

# Translational Study with Stem Cells from Supernumerary Teeth on Regenerative Medicine

牧野, 友祐  
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21979>

---

出版情報 : 九州大学, 2011, 博士 (歯学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

過剰歯幹細胞の再生医療学的応用に関する研究

Translational Study with Stem Cells from  
Supernumerary Teeth on Regenerative Medicine

2012 年

牧野友祐

九州大学大学院歯学府

口腔機能修復学講座 クラウンブリッジ補綴学分野

九州大学大学院歯学府

口腔機能修復学講座 クラウンブリッジ補綴学分野

指導教員 寺田善博 教授

九州大学大学院歯学府

口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野

研究指導者 久木田敏夫 教授

本研究の一部を下記の論文に投稿中である

Yusuke Makino, Haruyoshi Yamaza, Kentaro Akiyama, Mizuho A. Kido, Lan Ma,  
Kazuaki Nonaka, Yoshihiro Terada, Toshio Kukita, Songtao Shi, Takayoshi  
Yamaza

“Cell-based Immunotherapy with Stem Cells from Human Supernumerary Teeth  
Targets Niche-Organizing Function of Recipient Bone Marrow Mesenchymal  
Stem Cells”

*Blood, in submitting.*

本文の内容の一部は、下記学会にて報告した

第 52 回歯科基礎医学会学術大会、東京、2010、9 月

「ヒト上顎正中過剰埋伏歯の歯髓由来間葉系幹細胞の単離とその免疫調整能の解析」

第 53 回歯科基礎医学会学術大会、岐阜、2011、10 月

「ヒト過剰歯由来幹細胞の免疫細胞療法効果について」

89th General Session & Exhibition of the International Association for Dental  
Research, San Diego, CA, 2011, March

“Immunomodulatory Properties of Stem Cells from Human Supernumerary Teeth”

## 目 次

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| § 1. 要旨                            | 1  |
| § 2. 緒言                            | 4  |
| § 3. 研究 I：ヒト正中過剰歯髄からの幹細胞の単離とその特性解析 | 6  |
| 3-1. 目的                            | 7  |
| 3-2. 材料と方法                         | 7  |
| 3-3. 結果                            | 19 |
| 3-4. 小括                            | 35 |
| § 4. 研究 II：過剰歯幹細胞移植による免疫療法の解析      | 39 |
| 4-1. 目的                            | 40 |
| 4-2. 材料と方法                         | 40 |
| 4-3. 結果                            | 51 |
| 4-4. 小括                            | 73 |
| § 5. 考察                            | 76 |
| § 6. 総括                            | 82 |
| § 7. 謝辞                            | 85 |
| § 8. 引用文献                          | 86 |

## § 1. 要旨

近年、自己複製能と多分化能を有する骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells; BMMSC) が T 細胞の増殖を抑制することが見いだされた。以来、BMMSC を用いた組織工学的組織置換療法のみならず免疫学的細胞治療に関する基礎的・臨床的研究が集学的に行われてきた。現在、BMMSC を応用した再生医療は実現へ大いに期待が寄せられている。一方、細胞源としての BMMSC はドナーの年齢や細胞活性、採取時の障害など必ずしも優れた細胞源とは考えられてはいない。本研究では、臨床的に破棄されるヒト正中過剰歯を細胞源として注目し、ヒト正中過剰歯の歯髄組織より単離したヒト過剰歯幹細胞 (stem cells from supernumerary teeth; SupSC) の生物学的および免疫学的特性を *in vitro/in vivo* 実験系で解析し、再生医療への有用性を検討した。

*in vitro* 実験系にて SupSC は付着性コロニーを形成した。さらに象牙芽細胞/骨芽細胞や脂肪細胞、神経細胞や内皮細胞などの中胚葉、外胚葉、内胚葉系の細胞に分化する多分化能を備えていた。異種皮下移植実験法で SupSC は象牙質/歯髄複合体のみならず骨/骨髄コンポーネントを再生した。また連続的移植実験法においても象牙質/歯髄複合体を形成したことから、SupSC が自己複製能を有していることが明らかとなった。末梢血単核細胞との共培養実験より、SupSC は T 細胞の増殖抑制効果を示した。さらに調節性 T 細胞の分化誘導を促進し、IL-17 分泌型ヘルパー T 細胞 (Th17) の分化誘導を抑制した。従って、SupSC は MSC に類似した幹細胞ポピュレーションであると同定された。

次に、SupSC を応用した細胞療法的治療効果について検討した。病態 MRL/lpr マウスを使用し、MRL/lpr マウスに SupSC を経静脈的に全身投与した。MRL/lpr マ

ウスは、ヒト全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) に類似した症状 (寿命の短縮や血中自己抗体濃度の上昇、糸球体腎炎による腎機能障害、Th17 細胞の増加による免疫破綻) を呈していた。SupSC 投与によりこれらの SLE 様症状は改善し、マウスの寿命の延長も認められた。また、MRL/lpr マウスでは骨粗鬆様骨障害も伴っていたが、SupSC 移植 MRL/lpr マウスでは、骨組織において骨芽細胞による骨形成を活性化し、また破骨細胞による骨吸収に抑制的に働くことで、減少していた骨塩量および骨梁が著しく改善されていた。

正常マウス骨髄由来の BMMSC と比較して、MRL/lpr マウスの骨髄より単離した BMMSC では、間葉系幹細胞学的特性 (細胞増殖能、*in vitro* 骨形成能、免疫調節能など) が障害されていることが知られている。MRL/lpr マウスの BMMSC と比較して、SupSC 移植レシピエント MRL/lpr マウスの BMMSC の間葉系幹細胞学的特性を検討したところ、高い細胞増殖能や *in vitro* での骨形成が亢進していた。また免疫不全マウスでの皮下移植実験では、SupSC 移植レシピエント BMMSC の移植体内部では骨形成ならびにニッチ形成が増加していた。また、MRL/lpr マウス BMMSC と比べて、SupSC 移植レシピエント BMMSC では *in vitro* 造血誘導作用および *in vitro* 免疫調節能も促進されており、レシピエント BMMSC における組織構築機能の増強が認められた。次に、この移植レシピエント由来 BMMSC を MRL/lpr マウスに全身投与したところ、非移植群レシピエント BMMSC と比較して生存期間の延長ならびに血中自己抗体濃度の減少や腎機能に改善が認められた。また、MRL/lpr マウスより単離した T 細胞を養子細胞移植した免疫不全マウスでは、非移植レシピエント BMMSC を投与した養子移植マウスと比べて、SupSC 移植 MRL/lpr レシピエント BMMSC を投与した養子移植マウスの生存期間が延長していた。したがって、SupSC

移植の治療効果は、少なくとも、レシピエント側の **BMMSC** のニッチ再構築機能を活性化することで免疫状態を調節している可能性が示唆された。

これらの研究成果より、**SupSC** は間葉系幹細胞に類似した幹細胞ポピュレーションであり、**SLE** のような免疫疾患に対する細胞治療に有用な細胞源であることが示唆された。

## § 2. 緒言

骨髄間葉系幹細胞に代表される間葉系幹細胞は優れた自己複製能と増殖能を持ち、中胚葉、外胚葉、内胚葉系の細胞に分化できる多分化能を備えた体性幹細胞である (Owen et al., 1988; Prockop et al., 1997; Pittenger et al., 1999; Bianco et al., 2001)。現在では、間葉系幹細胞は骨髄のみならず脂肪組織や永久歯歯髄などの成体組織からも単離されている。これまでに間葉系幹細胞の有する骨芽細胞や軟骨細胞への分化能力に注目され、疾患やその治療、事故などで失われた骨や軟骨の欠損修復を目的とした間葉系幹細胞を用いた組織工学的応用が盛んに研究されてきた (Djouad et al., 2009)。近年、骨髄間葉系幹細胞が T 細胞や B 細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞などの免疫系細胞の増殖分化に対し調節機能を有することが明らかになってきた (Corcione et al., 2006; Spaggiari et al., 2006; Ramasamy, 2007)。それゆえ、様々な免疫疾患の治療に対し骨髄間葉系幹細胞を基盤とした細胞治療が注目され、急性移植片対宿主病 (Aggarwal et al., 2005; Le Blanc et al., 2004) や SLE (Sun et al., 2009)、糖尿病 (Lee et al., 2006)、リウマチ性関節炎 (Augello et al., 2007)、炎症性大腸炎 (クローン病、潰瘍性大腸炎) (Gonzales et al., 2009) や敗血症 (Nemeth et al., 2009) などの多くの疾患治療に成功を収めている。現在、骨髄間葉系幹細胞以外の間葉系幹細胞においても免疫調節能が解明され、それらを用いた疾患治療も応用されている (Banas et al., 2008; Cho et al., 2009; Wada et al., 2009)。したがって、間葉系幹細胞の細胞源の研究、開発は間葉系幹細胞を応用した再生医療の分野における研究に極めて重要であり、種々の疾患治療に有用と考えられる。

過剰歯は歯胚の過剰発生や分裂などが原因で生じる正常歯数を超えた歯牙である。過剰歯は顎骨内での埋伏や異常部位での萌出により歯列や口腔内環境に影響を与え



る為、ほとんどの過剰歯は抜歯され、医療的に廃棄される。ヒトでは永久歯の萌出に伴い乳歯は脱落し、その生物学的運命を終える。近年、ヒト脱落乳歯の残存歯髄から間葉系幹細胞が単離、同定され、自己複製能や高度な増殖能、象牙芽細胞、脂肪細胞、神経細胞への多分化能、組織再生能が明らかとなった (Miura et al., 2002)。したがって、過剰歯歯髄における間葉系幹細胞の存在が考えられ、再生医療における細胞源となりうることが推測される。

Huang et al. (2008) は、ヒト正中過剰歯歯髄から新規の幹細胞集団を単離し、それらの細胞でコロニー形成能や骨芽細胞や脂肪細胞への分化能を報告した。しかし、この研究では幹細胞学的に単離細胞の不十分な証明しか行っておらず、間葉系幹細胞としての詳細な生物学的特性に加え、組織再生能力や免疫調節能も未解析のままである。また、これら細胞を用いた疾患治療に対する効果も明らかになっていない。

本研究では、まず過剰歯歯髄から幹細胞を単離し、その幹細胞学的、特に間葉系幹細胞としての生物学的特性を詳細に解析すること、そしてこれら細胞の免疫学的特性を検討することを第一の目的とした。次に、過剰歯由来幹細胞が免疫疾患の治療へ応用を検討するために、過剰歯由来幹細胞をヒト SLE モデルマウス MRL/lpr マウスに全身細胞移植を施し、レシピエントマウスでの治療効果を評価するとともに、レシピエントマウスの骨髄間葉系幹細胞の治癒機転における機能的役割について解析を行った。

### §3. 研究 I

「ヒト正中過剰歯歯髄からの幹細胞の単離とその特性解析」

### §3-1. 目的

骨髄間葉系幹細胞は組織幹細胞に属する細胞であり、優れた特性を有するために、再生医療における細胞源として注目されている。研究 I の目的は、永久歯の萌出や歯列への影響の排除を目的として抜歯を余儀なくされた正中過剰歯から歯髄組織幹細胞を単離することである。この目的を達成するために、歯髄より細胞を単離し、自己複製能や多分化能を含む幹細胞学的な特性を解析した。またこれら単離細胞における間葉系幹細胞として特異的な細胞マーカーの発現や組織再生能、免疫調節能などを *in vitro* および *in vivo* の実験系にて検索した。さらに、典型的な間葉系幹細胞として知られるヒト骨髄間葉系幹細胞とその特性の比較解析も行った。以上よりヒト過剰歯の歯髄の幹細胞、過剰歯幹細胞を間葉系幹細胞として同定を行い、再生医療における細胞源としての過剰歯幹細胞の可能性を検討した。

### §3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. ヒト正中過剰歯試料

ヒト上顎正中過剰歯（図 3-1）は九州大学倫理委員会のガイドラインに従い、九州大学病院小児歯科において 5～7 歳の患者計 5 名の同意のもと生体サンプルとして採取された。健康なドナー由来のヒト骨髄有核細胞と末梢血単核球細胞（peripheral blood mononuclear cells; PBMNC）は AllCells (Barkley, CA) から購入した。

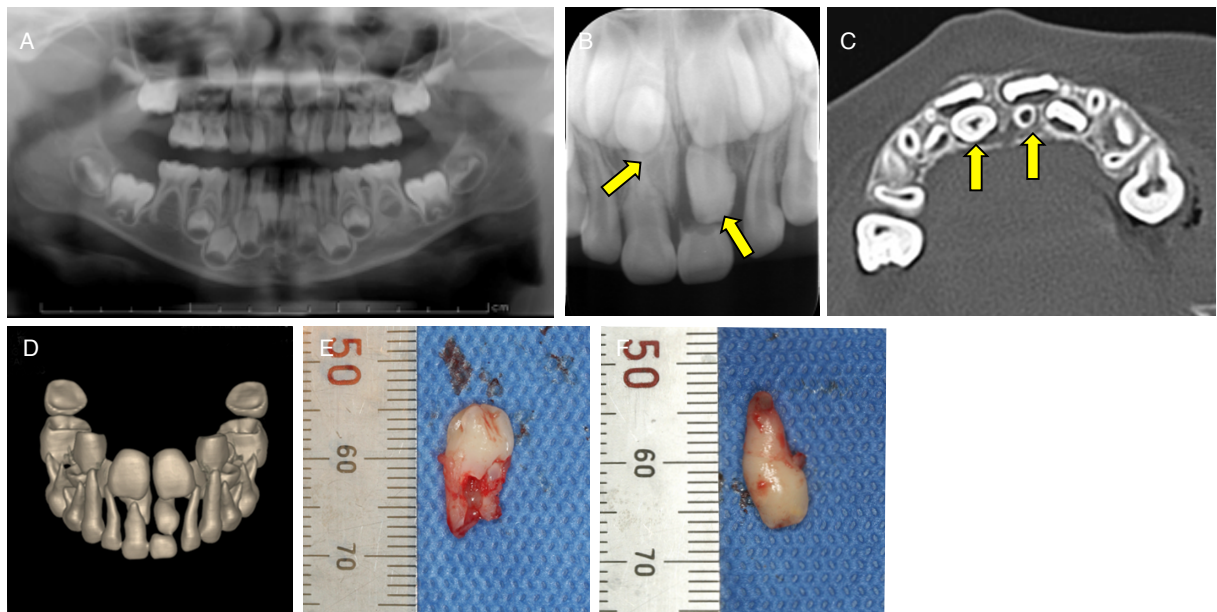


図 3-1. ヒト上顎正中過剰歯。(A): 歯列交換期患児のパノラマ X 線写真。(B): 上顎中切歯間顎骨内に埋伏した過剰歯 (矢印)。(C): 水平断における CT 画像。(D): CT データの 3 次元構築画像。(E, F): 抜去された正中過剰歯。

### 3-2-2. 抗体

抗 STRO-1 血清は過去の報告 (Shi et al., 2002) の抗血清を使用した。本研究で用いたその他の抗体は章末の表 3-1 に記す。

### 3-2-3. マウス

C57BL/6J、C3H/HeJ、Balb/c *nu/nu*、NOD SCID (雌性, 7~10 週齢) マウスは CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) から購入した。C57BL/6 *lpr/lpr* と C3H/HeJ *lpr/lpr* は Japan SLC, Inc. (Sizuoka, Japan) から購入した。全ての動物実験は九州大学動物実験委員会の承認のもとに実施された。

#### 3-2-4. ヒト過剰歯の組織学的解析

過剰歯は4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde; PFA) 含有リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS, pH7.4) にて4℃で一晩浸漬固定した。10%エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA, pH 7.4) で脱灰を行った。凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin; H&E) 溶液で染色した。一部の切片は抗 STRO-1 抗体、抗ヒト CD146 抗体と反応させ、Super picture (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いた免疫組織化学染色を行った。サブクラス適合抗体をコントロールとして用いた。

#### 3-2-5. ヒト SupSC (Stem cells from supernumerary teeth) と BMMSC (Bone marrow mesenchymal stem cells) の単離と培養

過剰歯歯髄からの幹細胞単離は過去の報告 (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003; Yamaza et al., 2010) を参考にして colony-forming unit-fibroblasts (CFU-F) 法にて行った。つまり、正中過剰歯から取り出した歯髄は、0.3%コラゲナーゼタイプ I (Worthington Biochemicals Corp, Lakewood, NJ) と 0.4%ディスパーゼ II (Sanko Jyunyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) との混合溶液で 37℃、60 分間処理した。この酵素処理液を 70 μm セルストレイナー (BD Bioscience, San Jones, CA) で処理し、有核細胞を得た。有核細胞は  $1 \times 10^6$  の濃度で T-75 培養フラスコに播種した。3 時間後、非接着性の細胞を PBS で洗浄除去し、フラスコ上に接着した細胞を増殖用培地で培養した。増殖用培地は alpha Modification of Eagle's Medium ( $\alpha$  MEM) (Invitrogen)に 15%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) (Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX), 100 μM L-ascorbic acid 2-phosphate (WAKO Pure Chemical

Industries, Ltd., Osaka, Japan), 2 mM L-glutamine (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Nakarai Tesque) を添加した溶液を使用し、37°C、5 %CO<sub>2</sub> 条件下にて培養を行った。コロニーを形成した線維芽細胞様紡錘形態の細胞を MSC とみなした。得られたコロニー形成細胞を継代培養し、本研究に用いた。ヒト BMMSC (hBMMSC) は過去の報告 (Fridenstein et al., 1980; Yamaza et al., 2009; 2010) に基づきヒト骨髄有核細胞から単離培養を行った。

### 3-2-6. ヒト colony forming unit-fibroblasts (CFU-F) 解析

CFU-F 分析は過去の報告 (Yamaza et al., 2009; 2010) に準じて実施した。ヒト過剰歯または骨髄より採取された細胞は 100 mm 培養ディッシュに  $10 \times 10^3$  の濃度で播種した。接着性細胞を 16 日間増殖培地で培養した。培養後 4%PFA 含有 PBS 溶液を用いて室温、10 分間固定し、その後 0.1%トルイジンブルー含有 PBS 溶液を用い室温にて 18 時間染色を行った。顕微鏡で観察し、50 以上の細胞を含むコロニーを単一コロニーとして認識し、コロニーの数を計測した。

### 3-2-7. フローサイトメトリー法による幹細胞マーカーの発現の解析

$1 \times 10^6$  cells/ml の細胞を幹細胞に特異的な抗体で染色した。1 次抗体のサブクラスと一致した非特異的抗体をコントロールとして使用した。フローサイトメトリー解析には FACSCalibur フローサイトメーター (BD Bioscience) を使用した。陽性細胞の割合 (%) は CellQuest ソフトウェア (BD Bioscience) を使用して求めた。

### 3-2-8. ヒト MSC の *in vitro* 多分化能の解析

#### 3-2-8-1. *in vitro* 象牙質/骨形成誘導能の解析

象牙質/骨形成誘導能の解析は過去の報告 (Yamaza et al., 2009; 2010) を参考にした。MSC を 60 mm ディッシュあたり  $5 \times 10^3$  個を播種し、コンフルエントに至るまで培養した。その後増殖培地に 1.8 mM リン酸カリウム 2 水和物 (Sigma, St. Louis, MO)、10 nM デキサメタゾン (Sigma) を添加した象牙質/骨形成誘導培地にて培養した。誘導開始 1 週後、半定量的 RT-PCR による象牙芽細胞/骨芽細胞分化特異的遺伝子発現の解析やアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP) 活性試験を実施した (Yamaza et al., 2010)。硬組織形成能の解析にはアリザリンレッド染色法を用いた。誘導開始 4 週後の培養群を 1 %アリザリンレッド S (Alizarin Red-S) (Sigma) にて染色した。アリザリンレッド陽性領域を NIH イメージソフトウェア Image-J で計測し、全領域に対するアリザリンレッド陽性領域を割合として算出した。

#### 3-2-8-2. *in vitro* 脂肪細胞誘導能の解析

脂肪細胞誘導は過去の報告 (Yamaza et al., 2009; 2010) に準じて行った。MSC をコンフルエントまで培養し、増殖培地に 500  $\mu$ M isobutyl-methylxanthine (Sigma), 60  $\mu$ M indomethacin (Sigma), 0.5  $\mu$ M hydrocortisone (Sigma), 10  $\mu$ M insulin (Sigma) を加えた脂肪細胞誘導培地で 6 週間培養した。培養群は 0.3%の Oil red O (Sigma) にて脂肪滴を染色した。また Oil red O をイソプロパノールにて抽出し、波長 520 nm にて吸光度測定を行った。脂肪細胞特有の遺伝子発現は半定量的 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) にて解析を行った。

### 3-2-8-3. *in vitro* 神経細胞誘導能の解析

神経細胞への分化は過去の報告 (Miura et al., 2003; Zhang et al., 2009) に準じて行った。MSC を  $1 \times 10^4$  cells/well の濃度で poly-D-lysine/laminin でコーティングされた 8-well chamber slide (Nunc, Roskilde, Denmark) に播種し、Neurobasal A (Invitrogen) に 1×N2 supplement (Invitrogen), 10 ng/ml fibroblast growth factor 2, 10 ng/ml epidermal growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を加えた培地で培養した。培地交換は週に 2 回行った。神経細胞の分化は抗 glial fibrillary acidic protein 抗体、抗 neural filament M 抗体、抗  $\beta$  III tubulin 抗体を用いた免疫蛍光染色によって解析した。

### 3-2-8-4. *in vitro* 血管内皮細胞分化能の解析

血管内皮細胞への分化は過去の報告 (Zhang et al., 2009) に準じて施行した。MSC ( $1 \times 10^4$  cells/well) をフィブロネクチンコーティングされた 8-well chamber slide (Nunc) に播種し、内皮細胞成長培地 2 (Lonza, Basel, Switzerland) を用いて 7 日間培養を行った。培地交換は 2 日毎に行った。内皮細胞の分化は抗 CD31 抗体と抗 CD34 抗体を使用した免疫蛍光染色にて解析した。

### 3-2-9. 免疫蛍光染色法によるヒト MSC の細胞マーカーの発現解析

細胞を 4%PFA にて固定し、10%の正常血清にて処理した。細胞表面マーカーに対する特異的抗体を 4 °C にて一晩反応させ、CF633 標識 2 次抗体 (Biotium, Hayward, CA) で室温 45 分間処理した。コントロールとして 1 次抗体のサブクラスと一致した非特異的抗体を使用した。4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Dojindo,



Kumamoto, Japan)にて核染色し、観察した。陽性細胞数を計測し、全細胞数における割合を算出した。

### 3-2-10. ヒト MSC の *in vivo* 組織再生能の解析

*in vivo* 組織再生能の解析は過去の報告 (Shi et al., 2002; Yamaza et al., 2009; 2010) を参考にした。細胞 ( $4 \times 10^6$ ) をキャリアーの hydroxyapatite tricalcium phosphate (HA/TCP; 40 mg, Zimmer Inc., Warsaw, IN) と混合し、8~10 週齢 Balb/c *nu/nu* マウスの背部皮下に移植した。移植 8 週後に移植体を採取した (図 3-2 A)。

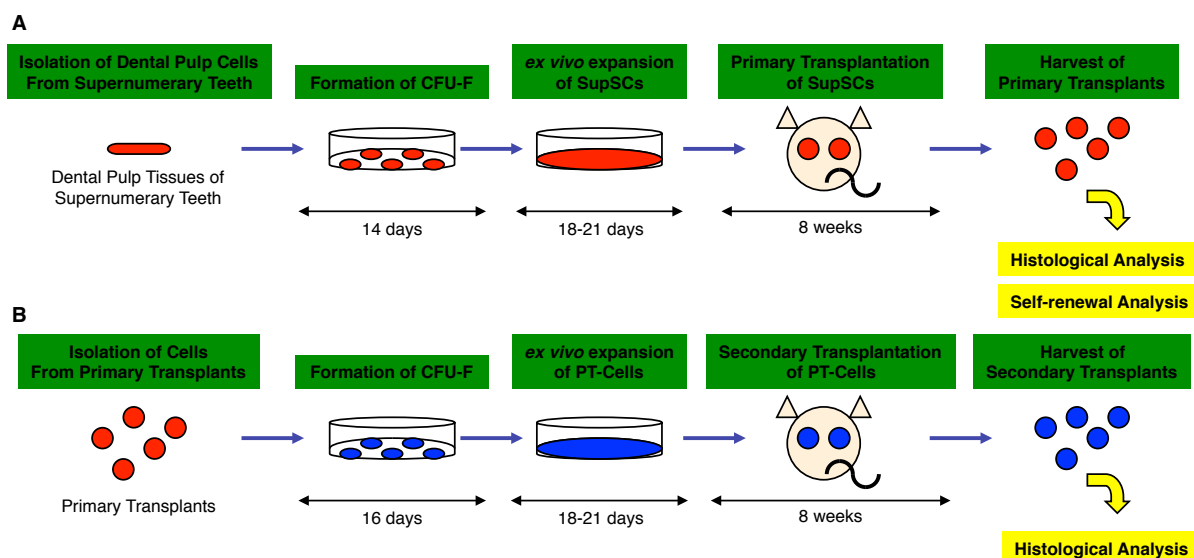


図 3-2. *in vivo* 組織再生実験の概略図(A): *in vivo* 組織再生能の解析方法。培養した SupSC ( $4 \times 10^6$ ) を HA/TCP キャリアー (40 mg) とともに免疫不全マウスの皮下に移植 (一次移植) した。移植 8 週後移植体を採取し、組織学的解析に供した。(B): 自己複製能の解析方法。一次移植体より細胞を単離し、CFU-F を形成させた。CFU-F を増殖培養させ、一次移植と同様に皮下移植を遂行した。移植 8 週後に移植体を採取し、組織学的解析を行った。

### 3-2-11. ヒト MSC の *in vivo* 自己複製能解析

*in vivo* 自己複製能の解析は (Bi et al., 2007) の方法を参考にした (図 3-2 B)。MSC は HA/TCP キャリアーと混合し、Balb/c *nu/nu* マウスに皮下に一次移植した。移植 8 週後に一次移植体を採取し、0.4% dispase II を用いて 37°C で 60 分間作用させて細胞を単離した。単離細胞を低濃度で播種し CFU-F を得た。コロニー形成細胞を継代し得られた増殖細胞を HA/TCP キャリアーとともに免疫不全マウスの皮下に二次移植した。移植 8 週後にこれら二次移植体を採取した。

### 3-2-12. 移植組織の組織学的解析

移植組織の組織学的解析は過去の報告 (Shi et al., 2000; Yamaza et al., 2009; 2010) に準じた方法で行った。移植組織は 4 % PFA 含有 PBS 溶液で固定し、5 % EDTA 水溶液 (pH 7.4) で脱灰を行った。凍結切片を作製し H&E 染色を行った。切片の一部を用いて抗ヒトミトコンドリア抗体と反応させ、免疫蛍光染色を行った。各実験群から 7 画像を任意に選択し、新たに形成された石灰化組織とニッチの領域を NIH Image-J ソフトウェアを使用して計測し、全組織領域からの割合を算出した。

### 3-2-13. ヒト MSC のポピュレーションダブリング (population doubling; PD) 解析

T-75 培養フラスコ (BD Bioscience) に細胞を播種し、細胞が 70% コンフルエントに至れば、継代を行った。これらの一連の操作は細胞分裂が停止するまで繰り返し行った。継代時に初期播種細胞数と最終獲得細胞数を記録し、各継代でのスコアを  $\log_2(\text{最終獲得細胞数} / \text{初期播種細胞数})$  を用いて算出した。PD スコアは全スコアの合計で決定した。

### 3-2-14. ヒト MSC の bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み能の解析

BrdU 陽性核の細胞の数を計測した。MSC (P 3) を 2-well chamber slide (Nunc, Rochester, NY) に 1 well 当り  $1 \times 10^3$  の密度で播種し、増殖培地にて培養した。BrdU 試薬 (1:100, Invitrogen) を培地に添加し、その 24 時間後細胞を BrdU 染色キット (Invitrogen) にて染色した。その後ヘマトキシリンにて対比染色した。各実験群から 7 画像を任意に選択し、BrdU 陽性および陰性の核の数を計測した。全核数における BrdU 陽性核数の割合を算出し、細胞増殖能力として評価した。

### 3-2-15. ヒト MSC のテロメラーゼ活性の解析

テロメラーゼ活性は過去の報告 (Yamaza et al., 2008; 2010) を参考にした。テロメラーゼ活性は、定量的テロメア検出キット (Allied Biotech, Inc., Ijamsville, MD) をリアルタイム PCR で使用し、テロメア繰り返し増幅プロトコル解析によって計測を行った。ポジティブコントロールとして HEK293T 細胞を使用した。抽出物を 85°C にて 10 分間熱処理ししたものをネガティブコントロールとして使用した。蛍光単位の平均始動量 (starting quantity; SQ) を解析に使用した。

### 3-2-16. 半定量的 RT-PCR による解析

total RNA は TRIzol (Invitrogen) を使用し培養細胞から抽出し、その抽出物を DNase I で処理した。cDNA は全 RNA 100 ng から Superscript III (Invitrogen) を用いて合成した。cDNA は遺伝子特異的プライマーと Platinum PCR supermix (Invitrogen) と混合し、通法通り PCR を行った。PCR 産物をエチジウムブロマイド染色し、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。バンドの強度は Image-J ソフトウ

エアを用いて計測した。コントロール遺伝子として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を使用した。本実験で使用したヒト特異的 PCR プライマーペアの配列は章末の表 3-2 に記載した。

### 3-2-17. 単一コロニー由来細胞の解析

単一コロニー由来細胞の解析は Gronthos et al.(2003)の方法を参考にした。過剰歯髄組織から単離した細胞は限外希釈法で培養した。具体的には、24 well multiplate に 1, 2, 3, 4, 10 cells/well の細胞濃度で播種し、2 つ以上の接着性コロニーを含んだ well は以後の培養から除外した。播種後 14 日で、接着性単一コロニー形成細胞を各々回収した。各単一コロニー由来の細胞は個々に増殖させ、PD 解析、BrdU 取り込み能の解析、アリザリンレッド染色による硬組織形成能の解析に使用した。

### 3-2-18. ヒト T 細胞の生存解析

ヒト PBMNC の生存解析は、過去の報告 (Zang et al.,2009; Yamaza et al., 2011) を参考にし、SupSC または hBMMSc とヒト PBMNC との共培養実験を行った。SupSC または hBMMSc は、1 well 当り  $0, 2 \times 10^3, 20 \times 10^3, 200 \times 10^3$  の細胞と  $200 \times 10^3$  のヒト PBMNC を混合し、リンパ球用完全培地で培養した。完全培地として、非動化 10%FBS および 2 mM L-glutamine, 50 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen), 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen)を使用した。T 細胞マイトジェン phytohemagglutinin (PHA, Sigma) を培地に 5  $\mu$ g/ml 添加した。共培養 72 時間後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を使用して波長 450 nm の吸光度を測定し、PBMNC の生存解析を行った。

### 3-2-19. 制御性 T 細胞 (regulatory T-cells; Tregs) とインターロイキン 17 分泌型ヘルパー T (interleukin 17-producing helper T; Th17) 細胞の誘導能の解析

Treg と Th17 細胞の誘導能の解析は Yamaza et al. (2010)を参考にした。Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)を用いてヒト PBMNC に磁気ビーズ標識を行い、MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec)を使用して、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を磁気分離した。プレートコートした抗ヒト CD3 抗体 (5 µg/ml, eBioscience, San Diego, CA)と抗ヒト CD28 抗体 (1 µg/ml, eBioscience)にて、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞 (1×10<sup>6</sup>/well) を 3 日間刺激し、活性化を行った。活性化 T 細胞 (1×10<sup>6</sup>/well)と MSC (20×10<sup>3</sup>/well)とを完全培地で共培養した。Treg を分化誘導するために培地にリコンビナントヒト transforming growth factorβ1 (TGFβ1)と interleukin 2 (IL-2) (それぞれ 2 µg/ml, R&D Systems) を、Th17 細胞を分化誘導するためにリコンビナントヒト TGFβ1 (2 µg/ml, R&D Systems)と IL-6 (50 µg/ml, R&D Systems)を添加した。3.5 日間共培養し、浮遊細胞と培養上清を回収した。

浮遊細胞はフローサイトメトリー法で Treg と Th17 細胞の分化誘導を解析した。Treg を検知するために、浮遊細胞 (1×10<sup>6</sup>) を PerCP 標識抗ヒト CD4 抗体、FITC 標識抗ヒト CD8a 抗体、APC 標識抗ヒト CD25 抗体と反応させ、Foxp3 staining buffer kit (eBioscience)を使用し R-PE 標識抗ヒト Foxp3 抗体で染色を行った。また Th17細胞を計測するために、1×10<sup>6</sup>の 浮遊細胞を PerCP標識抗ヒト CD4抗体、FITC 標識抗ヒト CD8a 抗体で染色した後、Foxp3 staining buffer kit (eBioscience) を使用し R-PE 標識抗ヒト IL-17 抗体と APC 標識抗ヒト interferon gamma (IFNγ) 抗体と反応させた。染色した細胞を FACSCalibur (BD Bioscience)を用いて解析した。

また、培養上清中の IL-10 と IL-17 を Human IL-10 Quantikine ELISA Kit およ

び Human IL-17 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)を使用し測定した。

### 3-2-20. 統計学的処理

2 グループ間の有意差検定には Student's t-test を使用した。0.05 以下の P 値を有意差ありと見なした。

### §3-3. 結果

ヒト正中過剰歯歯髄から単離された細胞集団 SupSC が MSC であるかを解明するために、コロニー形成能、多分化能、自己複製能や組織再生能などを検索した。

#### 3-3-1. ヒト正中過剰歯歯髄の組織学的特徴

まずヒト正中過剰歯歯髄の組織学的解析を行なった。H&E 染色切片を観察したところ、過剰歯では象牙質、象牙芽細胞、歯髄細胞、血管、神経線維、結合組織を認め(図 3-3 A)、正中過剰歯が正常永久歯および乳歯と同じ象牙質／歯髄複合体構造を呈していた。次に免疫組織化学染色法により、歯髄組織の血管周囲細胞において初期の MSC マーカーである STRO-1 および CD146 抗原の発現が明らかになった(図 3-3 B)。この所見はヒト正常永久歯歯髄における歯髄幹細胞の局在様式と非常に類似していた(Shi et al., 2003)。現在ヒト正常永久歯や乳歯の歯髄からは MSC ポピュレーションが単離同定されており(Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003)、これら組織学および免疫組織学的所見は、過剰歯の歯髄組織に MSC が存在することを強く示唆する結果であった。

#### 3-3-2. SupSC の MSC 特性解析

通法の CFU-F 法で過剰歯歯髄組織から MSC の単離を試みた。歯髄組織を酵素処理して単細胞浮遊液を得た。細胞を培養ディッシュに低濃度で播種した。播種 3 時間後、培養ディッシュを PBS で洗浄すると一部の細胞がプラスチック培養ディッシュ上に独立して付着していた。培養を継続するとこれら付着細胞が分裂し、最終的に線維芽細胞様紡錘形を呈する細胞集団、CFU-F を形成した(図 3-3 C)。各コロニーは

異なる大きさおよび異なる細胞密度を示した (図 3-3 D)。5 検体間ではコロニー数が異なっていた (図 3-3 E)。コロニー形成効率は細胞  $1 \times 10^6$  あたり  $88.0 \pm 2.0$  (平均値  $\pm$  標準偏差,  $n=5$ ) であった (図 3-3 E)。また hBMSC と比較して SupSC でのコロニー数が有意に多く認められた (図 3-3 F)。

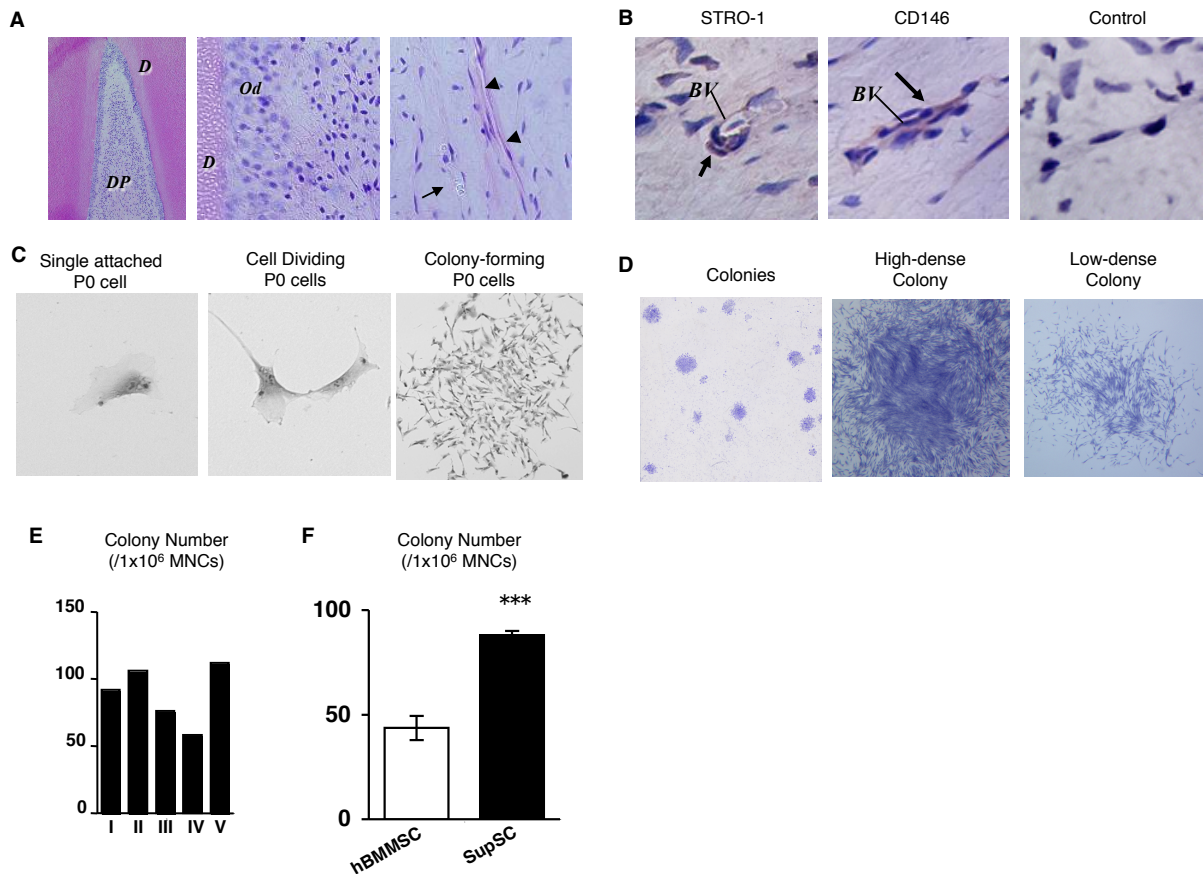


図 3-3. 正中過剰歯歯髄組織と SupSC の MSC 特性解析。(A): 正中過剰歯歯髄組織像。正中過剰歯内部では象牙質(D)/歯髄(DP)複合体が観察され (左)、歯髄組織には象牙芽細胞 (Od)、血管 (BV)、神経 (矢印)が認められた (中、右)。HE 染色。(B): 正中過剰歯歯髄における間葉系幹細胞マーカーの局在 (免疫組織化学法)。正中過剰歯歯髄において、抗 STRO-1 抗体 (左)ならびに抗 CD146 抗体 (中)に陽性反応を示す細胞 (矢印) が血管 (BV) 周囲に認められた。Control:コントロール抗体による染色。ヘマトキシリン核染色。(C): 細胞単離と培養。過剰歯歯髄より単離した細胞を低密度で播種すると、付着性単一細胞が認められた (左)。その後分裂し、線維芽細胞様細胞からなる細胞集団を CFU-F (colony forming unit-fibroblasts)形成した (中)。付着性コロニー形成細胞を継代すると十分な増殖性が観察された (右)。(D-F): 過剰歯歯髄組織



由来 CFU-F。(D): 大きさならびに細胞密度の異なる様々なコロニーが形成された。トルイジンブルー染色。(E): 5 検体のコロニー形成効率は細胞  $1 \times 10^6$  あたり  $88.0 \pm 2.0$  (平均値  $\pm$  標準偏差,  $n=5$ )であった。(F): hBMMSC、SupSC でコロニー形成数を比較した所、SupSC では hBMMSC と比べて多くのコロニーが形成された。\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。 $n=5$ 。

フローサイトメトリー法により SupSC の表面マーカーの発現を解析した (図 3-4 A)。SupSC は造血幹細胞マーカーである CD34、CD45、CD14 に陰性であった。特徴的な MSC マーカーである STRO-1 ( $8.9 \pm 0.7\%$ )、CD146 ( $98.1 \pm 3.0\%$ )、CD73 ( $99.7 \pm 0.3\%$ )、CD105 ( $6.3 \pm 0.5\%$ )、CD166 ( $99.9 \pm 0.1\%$ )、CD29 ( $99.3 \pm 0.3\%$ )、CD90 ( $99.8 \pm 0.1\%$ )や胚性幹細胞マーカーである SSEA-4 ( $27.3 \pm 1.6\%$ )に陽性を示した。これらの結果により、SupSC が典型的な MSC である hBMMSC での表面抗原プロファイル (図 3-4 B) と類似していることが明らかとなった。また興味深いことに、初期の MSC マーカーである STRO-1、CD146、CD105 や胚性幹細胞のマーカーである SSEA-4 の発現を比べてみると hBMMSC よりも SupSC において高く発現していた (図 3-4 C)。

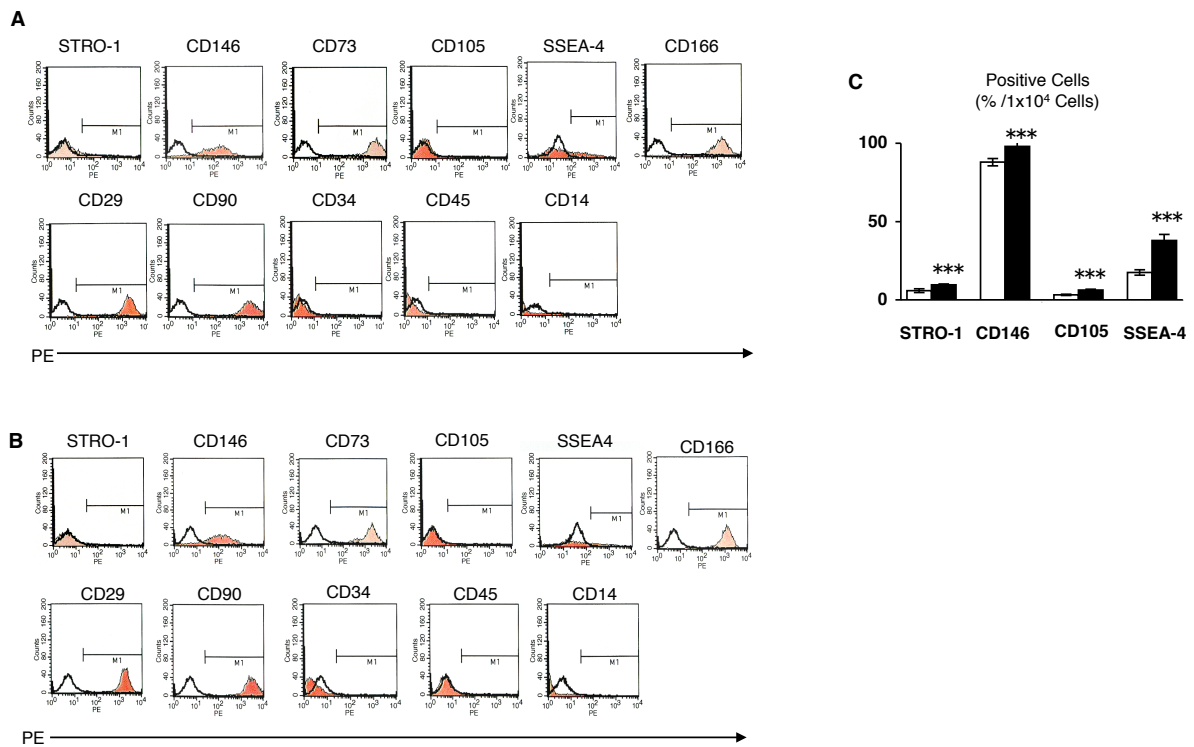


図 3-4. 幹細胞マーカー発現の解析。(A, B): フローサイトメトリー法により、SupSC ならびに hBMMSC における幹細胞マーカーの発現を解析した。(A): SupSC では、間葉系幹細胞マーカー (STRO-1, CD146, CD73, CD105) ならびに胚性幹細胞マーカー (SSEA-4) に陽性細胞が認められた。一方、造血系細胞マーカー (CD34, CD45, CD14) は陰性であった。(B): 典型的 MSC である hBMMSC の表面抗原発現状態。(C): hBMMSC と比較すると、SupSC では初期間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 および CD146, CD105 と胚性幹細胞マーカーの SSEA-4 の発現に有意差があった。白グラフ: hBMMSC、黒グラフ: SupSC。\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=5。

歯を含む口腔顔面領域の骨格構造体は胚形成期に遊走した頭部神経堤細胞より形成されると考えられている (Chai et al., 2000; Chung et al., 2009)。SupSC における多能性幹細胞や神経堤細胞のマーカーの遺伝子発現を半定量的 RT-PCR 法で解析した。SupSC では多能性幹細胞のマーカーである NANOG、octamer 4 (OCT4)、神経堤細胞のマーカーである NOTCH1、NESTIN、low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) の遺伝子を発現していた (図 3-5 A)。NANOG、OCT4、LNGFR

の遺伝子は hBMMSC よりも SupSC において高く発現していた (図 3-5 B,C)。これらの結果は、SupSC が hBMMSC よりもより未熟な幹細胞集団であることを示唆している。

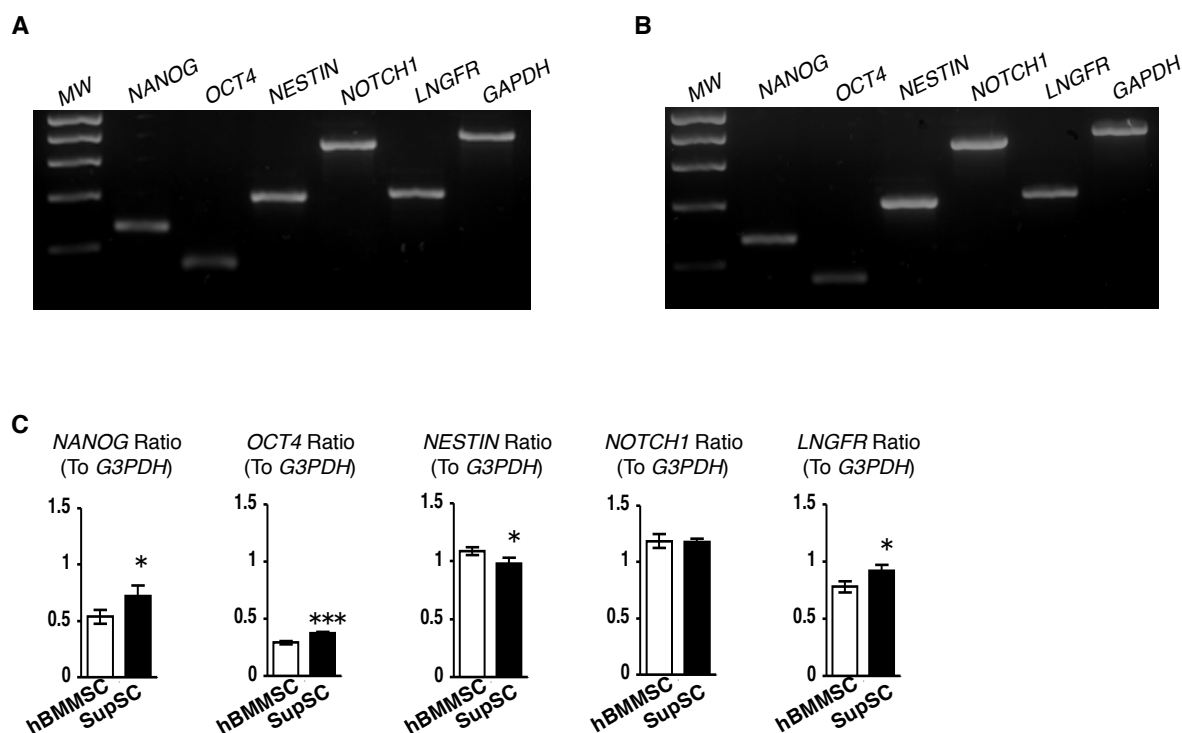


図 3-5. 半定量的 RT-PCR 法による多能性幹細胞と神経堤細胞のマーカの遺伝子発現の比較。(A, B): RT-PCR 後の電気泳動の結果によると、SupSC (A)、hBMMSC (B) 共に多能性幹細胞の遺伝子発現マーカーである NANOG と OCT 4 と、神経堤細胞で発現のみられる NESTIN、NOTCH1、LINGFR の発現が確認された。(C): 各遺伝子の発現比較。OCT4: octamer 4, LNGFR: low-affinity nerve growth factor receptor, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase。MW: molecular weight markers。\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=5。

### 3-3-3. SupSC の *in vitro* 多分化能の解析

#### 3-3-3-1. SupSC の *in vitro* 象牙芽細胞/骨芽細胞分化能の解析

象牙芽細胞/骨芽細胞分化能を検索するために、L-ascorbate-2-phosphonate、無

機リン酸、デキサメタゾンの存在下において SupSC を培養した。対照群としてこれらを含みしない培地で培養を行った。象牙芽細胞／骨芽細胞分化培養誘導 4 週間後においてアリザリンレッド陽性の小結節が形成された。対照群ではその形成は認められなかった (図 3-6 A)。分化誘導開始 1 週間後では SupSC において高い ALP 活性が検出されたが、対照群においては検出されなかった (図 3-6 B)。さらに RT-PCR 解析により誘導 1 週間後の細胞において骨芽細胞／象牙芽細胞特異的遺伝子である RUNX2、ALP、osteocalcin、dentin sialophospho protein の発現が確認された (図 3-6 C)。またアリザリンレッド染色および半定量的 RT-PCT 解析の結果より SupSC では hBMMSC と比較して石灰化結節形成能力が高いことが明らかとなった (図 3-6 D, E)。

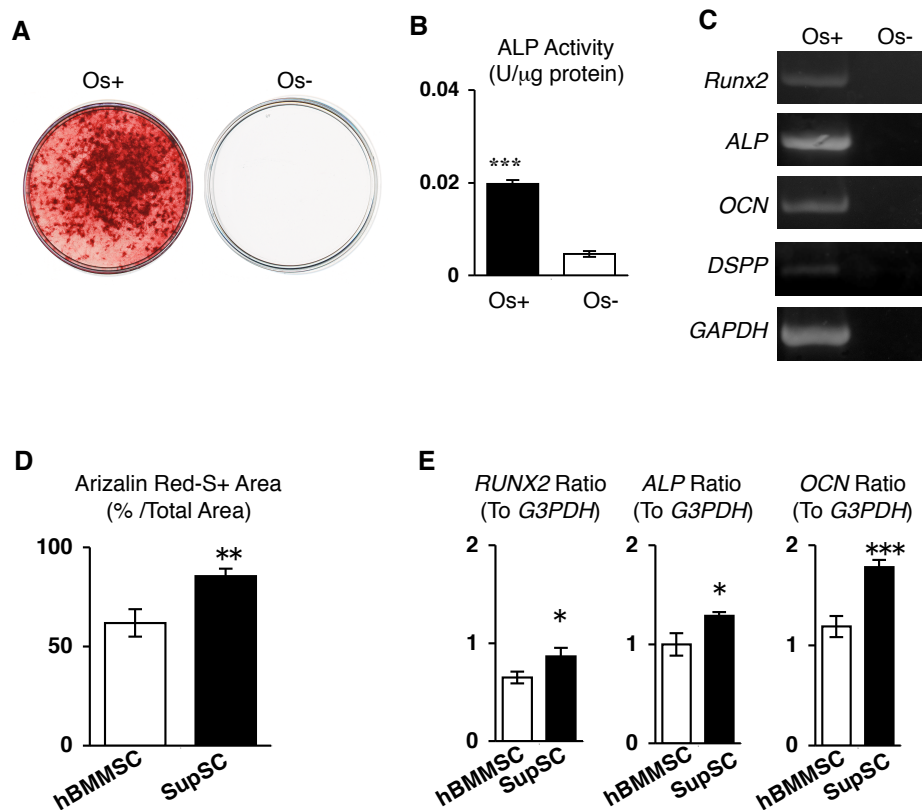


図 3-6. 骨芽細胞/象牙芽細胞分化能の解析。(A, B): SupSC を象牙芽細胞/骨芽細胞分化培地で培養した。(A): 誘導 6 週間後、アリザリンレッドで染色した。骨芽細胞分化培地 (Os+) で培養した SupSC は、アリザリンレッドに陽性を示す小結節を形成していた。未分化培地 (Os-) ではアリザリンレッド陽性小結節は観察されなかった。(B): 誘導 1 週間後 ALP 活性を測定した。骨芽細胞分化培地 (Os+) で培養した SupSC では未分化培地 (Os-) に比べ高い ALP 活性を示した。(C): 誘導 1 週間後 total RNA を抽出し、RT-PCR 法により象牙芽細胞/骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現を解析した。Os+ 群で runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), alkaline phosphatase (*ALP*), osteocalcin (*OCN*), dentin sialophosphoprotein (*DSPP*) の発現が認められた。GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase。(D, E): 象牙芽細胞/骨芽細胞分化能の比較。(D): 誘導 6 週間後アリザリンレッドで染色し、陽性面積を計測した。hBMMSC と比較して SupSC は高い硬組織形成能を示した。(E): 半定量的 RT-PCR 法により、骨芽細胞・象牙芽細胞分化特異的遺伝子の発現を比較した。hBMMSC に比べ SupSC では、*Runx2*, *ALP*, *OCN* とともに遺伝子発現に有意差を認めた。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=5。

### 3-3-3-2. SupSC の *in vitro* 脂肪細胞分化能の解析

次に SupSC の脂肪細胞分化能を検討した。ヒドロコルチゾン、インドメタシン、インシュリン、イソブチルメチルキサンチン存在下で SupSC を 6 週間培養した。誘導培養系ではオイルレッド染色で陽性反応を示す脂肪滴を含む細胞が観察された (図 3-7 A)。RT-PCR 法により、誘導培養系では脂肪細胞の特異的遺伝子である lipoprotein lipase (LPL) や peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  2 (PPAR $\gamma$  2) が発現していた (図 3-7 B)。対照群ではオイルレッド O 陽性脂肪滴および脂肪細胞特異的遺伝子の発現は認められなかった。hBMMSC と比較した場合、SupSC の脂肪細胞分化能力は顕著に低かった (図 3-7 C, D)。

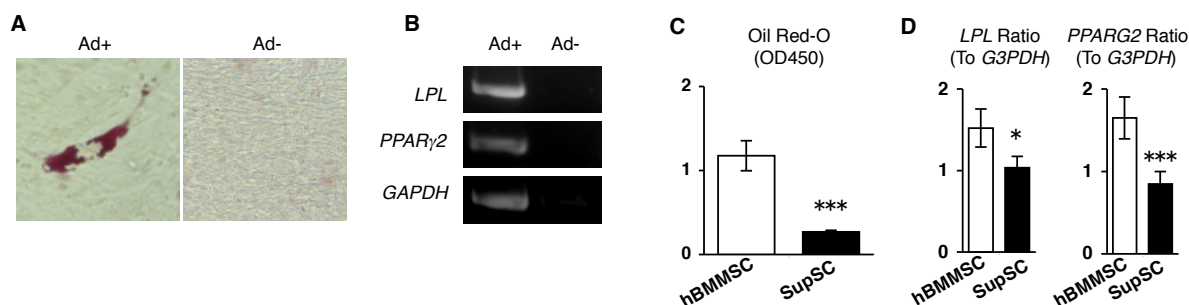


図 3-7. 脂肪細胞分化能の解析。(A, B): SupSC を脂肪細胞分化培地で培養した。(A): 誘導 8 週間後オイルレッド O で染色した。脂肪細胞分化培地 (Ad+) で培養した SupSC は、細胞内にオイルレッド O に陽性を示す脂肪滴を形成していた。未分化培地(Ad-)ではオイルレッド O 陽性脂肪滴を含有する細胞は観察されなかった。(B): 誘導 8 週間後 total RNA を抽出し、RT-PCR 法により脂肪細胞分化特異的遺伝子の発現を解析した。Ad+群では lipoprotein lipase (LPL) および peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) の発現が認められた。GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase。(C, D): 脂肪細胞分化能の比較。(C): 誘導 8 週間後オイルレッド O で染色し、オイルレッド O 含有量を測定した。hBMMSC と比べ SupSC では脂肪滴の形成が低下していた。(D): 半定量的 RT-PCR 法により LPL と PPAR $\gamma$ 2 の遺伝子発現を解析した。hBMMSC と比較して、SupSC では LPL と PPAR $\gamma$ 2 の発現が低下していた。\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=5。

### 3-3-3-3. SupSC の *in vitro* 神経細胞／内皮細胞分化能の解析

神経細胞分化条件下において SupSC を培養した。免疫蛍光染色法で神経細胞のマーカー発現を解析した。神経細胞分化誘導培養系では *glial fibrillary acidic protein*、*neurofilament M*、 $\beta$  III *tubulin* に陽性を示した (図 3-8 A)。SupSC を内皮細胞分化条件下にて 1 週間培養すると、内皮細胞特有のマーカーである CD31 および CD34 に陽性を示す細胞が免疫蛍光染色法により検出された (図 3-8 B)。対照群の SupSC は神経細胞および内皮細胞に固有のマーカーの発現は認められなかった (図 3-8 A, B)。興味深いことに、神経細胞および内皮細胞への分化能に関して SupSC は hBMMSC と比べて神経細胞および内皮細胞への高い分化能を示した (図 3-8 C, D)。以上の *in vitro* における分化能の解析により、SupSC において中胚葉系の象牙芽細胞／骨芽細胞や脂肪細胞に、また外胚葉系の神経細胞や内胚葉系の内皮細胞へ分化する能力が明らかとなった。

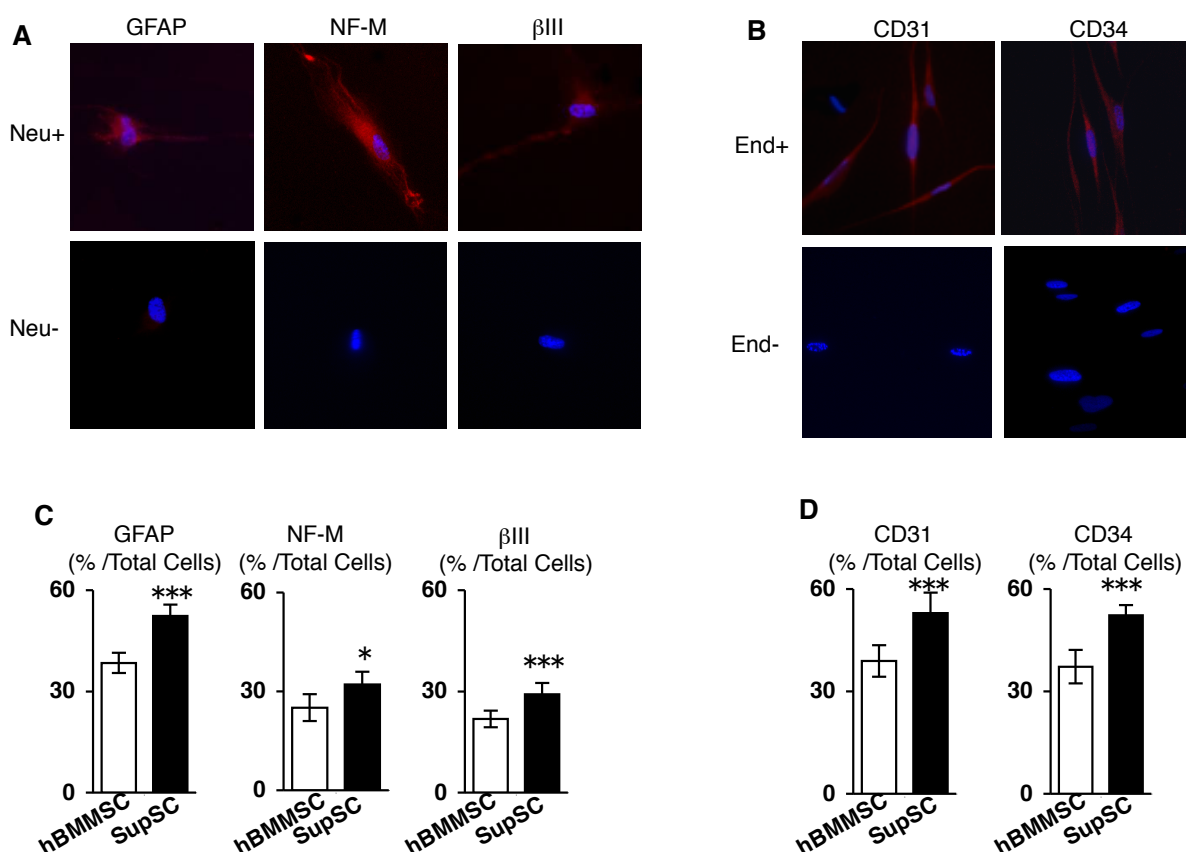


図 3-8. 神経細胞および血管内皮細胞分化能の解析。(A): SupSC を神経細胞分化培地で培養した。誘導 3 週間後、神経細胞マーカー特異的抗体を用いた免疫蛍光染色を施した。神経細胞マーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)、neurofilament M (NF-M)、 $\beta$ -tubulin III ( $\beta$ III) に陽性を示す細胞が観察された。DAPI 核染色。(B): SupSC を血管内皮細胞分化培地で培養した。誘導 7 日後、血管内皮細胞マーカー CD31 および CD34 に対する特異的抗体を用いた免疫蛍光染色を施し、CD31、CD34 に陽性を示す細胞が観察された。DAPI 核染色。(C): 神経細胞分化能の比較。各神経細胞マーカーに対する陽性細胞率を算出した。hBMMSC と比べ SupSC では各神経マーカーに対する陽性率が高かった。\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=5。(D): 血管内皮細胞分化能の比較。CD31 および CD34 に対する陽性細胞率を算出した。hBMMSC と比べ SupSC では CD31 および CD34 に対する陽性率が高かった。\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=5。



#### 3-3-4. SupSC の *in vivo* 組織再生能の解析

*in vivo* 組織再生能力を検索するために、SupSC を HA/TCP キャリアーと混合し免疫不全マウスの背部皮下に移植実験を行った (図 3-2)。H&E 染色による組織学的解析により、移植 8 週後の移植組織では HA/TCP の表面上に象牙質様基質が沈着していた。またこの象牙質様構造物により取り囲まれる軟組織が存在していたことから、象牙質／歯髄複合体様構造物の形成が明らかとなった (図 3-9 A)。興味深いことに、移植組織では象牙質／歯髄複合体様構造物の他、骨様層板状構造物とこれにより取り囲まれた骨髄様組織の形成も観察された (図 3-9 A)。HA/TCP キャリアーのみの皮下移植群では石灰化組織は認められなかった (データ未提示)。抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた免疫蛍光染色法により、象牙質または骨様構造物に沿ってヒトミトコンドリア陽性細胞が局在していた (図 3-9 A)。また、歯髄または骨髄様組織の中にもヒトミトコンドリア陽性細胞が認められた。これは硬組織形成細胞が SupSC に由来し、移植体内部の象牙質様および骨様構造物が SupSC により形成されたことを示唆する所見である (図 3-9 A)。hBMSC と比較した場合 SupSC では高い *in vivo* 硬組織形成能を示した (図 3-9 B)。象牙質／歯髄複合体と骨／骨髄様構造体を形成する特徴的な SupSC の *in vivo* 組織再生能力は、ヒト脱落乳歯由来幹細胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED) の *in vivo* 組織再生能力と酷似していた (Miura et al., 2003; Yamaza et al., 2010)。

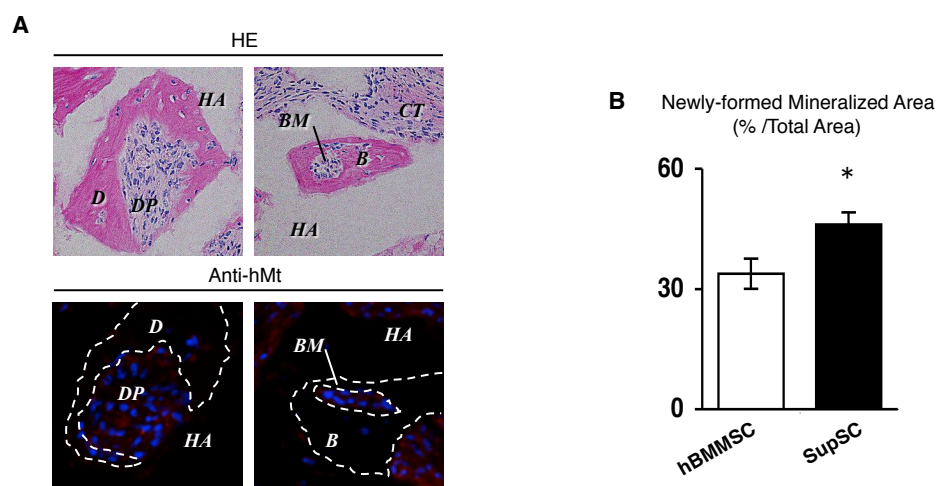


図 3-9. *in vivo* 組織再生能の解析。(A): SupSC を HA/TCP キャリアーとともに免疫不全マウスに 8 週間皮下移植した。一次移植体から組織切片を作製し、H&E 染色を施した。一次移植体中には象牙質(D)／歯髄(DP)複合体様構造物が観察された。また、骨(B)／骨髄(BM)構造物も認められた。抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた免疫蛍光染色法により、ヒトミトコンドリアに陽性を示す細胞が歯髄および骨髄中に局在していた。DAPI 核染色。HA: HA/TCP キャリアー。(B): *in vivo* 組織再生能の比較。新生硬組織の形成量を NIH Image-J で解析した。hBMMSC に比べ SupSC は一次移植体内部で高い *in vivo* 硬組織再生能力を備えていた。\* $P<0.05$ 。

ポピュレーションダブリング解析により、SupSC は *in vitro* において優れた連続した細胞増殖能を有していたが、その増殖能は有限であった。(図 3-10 A)。5 検体間でのポピュレーションダブリングスコアに違いが認められた (図 3-10 B)。hBMMSC のポピュレーションダブリングスコア (24.5±1.4, n=5) と比べると、SupSC では高いポピュレーションダブリングスコアを示した (65.5±3.2, n=5) (図 3-10 C)。SupSC では BrdU 取り込み能が認められた (BrdU 陽性細胞率 74.1±4.0%, n=5) (図 3-10 D)。hBMMSC と比較すると SupSC は高い細胞増殖活性を示した (図 3-10 E)。リアルタイム PCR 解析により SupSC では、その活性が HEK293 細胞に比べ低度ではあるがテロメラーゼ活性を保持していた (図 3-10 F)。SupSC では hBMMSC よりも有意に

高いテロメラーゼ活性を示した (図 3-10 G)。これらの高いポピュレーションダブリングや細胞増殖活性、テロメラーゼ活性を示すことから SupSC が優れた自己複製能力を備えていることが強く示唆された。

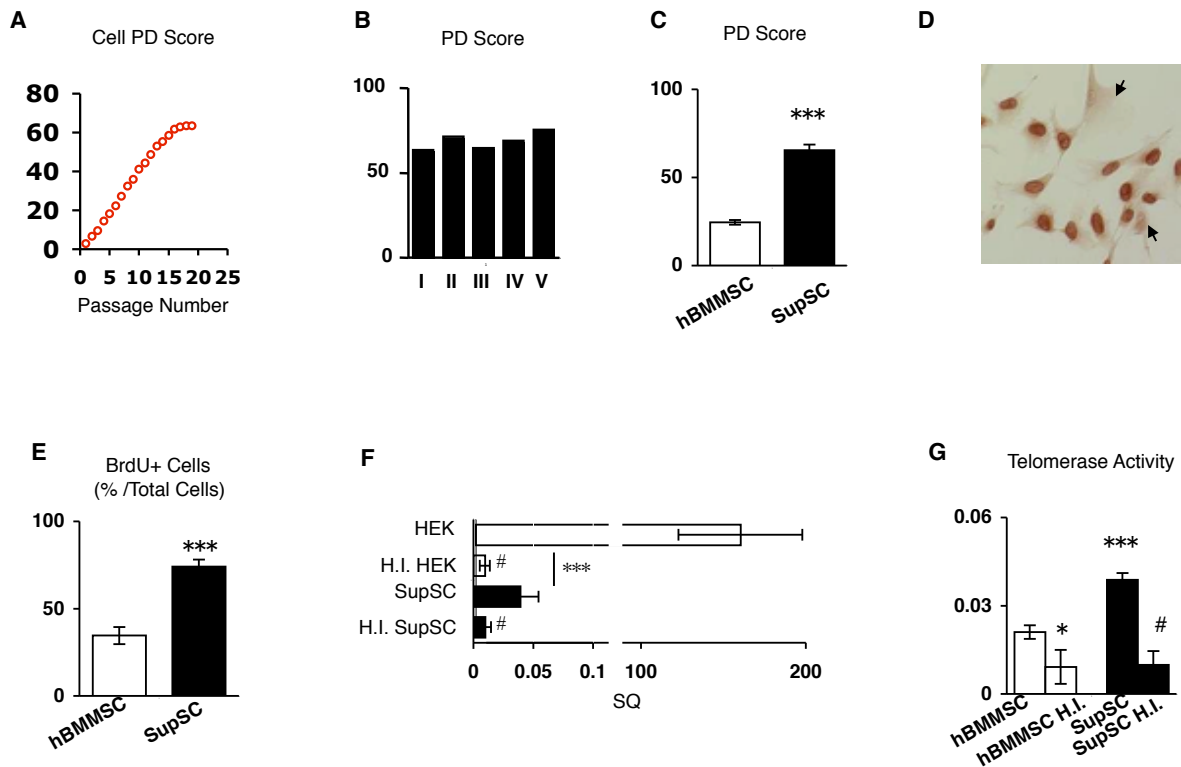


図 3-10. ポピュレーションダブリング (PD)および BrdU 取り込み、テロメラーゼ活性の解析。(A): SupSC を継代培養し、各継代での PD スコアを算出した。継代培養の結果、SupSC は連続性のある細胞増殖能が認められた。しかしその増殖には限界が認められた。(B): 5 検体間では異なる PD スコアを示した。(C): SupSC では hBMMSC と比較して高い PD スコアを示した。\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=5。(D): BrdU (1:100)を 24 時間作用させ、免疫染色法にて BrdU の取り込み能を解析した。多くの SupSC の核が BrdU 陽性を示したが、一部の細胞の核は陰性 (矢印)であった。(E): SupSC では hBMMSC と比較して高い BrdU 陽性率を示した。\*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=5。(F): Telomere repeat amplification protocol 法を用いたリアルタイム PCR でテロメラーゼ活性を測定した。(F): SupSC では低値ながらもテロメラーゼ活性が検出された。SQ: Starting Quantity。HEK: HEK293 細胞、H.I.:熱処理サンプル。\*\*\* $P < 0.005$  (vs. HEK), # $P < 0.05$  (vs. SupSC)。n=3。(G): テロメラーゼ活性を比較すると、SupSC では hBMMSC と比べて高い活性が認められた。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.005$  (vs. hBMMSC)。n=3。

SupSC の自己複製能を解析するために連続移植法を行なった (図 3-2)。1 次移植組織を酵素処理し細胞を採取した。得られた単細胞浮遊液を培養ディッシュ上に低密度で播種し培養した。付着性コロニーを形成した細胞を MSC とみなし、継代増殖させた細胞を HA/TCP と混合して免疫不全マウスの皮下に再移植 (2 次移植) を行った。組織学的解析によりこれら 2 次移植体において象牙質/歯髄複合体様構造が認められた (図 3-11)。抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた免疫蛍光染色法により、2 次移植組織においても陽性細胞が確認された (図 3-11)。従って、連続移植実験の結果により SupSC が *in vivo* 自己複製能を有する幹細胞集団であることが解明された。

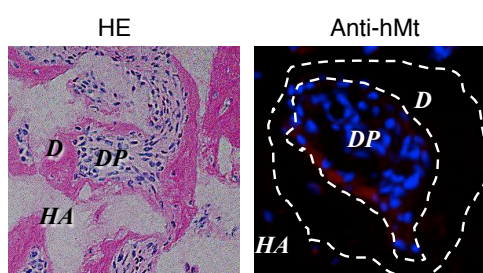


図 3-11. *in vivo* 自己複製能の解析。一次移植体より細胞を単離培養し、CFU-F コロニーを形成した細胞を増殖させた。一次移植と同様の方法で二次移植を行なった。移植 8 週後移植体を採取し、組織学的解析に供した。二次移植体中には象牙質/歯髄複合体様構造物が観察された。歯髄内部を構成する一部の細胞は、抗ヒトミトコンドリア抗体に陽性反応を示した。

### 3-3-5. SupSC の不均一性の解析

hBMMSC は細胞増殖能や骨形成能に関して、各単一コロニーに由来する hBMMSC コロニー間で性質の異なる細胞の集団であることがよく知られている (Kuznetsov et al., 1997; Gronthos et al., 2003)。このような性質を SupSC が有しているかを検索するために、過剰歯歯髄から単離した細胞を限外希釈法によって単一コロニー培養を試みた。得られた計 10 個の CFU-F コロニー細胞を個々に培養し、ポピュレーション

ンダブリング能や BrdU 取り込み能、*in vitro* 石灰化組織形成能を解析した。各々の単一コロニー由来の SupSC は有限ではあるが連続した細胞増殖能が認められ、様々なポピュレーションダブリングスコアおよび BrdU 取り込み能を示した (図 3-12)。さらに、各々の単一コロニー由来の SupSC で形成されたアリザリンレッド陽性小結節も様々な形成量を示した。以上の結果より、単離された SupSC はヘテロジェニクな細胞集団であると考えられる。

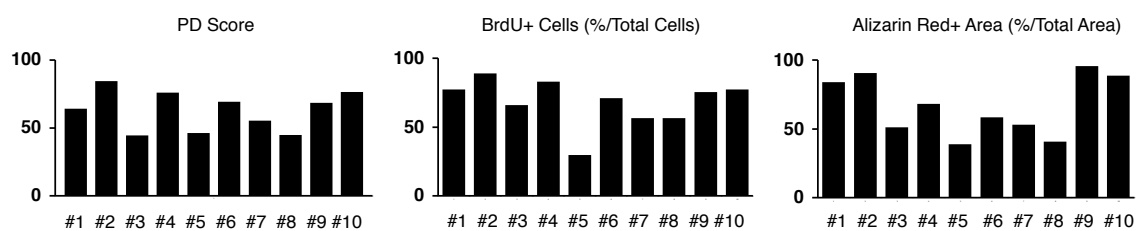


図 3-12. 単一コロニー由来細胞解析。限外希釈法により 10 個の単一コロニー由来細胞を得た。各々の単一コロニー由来 SupSC はそれぞれ異なる (A): PD スコア、(B): BrdU 取り込み能、(C): *in vitro* 石灰化能を示した。

### 3-3-6. SupSC の *in vitro* 免疫調節能の解析

現在まで、様々なヒト歯の組織由来の幹細胞 (永久歯歯髄幹細胞、歯周靭帯幹細胞、歯根先端幹細胞、乳歯歯髄幹細胞 stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED) が hBMMSC と同等の免疫調節能力を有していると報告されてきた (Wada et al., 2009; Ding et al., 2010; Yamaza et al., 2011)。免疫細胞、特に T 細胞に対する SupSC の免疫調節能を検索する為に、まず T 細胞増殖抑制効果を検索した。SupSC はリンパ球マイトジェン PHA で活性化されたヒト PBMNC と 3 日間共培養した (図 3-13 A)。SupSC はその細胞割合に応じて PHA 刺激ヒト PBMNC の細胞増殖を抑制した。興味深いことに、SupSC は hBMMSC よりもその抑制効果が強かった (図 3-13 C)。

hBMMSC および SHED では、Treg と Th17 細胞の分化を調節する能力が報告されている (Yamaza et al., 2010)。しかしながら SupSC におけるこれら T 細胞の調節機能の有無は不明である。そこで本実験において、SupSC による T 細胞の調節機能の解析を試みた。ヒト CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で活性化し、TGFβ1 および IL-2 または IL-6 の存在下において SupSC と共培養させ、その後フローサイトメトリー法により、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞または CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>interferon γ<sup>-</sup> (IFN γ<sup>-</sup>)細胞の分布を解析した。SupSC は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg の分化を誘導し (図 3-13 B, D)、かつ CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>IFNγ<sup>-</sup>Th17 細胞の分化を抑制していた (図 3-13 B, E)。培養上清を用いた ELISA 解析から、SupSC との共培養は IL-10 の分泌を促し、IL-17 分泌を抑制していた (図 3-13 E)。また SupSC による Treg の誘導と Th17 細胞の抑制は、hBMMSC よりも効果的であった (図 3-13 D, E)。

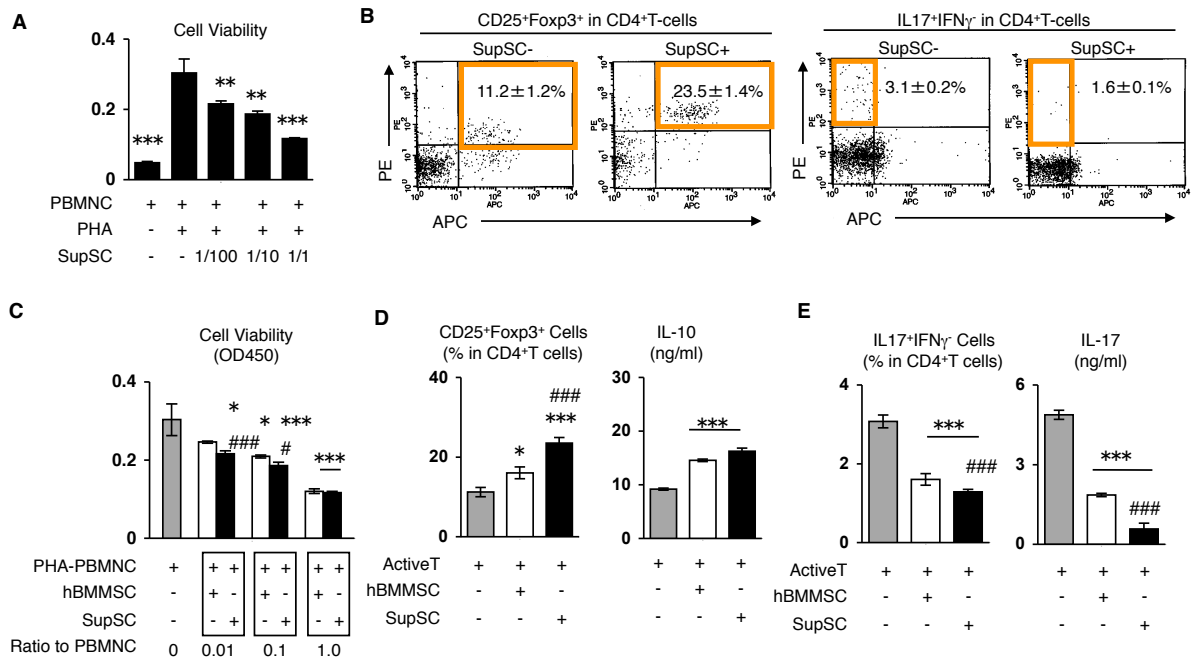


図 3-13. SupSC の *in vitro* 免疫調節能。(A, C): SupSC のヒト PBMNC 増殖に対する抑制効果。PHA (5 μg/ml)で刺激活性化された PBMNC を異なる比率の SupSC (SupSC/PBMNC=0, 1/100, 1/10, 1/1)と 72 時間共培養し、その後細胞生存率を測定した。hBMMSC 共培養群に比べ SupSC 共培養群は PHA 刺激 PBMNC の抑制を、細

胞比 0.01:1 と 0.1:1 の場合に高い抑制効果を示したが、1:1 の場合は同等であった。棒グラフは平均値±標準偏差を示す。n=5。(A): \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.005$  (vs. PHA 刺激 PBMNC)。(C): \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.005$  (vs. PHA 刺激 PBMNC); # $P<0.05$ , ### $P<0.005$  (vs. hBMMS 共培養群)。灰グラフ: PHA 刺激 PBMNC, 白グラフ: hBMMS 共培養群, 黒グラフ: SupSC 共培養群。(B, D, E): SupSC による Treg と Th17 細胞の分化調節能の解析。抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で活性化させた  $1 \times 10^6$  のヒト CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞 (ActiveT) を、Treg 用に TGF $\beta$  1、IL-2、IL-6 (各 2  $\mu$ g/ml) または Th17 用に IL-6 (50  $\mu$ g/ml) の存在下において MSC と 3 日間共培養させ、フローサイトメトリー法により解析を行った。SupSC は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg の分化を誘導したが、一方で CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>interferon  $\gamma$ <sup>-</sup> (IFN $\gamma$ <sup>-</sup>) Th17 細胞の分化を抑制した(B)。ActiveT 細胞単独培養に比べ、SupSC は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞のレベルを上昇させ、hBMMS 共培養群に比べ高い誘導を示した。SupSC 共培養群は Active T 細胞と hBMMS 共培養群よりも IL-10 を上昇させた(D)。hBMMS 共培養群に比べ SupSC 共培養群は CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup>Th17 細胞を有意に抑制した。また、hBMMS 共培養群に比べ上清中の IL-17 濃度を顕著に低下させた(E)。棒グラフは平均値±標準偏差を示す。\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.005$  (vs. ActiveT); ### $P<0.005$  (vs. hBMMS 共培養群)。n=5。

### §3-4. 小括

実験 I から以下のことが分かった。

1. SupSC は線維芽細胞様細胞で構成される付着性細胞集団、CFU-F を形成した。
2. SupSC が典型的な MSC 表面抗原プロファイルを示した。
3. *in vitro* 分化誘導実験から骨芽細胞／象牙芽細胞や脂肪細胞、内皮細胞、神経細胞に分化したことから、SupSC の多分化能が明らかとなった。
4. 皮下移植実験より、SupSC が象牙質／歯髄複合体および骨／骨髄ユニットを形成することから、*in vivo* 組織再生能を有する幹細胞集団であることが明らかとなった。
5. *in vitro* において高いポピュレーションダブリングや細胞増殖活性、テロメラーゼ

活性を示すこと、*in vivo* 連続移植法から SupSC が *in vivo* 組織再生能を維持していたことから、SupSC が優れた自己複製能力を備えていた。

6. SupSC は胚性幹細胞のマーカーおよび神経堤細胞のマーカーを強く発現しており、未熟な幹細胞集団であることが示唆された。
7. 単一コロニー由来細胞解析により、SupSC はヘテロジェニックな幹細胞集団であった。
8. 共培養実験系から、SupSC はヒト PBMNC の増殖抑制効果を示し、Treg への分化促進ならびに Th17 への分化抑制効果が認められ、SupSC が免疫細胞、特に T 細胞に対する調節能を備えていた。
9. 過剰歯髄において、初期の MSC マーカー STRO-1 および CD146 抗原陽性細胞が血管周囲に存在していたことから、SupSC の過剰歯髄における血管周囲ニッチが示唆された。

以上の結果から、正中過剰歯髄から、コロニー形成能、自己複製能、多分化能、組織再生能を有する間葉系組織幹細胞、過剰歯幹細胞が同定された。



### 表 3-1: Antibodies

CD3, Purified mouse IgG2a, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD3ε, Purified rat IgG2b K, anti-mouse, eBioscience (San Diego, CA)

CD4, PerCP-conjugated mouse IgG1 K/Rat IgG2a K, anti-human/anti-mouse, eBioscience (San Diego, CA)

CD8a, FITC-conjugated mouse IgG1/rat IgG2a, anti-human/anti-mouse, eBioscience (San Diego, CA)

CD14, R-PE-conjugated mouse IgG1, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD25, Purified mouse IgG1/rat IgG2b, anti-human/anti-mouse, APC-conjugated, eBioscience (San Diego, CA)

CD28, Purified mouse IgG1 K/golden sylian hamster IgG, anti-human/anti-mouse, eBioscience (San Diego, CA)

CD29, R-PE-conjugated mouse IgG1, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD31, Purified mouse IgG1 K, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD34, Purified mouse IgG1 K, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD45, Purified mouse IgG1 K, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD73, R-PE-conjugated mouse IgG1 K, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD90, Purified mouse IgG1 K, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD105, Purified mouse IgG1, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD146, R-PE-conjugated mouse IgG1 K, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

CD166, R-PE-conjugated mouse IgG1 K, anti-human, eBioscience (San Diego, CA)

Foxp3, PE-conjugated mouse IgG1/rat IgG2a K, anti-human/mouse, eBioscience (San Diego, CA)

glial fibrillary acidic protein, Purified mouse IgG1, anti-human, Sigma (St Louis, MO)

interferon  $\gamma$ , APC-conjugated mouse IgG1 K/rat IgG1 K, anti-human/anti-mouse, eBioscience (San Diego, CA)

interleukin 17A, R-PE-conjugated mouse IgG1 K/rat IgG2a K, anti-human/anti-mouse, eBioscience (San Diego, CA)

mitochondria, Purified mouse IgG1, anti-human, Millipore (Billerica, MA)

neurofilament M, Purified mouse IgG1, anti-human, Sigma (St Louis, MO)

SSEA4, Purified mouse IgG3, anti-human, Millipore (Billerica, MA)

tubulin  $\beta$ III, Purified mouse IgG2a, anti-human, Sigma (St Louis, MO)

APC: allophycocyanin

FITC: fluorescein isothiocyanate

PerCP: peridinin chlorophyll protein complex

R-PE: R-phycoerythrin

SSEA4: stage specific embryonic antigen 4

## 表 3-2: Human specific PCR primer pairs

*alkaline phosphatase (ALP)* (GenBank accession no. X14390)

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

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

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

sense: 5' -GGCAGTGA CTCAA AAGGAGC-3' (1630-1649)

antisense: 5' -TGCTGTCACTGTCACTGCTG-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)

*low-affinity neural growth factor (LNGFR)* (NM\_002507)

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

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

*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'-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC-3' (1613-1638)

*osteocalcin (OCN)* (X53698)

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

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

*peroxisome proliferator activated receptor-γ2 (PPARγ2)* (AB451337)

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

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

*RUNX2* (L40992)

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

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