のアポトーシスの誘導を促進することが報告されている [53, 54, 55]。研究 I において、IFN- $\gamma$ 前処理によって IP-DPSCs におけるテロメラーゼ活性が促進されていた。一方で、TNF- $\alpha$ 前処理ではテロメラーゼが活性化されなかった。従って、IP-DPSCs のテロメラーゼ活性の制御が、

その低下した象牙質／歯髄複合体の再生ならびに免疫抑制に対する能力を向上させる可能性が示唆された。テロメラーゼ活性による歯髄組織幹細胞における象牙質／歯髄複合体の再生と免疫調節に対する制御メカニズムの解明が今後必要となると考えられる。

全身性エリテマトーデス患者より単離・培養した BMMSCs では、骨形成能が低下している [56]。この障害された BMMSCs では、TNF- $\alpha$ シグナリングの促進により NF- $\kappa$ B のリン酸化の亢進が報告されている [56]。従って、疾患による障害が、組織幹細胞の能力や細胞内シグナル伝達へ後天的に影響を与えることを示唆するものである。BMMSCs において、NF- $\kappa$ B の活性化を抑制した場合、骨芽細胞への分化が促進されることが知られている [57]。健常 DPSCs においても、TNF- $\alpha$ 刺激下で NF $\kappa$ B の活性化を抑制した場合、象牙芽細胞への分化能が増強されることが報告されている [41, 58]。研究 I における IFN- $\gamma$ 前処理が、NF- $\kappa$ B の活性化とは無関係に、IP-DPSCs の象牙質／歯髄複合体形成能および T 細胞免疫抑制能を改善していた。NF- $\kappa$ B の活性化を制御することによっても、象牙質／歯髄複合体再生と T 細胞免疫抑制を含む IP-DPSCs の低下した能力を改善する可能性も否定できないと考えられ、今後 NF- $\kappa$ B 制御による IP-DPSCs の機能改善に対する研究を行う必要性が考えられる。

以上の研究 I の成果より、IP-DPSCs の機能改善に関する研究は、DPSCs の自家移植による歯髄ティッシュエンジニアリングの実現のみならず、将来の歯内療法において疾患局所の幹細胞を標的とした新しい覆髄剤開発に貢献するものと考えられる (図 5-1-2)。

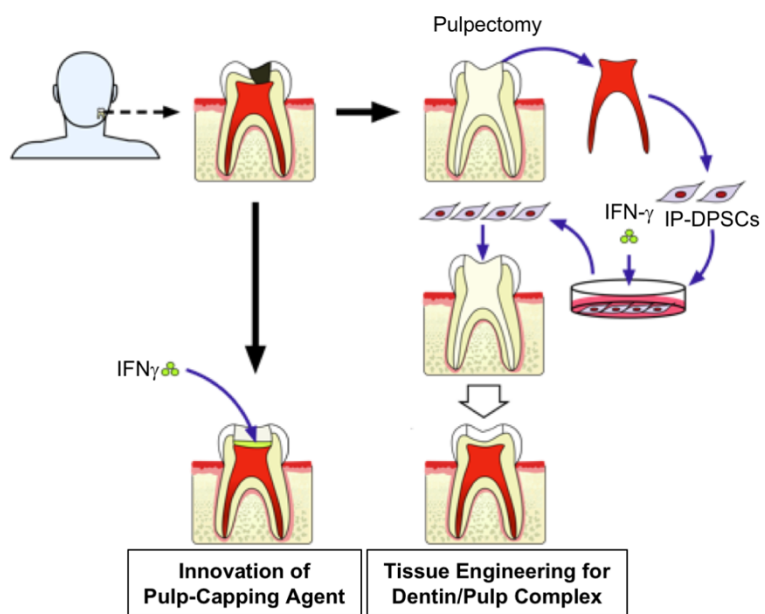


図 5-1-2. 自家 DPSCs を応用する IFN- $\gamma$  処理を伴った将来の歯内療法

[Sonoda, S. et al. Sci. Rep. (2016) より引用改変]



## §5-2. 研究 II の考察

幹細胞の定義は、自己複製能ならびに多能性、または組織幹細胞については多分化能を具備していることである。体細胞とは完全に区別しうる幹細胞の特性、stemness とは、幹細胞が分化することとは無関係に、自己複製能や、多能性または多分化能や細胞分裂能などの機能を維持する能力を指す。Stemness の低い幹細胞では、分裂能や多分化能の低下が報告されている [17]。それ故、幹細胞治療を考慮に入れた場合、stemness を最大限に保持した幹細胞を採取することは、幹細胞治療の効果を左右する非常に重要な条件と見なされる [59]。DPSCs や SHED などの歯髄組織幹細胞は、様々な全身疾患モデルにおいて、その治療効果が実証されており、再生医療における重要な細胞ソースとしてみなされている (図 5-1-3) [18, 20, 24, 25, 60]。

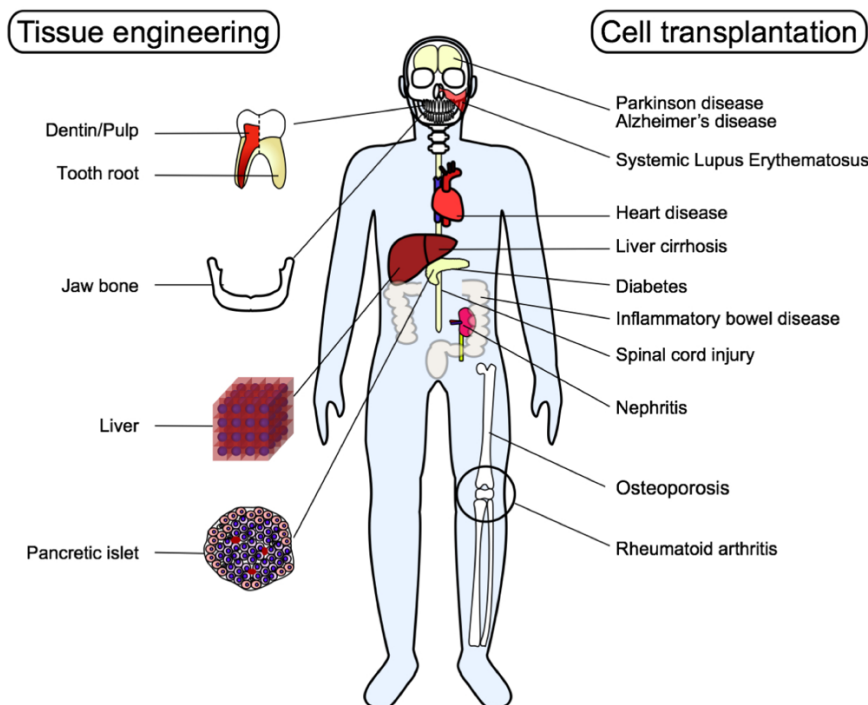


図 5-1-3. 歯髄組織幹細胞の再生医療応用

[Sonoda, S. et al. Arch. Stem Cell. Res. (2015) より引用]

従って、stemness を高く維持した歯髄組織幹細胞の単離方法を開発することは、歯髄組織幹細胞を用いた再生医療において、より一層の治療効果が期待される。

Trypsin による酵素処理を長時間（4℃で一晩）与えた間葉組織から、多能性を有する幹細胞の単離に成功している [61]。低酸素条件下では、stemness が亢進することが報告されている [62-64]。いずれの処理も細胞にストレスを付与した条件下で、stemness の亢進が認められているため、酵素処理や低酸素状態以外の方法でストレスを与えた場合でも stemness の亢進した幹細胞集団が単離できる可能性が推測される。

SHED を含む歯髄組織幹細胞の単離は、CFU-F コロニー形成法 [13] に従って行われている [19]。標準の単離プロトコールでは、15%FBS 添加培地を使用して単離を行っている。しかし、単離時の FBS 濃度を改めて検討し、加えて、SHED の特性を解析した研究はない。研究 II では、単離時培地の FBS 濃度を 15%、10%、5%の 3 種類を用いた。また細胞初期接着後（研究 II の場合、細胞播種後 48 時間後）、週に 1 度の培地交換とした。培地交換は通常、3 日毎または週 2 回などの頻度で行われている。胚性幹細胞や人工多能性幹細胞の場合、2 日毎または毎日培地交換が必要で有る。この点から、培地交換を 1 週間に 1 度のプロトコールでは培養細胞で十分な栄養素が供給されない低栄養環境と考えられる。研究 II では、単離時の低栄養環境が SHED の stemness、特にコロニー形成能、細胞表面抗原の発現状態と細胞増殖能に及ぼす影響について解析を行った。

10%FBS 含有培地を使用することにより、初期単離総数が増加させることが出来た。また、10%FBS 単離群の細胞は、他の FBS 濃度単離群の細胞と比較して、高い増殖活性を備えていた。以上の結果より、従来（15%FBS）より低い FBS

濃度（10%FBS）を用いることにより、細胞ソースである歯髄組織から、より多くの幹細胞を初期に単離することができ、かつ継代を繰り返すことにより、大量の細胞を得られる可能性を示唆している。

The International Society for Cellular Therapy によって MSCs として具備すべき免疫学的表現型に関する必須条件（CD105, CD73, CD90 が陽性かつ CD34, CD45, CD14, HLA-DR が陰性である）が提唱されている [16]。研究 II のフローサイトメトリーによる表面抗原の解析により、CFU-F 形成法により単離された SHED は、いずれの FBS 濃度条件下においても MSCs としての要件を満たしていた。ただし、CD34 の発現に関し、10%FBS 単離群では、他の FBS 濃度単離群と比較して有意に増加していた。ヒト BMMSCs では、CD34 に陽性を示す亜集団の存在が報告されている [65]。また浮遊型 BMMSCs では CD34 に陽性反応を示す [32]。ところで、マウス骨髄造血系幹細胞 hematopoietic stem cells (HSCs) において、short-term self-renewing HSCs (ST-HSCs) では CD34 陽性を示すが、long-term self-renewing HSCs (LT-HSCs) では CD34 陰性であることが報告されている [66]。また、LT-HSCs は ST-HSCs と比較して、その多くが細胞周期の G0 期を示すため、細胞増殖率が非常に低いと考えられる [67]。最近、CD34 陽性を示す DPSCs が同定された [68]。CD34 陽性 DPSCs は、CD34 陰性 DPSCs と比較すると、細胞増殖率が低く、stemness の維持が長いことが報告されている。研究 II では、SHED における CD34 陽性の細胞集団を世界で初めて同定した。従って、CD34 陽性を示す SHED 集団は、CD34 陰性を示す SHED 集団と比較して、自己複製能や細胞増殖能が異なる幹細胞集団である可能性が示唆される。今後、CD34 陽性の歯髄組織幹細胞に関する分化能ならびに stemness に関する、より詳細な検討が必要と考えられる。

CD146 (別名 MUC18, MCAM) は、ヒト melanoma 細胞で同定された 113 kDa

の細胞接着分子である [69]。ヒト BMMSCs や DPSCs、SHED においてもその発現が報告されている [20, 70]。研究 II では、いずれの FBS 濃度単離群においても、CD146 の発現が認められた。興味あることに、15%および 10%FBS 単離群が 5%FBS 単離群と比べて有意に増加していた。CD146 陽性ヒト BMMSCs や DPSCs、SHED は血管周囲に多く観察され、ニッチ形成との関連が示唆されている [23, 70]。また、CD146 の発現低下が細胞老化を促進することが報告されている [71] ことから、CD146 は MSCs の初期のマーカーと考えられている。従って、15%および 10%FBS 単離群の幹細胞は、より早期の MSC 集団を多く含んでいると考えられる。

SSEA-4 は奇形がん腫細胞より同定された細胞表面分子であり [72]、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞の多能性幹細胞の初期マーカーとして知られている [73, 74]。SSEA-4 は BMMSCs でもその発現が明らかになっている [75]。SHED においても細胞表面に発現していることが報告されている [20]。従って、SSEA-4 を発現する MSCs の亜集団は、非常に幼若な集団と考えられる。研究 II では、SSEA-4 の発現が、他の濃度の単離群と比べて 10%FBS 単離群において有意に増加していた。従って、10%FBS 含有培地で単離することにより、従来の方法 (15%FBS 使用) より、幼若で、stemness の亢進した SHED 群を多く単離することが可能となったと考えられる。

自家移植による細胞治療は免疫学的安全性が非常に高いが、一方で細胞ソースを得られる機会が非常に限られている。一方、他家移植においては、免疫学的安全性を担保するために、HLA 表現型が適合するドナーから移植を受ける必要がある。HLA には 5 万通り以上の表現型の組み合わせが存在することを考慮すると、個々人に適合する細胞ソースを得る機会には制限がある。すなわち、限られた検体から治療効果の優れた、stemness を高く維持した歯髄幹細胞を効率良く

大量に単離する技術開発を行い、得た研究Ⅱの成果は、将来の幹細胞による再生医療を実現する上で、治療効果の優れた歯髄組織幹細胞の確保に貢献し、歯髄組織幹細胞を用いた歯髄再生治療の実現に大いに寄与する基盤技術と考えられる。

## §6. 総括

本研究では、不可逆性歯髄炎由来歯髄組織から間葉系幹細胞を単離し、幹細胞学的特性と象牙質／歯髄複合体再生能、免疫抑制能の解析を行った。さらに、得られた細胞を再生医療ソースとして適格化すべく、サイトカインによる能力の賦活化を試みた。また、より細胞治療効果の高い歯髄幹細胞を効率良く得ることを目指し、単離に最適な FBS 条件の探求を行った。本研究により得られた成果は以下の通りである。

IP-DPSCs は、

1. *in vitro* にて CFU-F を形成した。
2. MSCs と同様の幹細胞性を備えていた。
3. *in vitro* にて、象牙芽細胞および脂肪細胞、内皮細胞、神経細胞への多分化能を示した。
4. *in vivo* にて、象牙質／歯髄複合体再生能を示した。
5. 自己複製能を有していた。
6. 異質性を有する幹細胞集団であった。
7. 免疫抑制能を有していた。
8. 健常 DPSCs と比較して、1-7 の能力が抑制されていた。
9. IFN- $\gamma$ 前処理によって、*in vitro* における象牙芽細胞が改善した。
10. IFN- $\gamma$ 前処理によって、*in vivo* における象牙質／歯髄複合体再生能が改善した。
11. IFN- $\gamma$ 処理によって、STRO-1 陽性率、細胞増殖能が向上した。
12. IFN- $\gamma$ 前処理によって、免疫抵抗性、免疫抑制能が向上した。
13. IFN- $\gamma$ 処理によって、NF- $\kappa$ B シグナル非依存的かつ、テロメラーゼ活性の向

上を介して機能改善することが示唆された。

14. TNF- $\alpha$ 前処理では、9-13 の効果は認められなかった。
15. 5%、10%、15%のいずれの FBS 濃度でも CFU-F が形成された。
16. 10%FBS 単離群では、15%FBS 単離群と比較して有意に形成コロニー数が多かったが、5%FBS 単離群と比べるとコロニー数に差は認められなかった。
17. コロニー当たりの単離細胞数は、15%FBS 単離群と 10%FBS 単離群の間で有意な差は認められなかったが、5%FBS 単離群では有意に少なかった。
18. BrdU 取り込み試験にて、5、10、15%FBS 濃度の培地で増殖させた場合、いずれも 10%FBS 単離群が最も高い増殖能力を示した。
19. The International Society for Cellular Therapy が提唱する MSCs としての免疫学的表現型における必須条件を満たしていた。
20. 10%FBS 単離群では他の FBS 濃度単離群と比較して、CD34 ならびに SSEA-4 陽性細胞率が有意に上昇していた。
21. 5%FBS 単離群では他の FBS 濃度単離群と比較して、CD146 陽性細胞率が有意に減少していた。

以上の研究成果より、患歯由来歯髄組織から歯髄組織幹細胞を単離する技術を確認した。加えて、幹細胞的機能を改善する *ex vivo* IFN- $\gamma$ 治療を開発した。また機能改善を行った自家患歯由来歯髄組織幹細胞を応用した歯髄再生モデルにおける治療効果を確認した。さらに、CFU-F 形成法による単離時の FBS 濃度を 10%とし、従来より stemness を高く維持した歯髄組織幹細胞を効率的に得る技術の開発を行った。今後は、開発した技術を自家移植のみならず他家の歯髄組織幹細胞を応用した歯髄再生治療の R&D 研究ならびに臨床研究へ展開していく予定である。

## §7. 謝辞

稿を終えるにあたり、終始、御懇篤なる御指導と御高閲を賜りました、九州大学 大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野 教授 西村英紀 先生ならびに、同研究院 口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野 教授 久木田敏夫 先生に、深甚なる謝意を表します。加えて、本研究を遂行するにあたり示唆に富む御助言や技術面で御指導と御援助頂きました、九州大学 大学院歯学研究院 口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野 准教授 山座孝義 先生ならびに共同研究者の Dr. Songtao Shi, Chair and Professor of Department of Anatomy & Cell Biology, University of Pennsylvania School of Dental Medicine に厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり、多くの御援助や御協力を頂きました、九州大学 大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野ならびに、口腔常態制御学講座 分子細胞解剖学分野、口腔保健推進学講座 小児歯科学分野、Department of Anatomy & Cell Biology, University of Pennsylvania School of Dental Medicine の皆様方に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。



## §8. 引用文献

1. Murray, P. E., About, I., Lumley, P. J., Smith, G., Franquin, J. C., Smith, A. J. Postoperative pulpal and repair responses. *J. Am. Dent. Assoc.* **131**, 321-329 (2000).
2. About, I., Murray, P. E., Franquin, J. C., Remusat, M., Smith, A. J. Pulpal inflammatory responses following non-carious class V restorations. *Oper. Dent.* **26**, 336-342 (2001).
3. Torabinejad, M., Fouad, A., Walton, R. E. *Endodontics: Principles and Practice*. 5th Edition [Torabinejad, M, Fouad, A, Walton, R. E. (ed)] (Saunders, Amsterdam, Netherlands, 2014)
4. Gronthos, S., Mancani, M., Brahim, J., Robey, P. G., Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13625-13630 (2000).
5. Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., Shi, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* **81**, 531-535 (2002).
6. Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T. W., Fisher, L. W., Gronthos, S., Robey, P. G., Shi, S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J. Dent. Res.* **82**, 976-981 (2003).
7. Wada, N., Menicanin, D., Shi, S., Bartold, P. M., Gronthos, S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J. Cell Physiol.* **219**, 667-676 (2009).
8. Sonoda, S., Tomoda, E., Tanaka, Y., Yamaza, T. Properties and possibilities of human dental pulp-derived stem cells. *Arch. Stem Cell. Res.* **2**, 1012 (2015).

9. Alongi, D. J., Yamaza, T., Song, Y., Fouad, A. F., Romberg, E. E., Shi, S., Tuan, R. S., Huang, G. T. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen. Med.* **5**, 617-631 (2010).
10. Pereira, L. O., Rubini, M. R., Silva, J. R., Oliveira, D. M., Silva, I. C., Poças-Fonseca, M. J., Azevedo, R. B. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int. Endod. J.* **45**, 1080-1090 (2012).
11. Boyle, M., Chun, C., Strojny, C., Narayanan, R., Bartholomew, A., Sundivakkam, P., Alapati, S. Chronic inflammation and angiogenic signaling axis impairs differentiation of dental-pulp stem cells. *PLOS One* **9**, e113419 (2014).
12. Yazid, F. B., Gnanasegaran, N., Kunasekaran, W., Govindasamy, V., Musa, S. Comparison of immunodulatory properties of dental pulp stem cells derived from healthy and inflamed teeth. *Clin. Oral Invest.* **18**, 2103-2112 (2014).
13. Friedenstein, A. J. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol. Blood Transfus.* **25**, 19-29 (1980).
14. Owen, M., Friedenstein, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* **136**, 42-60 (1988)
15. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **5**, 641-650 (1991)
16. Dominici, M., Le, Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006)
17. Bose, B., Shenoy, P. S. Aging induced loss of stemness with concomitant gain of myogenic properties of a pure population of CD34(+)/CD45(-) muscle derived stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **70**:1-12 (2016)

18. Ma, L., Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Hoshino, Y., Song, G., Kukita, T., Nonaka, K., Shi, S., Yamaza, T. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLOS One* **7**, e51777 (2012).
19. Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Ma, L., Hoshino, Y., Nonaka, K., Terada, Y., Kukita, T., Shi, S., Yamaza, T. Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. *J. Dent. Res.* **92**, 609-615 (2013).
20. Yamaza, T., Akiyama, K., Chen, C., Liu, Y., Shi, Y., Gronthos, S., Wang, S., Shi, S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res. Ther.* **1**, 5 (2010).
21. Yamaza, T., Miura, Y., Akiyama, K., Bi, Y., Sonoyama, W., Gronthos, S., Chen, W., Le, A., Shi, S. Mesenchymal stem cell-mediated ectopic hematopoiesis alleviates aging-related phenotype in immunocompromised mice. *Blood* **113**, 2595-2604 (2009).
22. Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C. M., Robey, P. G., Wang, C. Y. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat. Biotechnol.* **20**, 587-591 (2002).
23. Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A., Simmons, P. J. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* **116**, 1827-1835 (2003).
24. Ma, L., Aijima, R., Hoshino, Y., Yamaza, H., Tomoda, E., Tanaka, Y., Sonoda, S., Song, G., Zhao, W., Nonaka, K., Shi, S., Yamaza, T. Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates secondary osteoporosis through interleukin-17-impaired functions of recipient bone marrow mesenchymal stem cells in MRL/lpr mice. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 104 (2015).

25. Yamaza, T., Alatas, F. S., Yuniartha, R., Yamaza, H., Fujiyoshi, J. K., Yanagi, Y., Yoshimaru, K., Hayashida, M., Matsuura, T., Aijima, R., Ihara, K., Ohga, S., Shi, S., Nonaka, K., Taguchi, T. In vivo hepatogenic capacity and therapeutic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in liver fibrosis in mice. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 171 (2015)
26. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., Shi, Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2**, 141-150 (2008).
27. Shi, S., Gronthos, S. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells Identified in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 696-704 (2003).
28. Morrison, S. J., Prowse, K. R., Ho, P., Weissman, I. L. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* **5**, 207-216 (1996).
29. Gronthos, S., Zannettino, A. C., Graves, S. E., Ohta, S., Hay, S. J., Simmons, P. J. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 47-56 (1999).
30. Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., Shi, S. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* **10**, 544-555 (2012).
31. Di Nicola, M., Carlo-Stella C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A. M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*

- 99, 3838-3843 (2002).
32. Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., Dilloo, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine, 3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**, 4619-4621 (2004).
33. Jones, B. J., Brooke, G., Atkinson, K., McTaggart, S. J. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: A role for mesenchymal stem cells. *Placenta* **28**, 1174-1181 (2007).
34. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., Keiliss-Borok, IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**, 331-340 (1974).
35. Akiyama, K., You, Y. O., Yamaza, T., Chen, C., Tang, L., Jin, Y., Chen, X. D., Gronthos, S., Shi, S. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. *Stem Cell Res. Ther.* **3**, 40 (2012)
36. Huang, GT-J., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S., Shi, S. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model. *Tissue Eng. Part A* **16**, 605-615 (2010).
37. Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Ishizaka, R., Nakamura, H., Into, T., Matsushita, K., Nakashima, M. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. *Regen. Med.* **24**, 377-385 (2009).
38. Murakami, M., Horibe, H., Iohara, K., Hayashi, Y., Osako, Y., Takei, Y., Nakata, K., Motoyama, N., Kurita, K., Nakashima, M. The use of granulocyte-colony stimulating

- factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials* **34**, 9036-9047 (2013).
39. Nakashima, M., Iohara, K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. *J. Endod.* **40**, S26-32 (2014).
40. Elsalhy, M., Azizieh, F., Raghupathy, R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int. Endod. J.* **46**, 573-580 (2013).
41. Chang, J., Zhang, C., Tani-Ishii, N., Shi, S., Wang, C. Y. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J. Dent. Res.* **84**, 994-998 (2005).
42. Paula-Silva, F. W., Ghosh, A., Silva, L. A., Kapila, Y. L. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J. Dent. Res.* **88**, 339-344 (2009).
43. Demircan, P. C., Sariboyaci, A. E., Unal, Z. S., Gacar, G., Subasi, C., Karaoz, E. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy* **13**, 1205-1220 (2011).
44. Takegawa, D., Nakanishi, T., Hirao, K., Yumoto, H., Takahashi, K., Matsuo, T. Modulatory roles of interferon- $\gamma$  through indoleamine 2, 3-dioxygenase induction in innate immune response of dental pulp cells. *J. Endod.* **40**, 1382-1387 (2014).
45. Feng, X., Feng, G., Xing, J., Shen, B., Li, L., Tan, W., Xu, Y., Liu, S., Liu, H., Jiang, J., Wu, H., Tao, T., Gu, Z. TNF- $\alpha$  triggers osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Biol. Int.* **37**, 1267-1275 (2013).
46. Ueda, M., Fujisawa, T., Ono, M., Hara, E. S., Pham, H. T., Nakajima, R., Sonoyama, W., Kuboki, T. A short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 31 (2014).
47. Qin, Z., Fang, Z., Zhao, L., Chen, J., Li, Y., Liu, G. High dose of TNF- $\alpha$  suppressed

- osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J. Mol. Histol.* **46**, 409-420 (2015).
48. Duque, G., Huang, D. C., Macoritto, M., Rivas, D., Yang, X. F., Ste-Marie, L. G., Kremer, R. Autocrine regulation of interferon gamma in mesenchymal stem cells plays a role in early osteoblastogenesis. *Stem Cells* **27**, 550-558 (2009).
49. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlaschi, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**, 386-398 (2006).
50. English, K., Barry, F. P., Field-Corbett, C. P., Mahon, B. P. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett.* **110**, 91-100 (2007).
51. Gronthos, S., Chen, S., Wang, C. Y., Robey, R. B., Shi, S. Telomerase Accelerates Osteogenesis of Bone Marrow Stromal Stem Cells by Upregulation of CBFA1, Osterix, and Osteocalcin. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 716-722 (2003).
52. Chen, C., Akiyama, K., Yamaza, T., You, Y. O., Xu, X., Li, B., Zhao, Y., Shi, S. Telomerase governs immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells by regulating FAS ligand expression. *EMBO Mol. Med.* **6**, 322-334 (2014).
53. Yamaza, T., Miura, Y., Bi, Y., Liu, Y., Akiyama, K., Sonoyama, W., Patel, V., Gutkind, S., Young, M., Gronthos, S., Le, A., Wang, C. Y., Chen, W., Shi, S. Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents. *PLOS One* **3**, e2615 (2008).
54. Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Yang, R., Chen, W., Wang, S., Shi, S. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by

- recipient T lymphocytes via IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *Nat. Med.* **17**, 1594-1601 (2011).
55. Liu, Y., Chen, C., Liu, S., Liu, D., Xu, X., Chen, X., Shi, S. Acetylsalicylic Acid Treatment Improves Differentiation and Immunomodulation of SHED. *J. Dent. Res.* **94**, 209-218 (2015).
56. Tang, Y., Xie, H., Chen, J., Geng, L., Chen, H., Li, X., Hou, Y., Lu, L., Shi, S., Zeng, X., Sun, L. Activated NF- $\kappa$ B in bone marrow mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients inhibits osteogenic differentiation through downregulating smad signaling. *Stem Cells Dev.* **22**, 668-678 (2013).
57. Chang, J., Liu, F., Lee, M., Wu, B., Ting, K., Zara, J. N., Soo, C., Al, Hezaimi, K., Zou, W., Chen, X., Mooney, D. J., Wang, C. Y. NF- $\kappa$ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting b-catenin degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9469-9474 (2013).
58. Hozhabri, N. S. T., Benson, M. D., Vu, M. D., Patel, R. H., Martinez, R. M., Nakhaie, F. N., Kim, H. K., Varanasi, V. G. Decreasing NF- $\kappa$ B expression enhances odontoblastic differentiation and collagen expression in dental pulp stem cells exposed to inflammatory cytokines. *PLOS One* **10**, e0113334 (2015).
59. Tobita, M., Tajima, S., Mizuno, H. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: stem cell transplantation methods that enhance stemness. *Stem Cell Res Ther.* **5**, 6:215 (2015)
60. Seo, B. M., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuri, T., Akiyama, K., Lee, J. S., Shi, S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.* **14**, 428-434 (2008).
61. Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Shigemoto, T., Matsuse, D., Akashi, H., Tanimura, Y., Tsuchiyama, K., Kikuchi, T., Goda, M., Nakahata, T., Fujiyoshi, Y., Dezawa, M.



- Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9875-9880 (2011).
62. D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Roos, B. A., Schiller, P. C. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone* **39**, 513-22 (2006).
63. Hung, S. P., Ho, J. H., Shih, Y. R., Lo, T., Lee, O. K. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **30**, 260-266 (2012).
64. Berniakovich, I., Giorgio, M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 2119-2134 (2013).
65. Simmons, P. J., Torok-Storb, B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* **78**, 2848–2853(1991).
66. Spangrude, G. J., Heimfeld, S., Weissman, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58-62 (1988).
67. Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X., Weissman, I. L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 3120-3125 (1999).
68. Pisciotta, A., Carnevale, G., Meloni, S., Riccio, M., De, Biasi, S., Gibellini, L., Ferrari, A., Bruzzesi, G., De, Pol, A. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Dev. Biol.* **15**, 14(2015).
69. Lehmann, J. M., Holzmann, B., Breitbart, E. W., Schmiegelow, P., Riethmüller, G.,

- Johnson, J. P. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res.* **47**, 841-845 (1987)
70. Yamaza, T., Ren, G., Akiyama, K., Chen, C., Shi, Y., Shi, S. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *J. Dent. Res.* **90**, 317-324 (2011).
71. Jin, H. J., Kwon, J. H., Kim, M., Bae, Y. K., Choi, S. J., Oh, W., Yang, Y. S., Jeon, H. B. Downregulation of Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM/CD146) Accelerates Cellular Senescence in Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 427-39 (2016).
72. Kannagi, R., Cochran, N. A., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, P. W., Knowles, B. B., Solter, D. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* **2**, 2355–2361 (1983).
73. Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H., Andrews, P. W. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* **20**, 329–337 (2002).
74. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
75. Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W., Perlingeiro, R. C. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* **109**, 1743-1751 (2007).