

骨組織上に播種した歯髓幹細胞は歯根膜関連遺伝子を発現する：接触する基質の硬さが細胞分化に及ぼす影響

吉田, 晋一郎
九州大学病院歯内治療科

和田, 尚久
九州大学病院口腔総合診療科

長谷川, 大学
九州大学病院歯内治療科

御手洗, 裕美
九州大学病院口腔総合診療科

他

<https://hdl.handle.net/2324/7173459>

出版情報：The Japanese Journal of Conservative Dentistry. 61 (6), pp.343-353, 2018-12. 日本歯内療学会
バージョン：
権利関係：© 2018 The Japanese Journal of Conservative Dentistry



骨組織上に播種した歯髄幹細胞は歯根膜関連遺伝子を発現する

—接触する基質の硬さが細胞分化に及ぼす影響—

吉 田 晋一郎¹ 和 田 尚 久² 長谷川 大 学¹
御手洗 裕 美² 有 馬 麻 衣³ 友 清 淳¹
濱 野 さゆり^{3,4} 杉 井 英 樹¹ 前 田 英 史^{1,3}

¹九州大学病院歯内治療科²九州大学病院口腔総合診療科³九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯科保存学研究分野⁴九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター

抄録

目的：重篤な歯周炎や外傷などのケースにおいては、歯槽骨を含め歯の支持組織である歯根膜組織の破壊が進む。ゆえに、歯根膜組織再生を誘導することができる細胞移植を用いた新規歯周組織再生療法の開発が望まれている。歯髄組織には歯髄幹細胞が豊富に含まれており、再生医療の現場では重要な細胞源として注目されている。近年、間葉系幹細胞は接する基質の硬さにより分化の運命が方向づけられるとの報告がされている。そこで本研究では、歯根膜スペースへ移植した歯髄細胞が、接する基質の硬さを触知して歯根膜様細胞分化を遂げる能力を有する可能性を考え、歯周組織を再生させる細胞源としての有用性について検討することとした。

材料と方法：ヒト歯髄細胞およびヒト歯根膜細胞は、全身疾患を有さない抜歯目的の患者より抜去した歯から単離し、またヒト歯髄幹細胞およびヒト歯根膜幹細胞は、それぞれヒト歯髄細胞およびヒト歯根膜細胞から single colony selection により単離して用いた。各種遺伝子発現を、定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。骨芽細胞・脂肪細胞および軟骨細胞誘導実験は、alizarin red S 染色, oil red O 染色および alcian blue 染色によって評価した。細胞表面抗原の発現を、フローサイトメーターを用いて測定した。健全なブタ下顎骨から縦 10 mm×横 10 mm×高さ 3 mm に整形したブタ顎骨スライスを採取し、実験に用いた。ラット GFP 発現歯髄細胞の歯根膜組織へのホーミングについて、ラット第一臼歯の意図的再植時に、抜歯窩へ細胞移植を行い、免疫組織化学的染色法を用いて解析した。

成績：ヒト歯髄細胞とヒト歯根膜細胞における歯根膜関連因子の遺伝子発現を比較した結果、ヒト歯根膜細胞において有意な高発現を認めた。ヒト歯髄幹細胞およびヒト歯根膜幹細胞は、多分化能を示す幹細胞マーカーを高発現していた。また、ヒト歯髄細胞およびヒト歯根膜細胞と同様に、ヒト歯髄幹細胞と比較してヒト歯根膜幹細胞は歯根膜関連遺伝子の高発現を認めた。ブタ顎骨スライス上でヒト歯髄幹細胞を培養した結果、歯根膜関連遺伝子発現は、培養ディッシュ上で培養した歯髄幹細胞と比較して有意に上昇しており、その発現量はヒト歯根膜幹細胞と同等であった。加えて、抜歯窩に移植したラット GFP 発現歯髄細胞は、再植歯周囲の歯根膜組織内に多く生着していることが認められた。

結論：ヒト歯髄幹細胞を骨基質上で培養すると歯根膜関連遺伝子発現が上昇し、歯根膜組織を再生させる細胞源として有用である可能性が示唆された。

キーワード：歯髄幹細胞、歯根膜組織再生、細胞外基質

責任著者連絡先：和田尚久

〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学病院口腔総合診療科

TEL : 092-642-6523, FAX : 092-642-6525, E-mail : wada@dent.kyushu-u.ac.jp

受付：平成 30 年 8 月 24 日/受理：平成 30 年 10 月 29 日

DOI : 10.11471/shikahozon.61.343

緒 言

歯根膜組織はセメント質と歯槽骨の間に介在する線維性結合組織であり、歯を支持するだけでなく、感覚受容や周囲組織への栄養供給などにおいても重要な役割を果たしている^{1,2)}。歯を喪失する主な要因として挙げられる、歯の破折や歯周炎が重症化したケースにおいては、歯根膜組織をはじめ歯槽骨およびセメント質を含めた歯周組織が破壊されるため³⁾、enamel matrix derivative^{4,5)}や basic fibroblast growth factor^{6,7)}などを用いたいくつかの歯周組織再生法が確立されている。しかしながら、ひとたび喪失した歯根膜組織を効率よく再生することは困難を極めるため、それを企図した歯根膜細胞や種々の成長因子を用いた研究が行われているが、現在にいたるまで有効な歯根膜再生療法は確立されていない。近年、ヒト歯根膜組織は多分化能を有する幹細胞集団を有しており、それら歯根膜幹細胞が歯根膜組織再構成に有用であることが報告された⁸⁾。われわれの研究グループにおいても、ヒト歯根膜細胞に simian virus40 T-antigen (SV40T-ag) と human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) を遺伝子導入させることにより、世界で初めてヒト不死化歯根膜細胞株の樹立に成功した⁹⁾。さらに、ヒト不死化歯根膜細胞株を免疫不全マウスへ移植した結果、歯根膜様構造物を形成することを報告している¹⁰⁾。しかしながら、歯根膜幹細胞は抜去した歯の歯根表面の歯根膜組織から採取しなければならず、十分量の細胞数を獲得できないケースが多い。

歯髄幹細胞は、脱落乳歯や智歯などの歯髄組織から比較的簡便に単離することができ、十分量の細胞数を獲得できる方法がすでに確立されている¹¹⁾。また高い自己複製能をもち、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞および神経細胞に分化できると報告されている^{12,13)}。さらに歯髄幹細胞は、不要となった脱落歯や抜去歯から歯髄組織採取後に単離するため、細胞源としてほかの組織から間葉系幹細胞を採取するより低侵襲であることから、現在、歯科領域のみならず再生医療研究全域において有用な細胞源として注目されている。

従来、組織再生には、幹細胞・足場材および増殖因子の3要素が不可欠とされているが¹⁴⁾、近年 Engler らは、間葉系幹細胞を軟らかい (0.1~1 kPa) 基質上で培養した場合は神経細胞へ、硬い (25~40 kPa) 基質上で培養した場合は骨芽細胞へ、そしてその中間の硬さ (8~17 kPa) の基質上で培養した場合は筋芽細胞へと分化することを報告し、間葉系幹細胞が接している細胞外基質の硬さを感知して細胞分化の方向を決定することが明らかとなった¹⁵⁾。このことから、歯髄幹細胞を歯根膜組織の

位置する歯根と歯槽骨の間に移植すると、歯髄幹細胞が両者の基質の硬さの違いを感知して、歯髄幹細胞の歯根膜細胞様細胞分化が誘導され、歯根膜組織形成を誘導することができるのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では、骨基質上での細胞培養がヒト歯髄幹細胞の歯根膜細胞分化に及ぼす影響について解析するとともに、ラットを用いた歯の意図的再植モデルを作製し、抜歯窩に移植した歯髄細胞が宿主の歯根膜組織内に生着するか検討することとした。

材料および方法

1. ヒト歯髄細胞、ヒト歯根膜細胞、ヒト歯髄幹細胞クローン、ヒト歯根膜幹細胞クローンの単離

ヒト歯髄細胞およびヒト歯根膜細胞は、抜歯を目的として九州大学大学院口腔外科を受診した3名の患者 (3Q: 21歳女性, 3R: 24歳男性, 3T: 20歳女性) の第三大臼歯および第二小臼歯から、また、ヒト歯髄幹細胞およびヒト歯根膜幹細胞は1名の患者 (4A: 22歳女性) から同意を得た後、第一小臼歯を抜歯し、これまでの報告を参考にした方法で単離した^{16,17)}。細胞は、37°C、5% CO₂、湿度100%条件下で、50 µg/ml ストレプトマイシンならびに 50 U/ml ペニシリン (Gibco-BRL, USA) 含有の alpha-minimum essential medium (α-MEM, Gibco-BRL) に 10% ウシ胎児血清 (FBS, Gibco-BRL) を添加した培地 10% FBS/α-MEM (CM, control medium) で培養した。ヒト歯髄細胞およびヒト歯根膜細胞は、4~6 継代培養したものを本実験に用いた。ヒト歯髄幹細胞およびヒト歯根膜幹細胞は、同様の条件下で培養した細胞クローン (ヒト歯髄幹細胞クローン: DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9, ヒト歯根膜幹細胞クローン: PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) を本実験に用いた。すべての実験は、九州大学大学院歯学研究院生命倫理委員会の承認の下 (承認番号 20A-3) で行った。

2. 定量的 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

Total RNA は、TRI Reagent (コスモバイオ) を用いて回収した。Total RNA に EXScript RT Reagent kit (タカラバイオ) の反応液 (5×PrimeScript Buffer, PrimeScript RT Enzyme Mix 1, Oligo DT Primer および Random 6 mers) を添加し、37°C 15 分、次いで 85°C 5 秒間加熱し逆転写反応を行い、First-strand cDNA を合成した。First-strand cDNA に SYBR Green II (タカラバイオ) 含有の反応液を加え、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を用いて解析した。95°C で 10 秒間加熱した後、95°C 5 秒、60°C 30 秒のサイクル

で DNA の増幅を 40 サイクル行った。内部標準遺伝子である *human beta-actin* (β -*actin*) をコントロールとし、delta-delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) 値にて目的遺伝子の発現量解析を行った。プライマー配列としては、*Periostin* (*POSTN*); sense, CACAACCTGGAGACTGGACA and antisense, TGCTTCCTTGTGTGGTCTTT, *Collagen Type 1* (*Col-1*); sense, CCCGGGTTTCAGAGACAACCTC and antisense, TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC, *alpha smooth muscle actin* (α -*SMA*); sense, GACAATGGCTCTGGGCTCTGTAA and antisense, CTGTGCTTCGTCACCCACGTA, β -*actin*; sense, ATTGCCGACAGGATGCAGA and antisense, GAGTACTTGCGCTCAGGAGGA を用いた。

3. 各種分化実験 (骨芽細胞誘導, 脂肪細胞誘導, 軟骨細胞誘導)

各種分化誘導実験は過去の報告を参考に行った¹⁸⁾。骨芽細胞誘導は、各細胞クローンを 24 ウェル細胞培養プレート (2×10^4 細胞/ウェル, Becton Dickinson Labware, USA) に播種し、2 mmol/l β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, USA), 50 μ g/ml ascorbic acid (ナカライテスク) および 0.1 mol/l dexamethasone (Merck Millipore, Germany) を 10% FBS/ α -MEM に添加した培地 (骨芽細胞誘導培地) にて培養した。2 日ごとに培地を半量交換し、3 週間培養後 alizarin red S (Sigma-Aldrich) 染色を行った。

脂肪細胞誘導は、各細胞クローンを 48 ウェル細胞培養プレート (1×10^4 細胞/ウェル, Becton Dickinson Labware) に播種し、0.5 mmol/l methylisobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich), 0.5 μ mol/l hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 60 μ mol/l indomethacin (Sigma-Aldrich) および 100 μ mol/l ascorbic acid (ナカライテスク) を 10% FBS/ α -MEM に添加した培地 (脂肪細胞誘導培地) にて培養した。2 日ごとに培地を半量交換し、4 週間培養後 oil red O (Sigma-Aldrich) 染色を行った。

軟骨細胞誘導は、各細胞クローン (2.5×10^5 細胞/15 ml 遠沈管) を遠心分離 (150 $\times$ g/5 min) して生じた細胞塊を、10 ng/ml の TGF- β 3 (R & D Systems, USA) を添加した軟骨細胞誘導培地 (Lonza Group, Switzerland) にて培養した。2 日ごとに培地を半量交換し、4 週間培養後、4% paraformaldehyde (PFA, Merck Millipore) を用いて細胞を固定し、パラフィン包埋を行った。5 μ m の薄切切片を作製し、alcian blue (Sigma-Aldrich) 染色を行った。

4. フローサイトメトリー分析法

細胞表面抗原の発現は過去の報告に準じて¹⁸⁾、フローサイトメーター (EC800 Cell Analyzer, ソニー) および測定ソフト (Eclipse software, ソニー) を用いて行っ

た。各細胞クローンを、0.05% Trypsin および 0.02% EDTA 含有の PBS を用いて剥離し、単一の浮遊細胞にして flow cytometry staining buffer (FCSB, R & D Systems) を用いて洗浄した。その後、細胞 (5×10^5 /チューブ) を各種間葉系幹細胞マーカーに特異的な抗体 (10 ng/ml) あるいはアイソタイプコントロール抗体 (10 ng/ml) とともに、氷上で 1 時間培養した。抗体には、PE 標識マウス抗 CD73 IgG1 抗体 (eBioscience, USA), PE 標識マウス抗 CD90 IgG1 抗体 (iCyt, USA), PE 標識マウス抗 CD105 IgG1 抗体 (eBioscience), PE 標識マウス抗 CD146 IgG2 抗体 (iCyt), PE 標識マウス抗 CD166 IgG1 抗体 (BD Bioscience, USA) および PE 標識マウス IgG1 アイソタイプコントロール (eBioscience) を用いた。FCSB にて洗浄した後、EC800 cell analyzer にて解析を行った。

5. ブタ顎骨スライス上での歯髄幹細胞の培養

冷凍保存した健全なブタ下顎骨の歯槽骨を、ダイヤモンドブレード (マルトー) を装着した試料切断機 (マルトー) を用いて、縦 10 mm $\times$ 横 10 mm $\times$ 厚さ 3 mm に整形し、顎骨スライスを作製した。作製した顎骨スライスは、70% エタノールで 12 時間、PBS で 1 時間、17% EDTA (pH 7.4) で 10 分、滅菌蒸留水で 15 分処理したものを実験に使用した。24 ウェル細胞培養プレート (Becton Dickinson Labware) を用いて歯髄幹細胞 (2×10^4 細胞) を顎骨スライス海綿骨上に播種し、10% FBS/ α -MEM にて 2 週間培養した後、Total RNA を回収した。なお比較対照群として、顎骨スライスを用いずに培養した歯髄幹細胞および歯根膜幹細胞 (4A-4) を用いた。

6. 抜歯窩に移植した GFP 発現歯髄細胞のホーミング

全身の組織細胞において、CAG プロモーターにより EGFP を発現する 4 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD)-Tg (CAG-EGFP) ラット (日本エスエルシー) の下顎切歯から歯髄組織を採取し、これまでの報告を参考にラット GFP 発現歯髄細胞を単離した¹²⁾。4 週齢の雄性 SD ラット (九動) 4 匹の腹腔内に 2 mg/kg midazolam (サンド), 0.15 mg/kg medetomidine hydrochloride (共立製薬) および 2.5 mg/kg butorphanol tartrate (Meiji Seika ファルマ) を混合させた麻酔薬 (三種混合麻酔薬) を投与し、上顎右側第一臼歯を抜歯した。抜歯した歯の歯根膜組織は、No. 15 メス (貝印) を用いて可及的に除去した。GFP 発現歯髄細胞 (2.5×10^5) をコラーゲンゲル (Cellmatrix, 新田ゼラチン) を担体として抜歯窩に移植後、第一臼歯をすみやかに再植した。4 週間飼育後、4% PFA (Merck Millipore) にて灌流固定し、上顎骨を摘出した。摘出した試料は 10% EDTA (富士フィルム和光純薬) で 4 週間の脱灰後、パラフィン包埋を行い、5 μ m の薄切切片を作製した。非特異的に反応するタン

パクを2%のウシ血清アルブミン (BSA, ナカライテスク) で1時間ブロッキングした後, 一次抗体としてウサギ抗 GFP 抗体 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA) を用い, 二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗 IgG 抗体 (ニチレイバイオサイエンス) と1時間反応させ, DAB 試薬 (ニチレイバイオサイエンス) を用いて染色を行った. すべての実験は九州大学大学院歯学研究院生命倫理委員会 (承認番号 30-51) および九州大学動物実験委員会の承認の下 (承認番号 A-30-226-0) で行った.

7. 統計学的解析

ヒト歯髄細胞とヒト歯根膜細胞における歯根膜関連遺伝子発現量に対して, Student's *t* 検定による統計処理を行った. ヒト歯髄幹細胞クローンおよびヒト歯根膜幹細胞クローンの歯根膜関連遺伝子発現量については, 二元配置分散分析法を用いて統計処理を実施した. 有意水準 5% 未満で統計学的有意差ありとした.

結 果

1. ヒト歯髄細胞およびヒト歯根膜細胞における歯根膜関連因子の遺伝子発現比較

ヒト歯髄細胞とヒト歯根膜細胞における歯根膜関連遺伝子発現を比較検討するために, 定量的 RT-PCR 法を行った. その結果, ヒト歯髄細胞 (DP-3Q, DP-3R, DP-3T) における *POSTN*, *Col-1* および α -SMA の遺伝子発現量は, 同じ提供者由来のヒト歯根膜細胞 (PDL-3Q, PDL-3R, PDL-3T) と比較してそれぞれ有意に低値を示した (Fig. 1).

2. ヒト歯髄幹細胞クローンおよびヒト歯根膜幹細胞クローンの分化能, 細胞表面抗原の発現および歯根膜関連遺伝子発現の解析

1) ヒト歯髄幹細胞クローンおよびヒト歯根膜幹細胞クローンの多分化能の解析

同一提供者由来のヒト歯髄組織ならびにヒト歯根膜組織から single colony selection により単離したヒト歯髄幹細胞クローン (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, および DPSC 4A-9), またヒト歯根膜幹細胞クローン (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, および PDLSC 4A-4) の多分化能を検討するため, 骨芽細胞・脂肪細胞ならびに軟骨細胞への分化誘導実験を行った. ヒト歯髄幹細胞クローン (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) およびヒト歯根膜幹細胞クローン (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) を骨芽細胞誘導培地にて3週間培養した結果, すべてのクローンにおいて alizarin red S 染色陽性の沈着物を形成した (Fig. 2A). また, 脂肪細胞誘導培地にて4週間培養した結果, ヒト歯髄幹細胞クローン (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) およびヒト歯

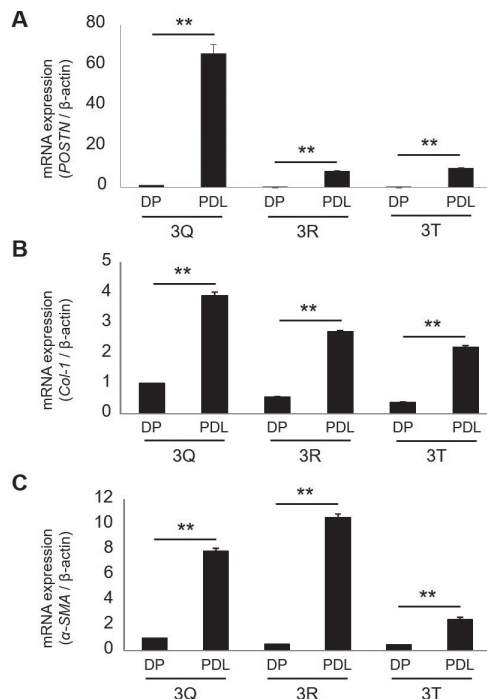


Fig. 1 The expression of PDL-related genes in human dental pulp (DP) cells (DP-3Q, DP-3R, DP-3T) and human periodontal ligament (PDL) cells (PDL-3Q, PDL-3R, PDL-3T)

(A-C) Quantitative RT-PCR was performed to analyze the mRNA expression of PDL-related genes *POSTN* (A), *Col-1* (B) and α -SMA (C) in DP and PDL cells. All values are means $\pm$ SD (error bars) of triplicate assays. **: $p < 0.01$.

根膜幹細胞クローン (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) すべてにおいて oil red O 染色陽性の脂肪滴を形成した (Fig. 2B). さらに軟骨細胞誘導培地にて4週間培養した結果, すべてのクローンにおいて alcian blue 染色陽性の軟骨様基質を形成した (Fig. 2C).

2) ヒト歯髄幹細胞クローンおよびヒト歯根膜幹細胞クローンにおける細胞表面抗原の発現解析

ヒト歯髄幹細胞クローン (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) およびヒト歯根膜幹細胞クローン (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) における間葉系幹細胞マーカーの発現を検討するため, フローサイトメトリ分析を行った. すべての細胞クローンにおいて, 間葉系幹細胞マーカーとして知られている CD73, CD90, CD105, CD146, および CD166 発現細胞が非常に高い割合で検出された (Fig. 2D).

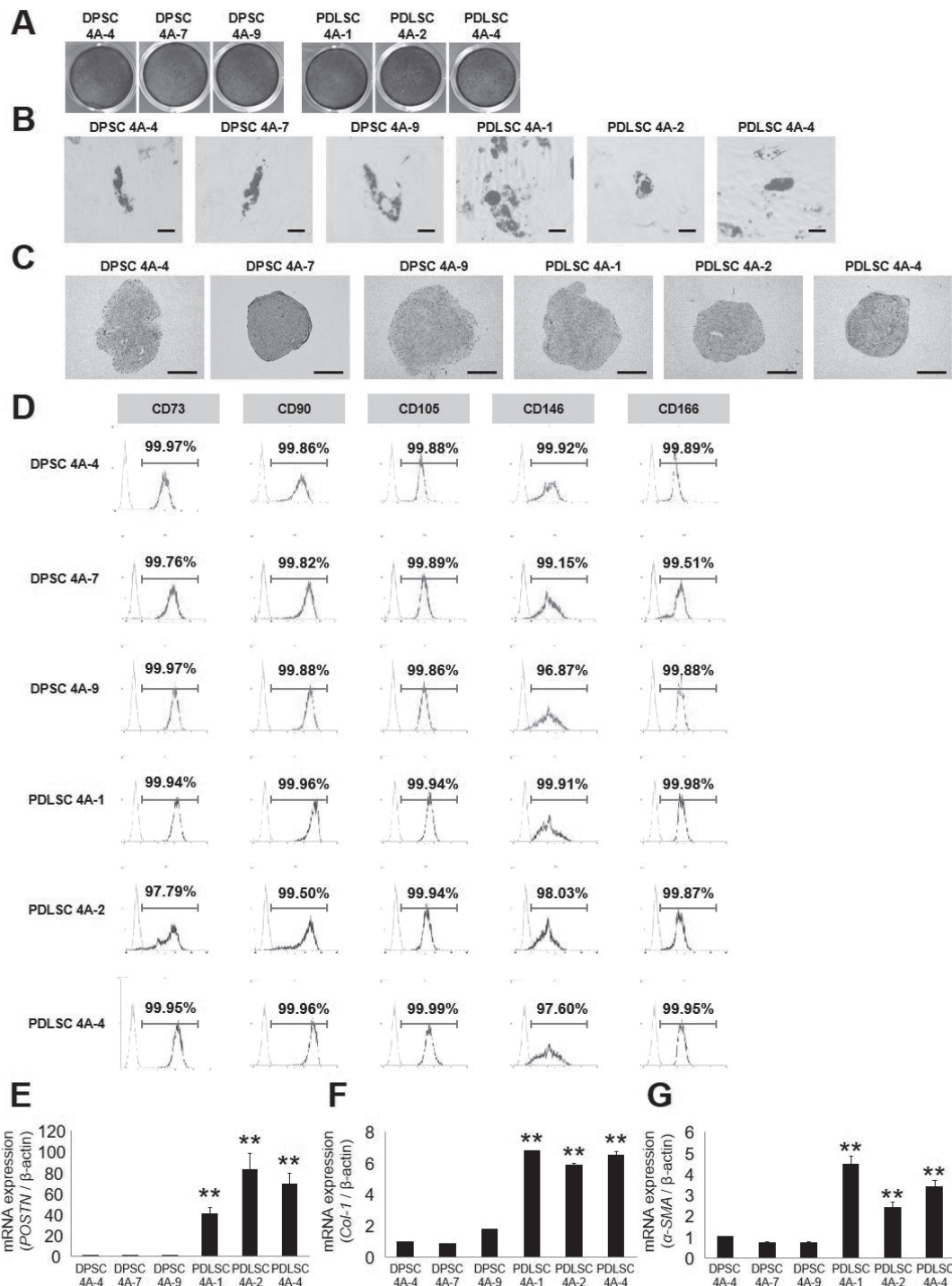


Fig. 2 The characterization of dental pulp stem cell (DPSC) and periodontal ligament stem cell (PDLSC) clones

(A) alizarin red S staining of DPSC clones (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) and PDLSC clones (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) cultured under osteogenic inductive conditions in 24-well plates for 4 weeks. (B) oil red O staining of DPSC clones (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) and PDLSC clones (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) cultured under adipogenic inductive conditions in 48-well plates for 4 weeks. Bars=200 μ m. (C) alcian blue staining of DPSC clones (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) and PDLSC clones (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) cultured under chondrogenic inductive conditions in 15 ml polypropylene tubes for 4 weeks. Bars=200 μ m. (D) The expression of cell surface antigens (CD73, CD90, CD105, CD146, and CD166) in DPSC clones (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) and PDLSC clones (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) was analyzed by flow cytometer. (E-G) Quantitative RT-PCR was performed to analyze the mRNA expression of PDL-related genes *POSTN* (E), *Col-1* (F) and *α-SMA* (G) in DPSC clones (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) and PDLSC clones (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4). All values are means $\pm$ SD (error bars) of triplicate assays. **: $p < 0.01$.

3) ヒト歯髄幹細胞クローンおよびヒト歯根膜幹細胞クローンにおける歯根膜関連遺伝子発現の検討

ヒト歯髄幹細胞クローン (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) とヒト歯根膜幹細胞クローン (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) における歯根膜関連遺伝子発現を比較検討するために、定量的 RT-PCR 法を行った。その結果、ヒト歯髄幹細胞クローン (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) における *POSTN*, *Col-1* および α -SMA の遺伝子発現量は、ヒト歯根膜幹細胞クローン (PDLSC 4A-1, PDLSC 4A-2, PDLSC 4A-4) と比較して有意に低値を示した (Fig. 2E~G)。

以上の結果より、ヒト歯髄幹細胞クローンおよびヒト歯根膜幹細胞クローンは多分化能を有し、間葉系幹細胞マーカーを発現することから、幹細胞様の特徴を有していることが確認された。また、それぞれヒト歯髄細胞およびヒト歯根膜細胞と同様の歯根膜関連遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった。

3. 骨基質上に播種した歯髄幹細胞クローンにおける歯根膜関連遺伝子発現の解析

骨基質上に播種することがヒト歯髄幹細胞クローンにおける歯根膜関連遺伝子発現に及ぼす影響について検討するため、ブタ顎骨スライス上でヒト歯髄幹細胞クローン (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) を培養後 Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法を行った。骨組織上に播種したヒト歯髄幹細胞クローン (DPSC 4A-4, DPSC 4A-7, DPSC 4A-9) は、培養ディッシュ上に播種した歯髄幹細胞クローンと比較して *POSTN*, *Col-1* および α -SMA の遺伝子発現量が有意に多かった (Fig. 3)。また、それらの遺伝子発現量は、ヒト歯根膜幹細胞クローン (PDLSC 4A-4) における発現量と同等であった。

4. 歯の再植時に抜歯窩へ移植したラット GFP 発現歯髄細胞の生着

損傷した歯根膜組織を再構築するための移植細胞源として、歯髄細胞の有用性を検討するために、ラットを用いた歯の再植実験モデルの抜歯窩に再植歯とともにラット GFP 発現歯髄細胞を移植し、免疫組織化学的染色法により、歯根膜組織への生着について検討した。その結果、細胞移植後 4 週の時点で歯は脱落しておらず (Fig. 4A)、再植歯周囲歯根膜組織内に移植した GFP 陽性歯髄細胞が多く生着していることが認められた (Fig. 4C~E)。一次抗体を用いていない陰性コントロール群においては、陽性反応が認められなかった (Fig. 4B)。

考 察

組織幹細胞は、1963 年に Becker らが骨髓から造血幹

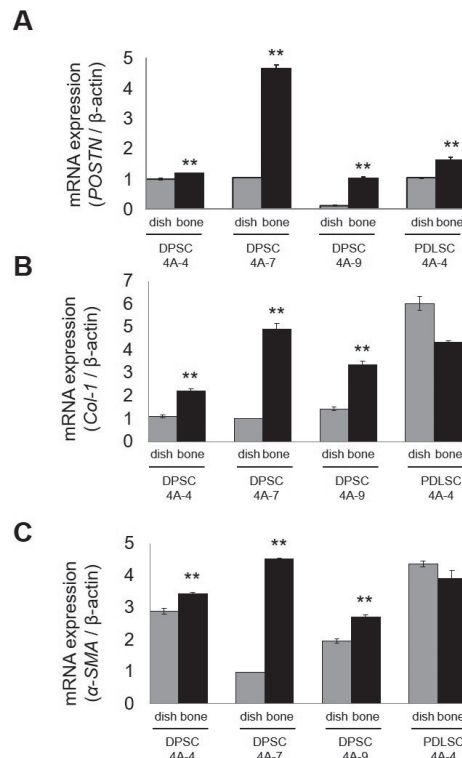


Fig. 3 The expression of PDL-related genes in DPSC clones cultured on bone slices (A-C) Quantitative RT-PCR was performed to analyze the mRNA expression of PDL-related genes *POSTN* (A), *Col-1* (B) and α -SMA (C) in DPSC cultured on bone slices for 2 weeks. DPSC clones cultured on plastic dishes and PDLSC clone were used as control. All values are means $\pm$ SD (error bars) of triplicate assays. **: $p < 0.01$.

細胞を発見して以来¹⁹⁾、さまざまな種類の組織幹細胞の存在についての報告がされている。なかでも間葉系幹細胞は骨、筋肉、脂肪そして血液など全身のさまざまな組織から採取することができ、自己複製能ならびに多分化能を有していることから、細胞を用いた組織工学ならびに組織再生の分野における細胞源として広く研究が行われている²⁰⁾。しかしながら組織幹細胞の細胞増殖能は限られており、臨床応用する場合には毎回の細胞採取と品質評価が求められるのが課題とされている。1981年にはマウス胚盤胞の内部細胞塊細胞から胚性幹 (ES) 細胞の樹立が報告され²¹⁾、1998年にはヒト胚盤胞からの ES 細胞の樹立が報告された²²⁾。ヒト ES 細胞は、多分化能に加えて無制限の細胞増殖能を有している一方で、ヒトの受精卵から細胞株を作るという点から生命倫理面に大きな問題を抱えている。また、ES 細胞から分化させた細胞を移植する際には免疫拒絶反応に対する対策も余儀なく

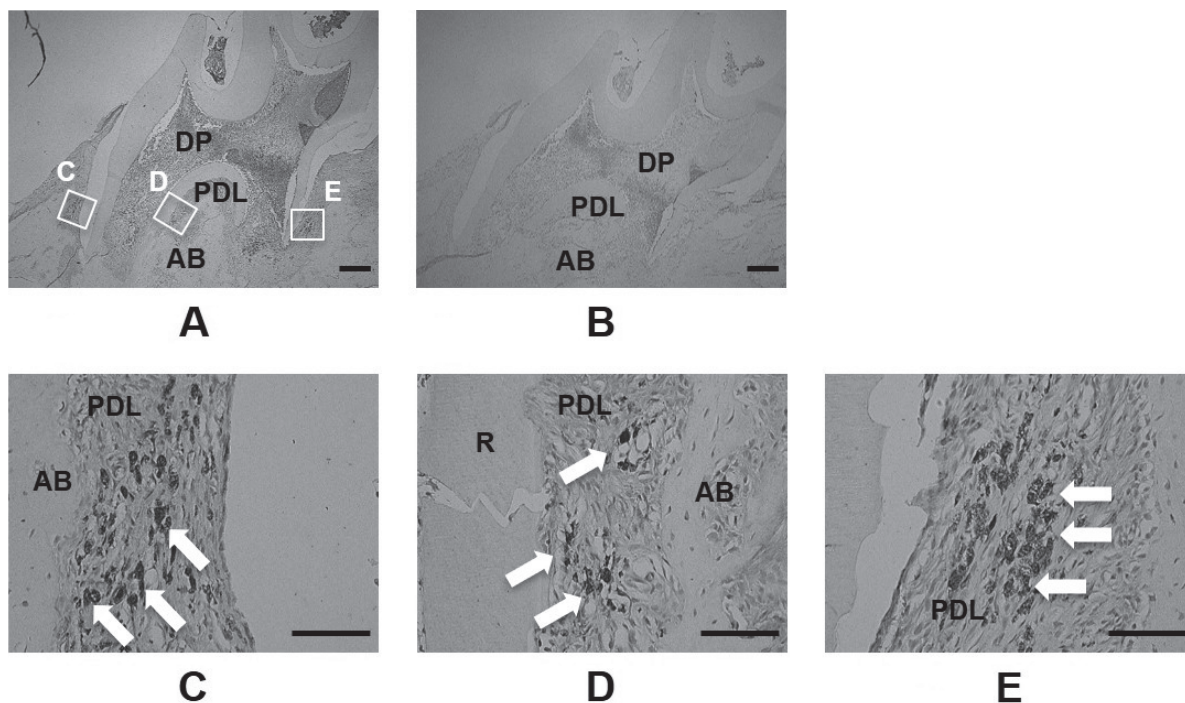


Fig. 4 Immunostaining of transplanted rat GFP-expressing DP cells in PDL tissue in tooth replantation model

(A-E) Immunohistochemical staining for GFP in upper first molar 4 weeks after tooth replantation. GFP expression was detected around tooth (A) while no expression was observed in B (control IgG : negative control). (C-E) Higher magnification of boxed area in A.

arrow : rat GFP-expressing DP cells, AB : alveolar bone, DP : dental pulp, PDL : periodontal ligament, R : root, Bars=100 μ m.

され、現在再生医療への応用にはいたっていない。ゆえに、これらの問題点を克服することのできる多能性幹細胞の開発を企図した多くの研究が行われ、2007年にはヒトの皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて4つの遺伝子を導入し、分化細胞を再プログラム化させた人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立が世界で初めて報告された²³⁾。ヒト iPS 細胞は、ES 細胞と同様に三胚葉系すべてへ分化することができる一方で、胚盤胞を使用せず患者自身の細胞から樹立することができ、ES 細胞の抱える問題点を克服していることから、現在幹細胞研究の分野において大きな注目を浴びている。しかし、移植した iPS 細胞塊の癌化やテラトーマ (奇形腫) 形成といった課題が多くあることから、最適な初期化因子の探索、遺伝子導入方法および分化誘導方法など、多能性幹細胞移植治療の実現に向けて国内外で研究が進められている。ゆえに、現在の臨床応用の主役は間葉系幹細胞をはじめとする組織幹細胞である。口腔領域においては近年、歯根膜幹細胞移植による歯周組織再生を企図した数多くの研究が進められている。われわれも歯根膜幹細胞を用いた歯周組織再生療法の確立を目的として、ヒト不死化歯根膜細胞株クローンの解析を進め、歯根膜幹細胞

が歯根膜組織再生能を有していることを報告している^{10,24)}。しかしながら歯根膜幹細胞は、健常歯根膜組織から十分量採取することが難しく、歯周組織再生の細胞源として用いることが困難であるケースも多い。一方、間葉系幹細胞の一つである歯髄幹細胞は、歯根膜幹細胞と比較して低侵襲で確実に単離することができる。また、現在では歯髄細胞バンクの事業化も進み、失った組織を再生させるための細胞源として歯髄幹細胞の有用性が注目されている。そこで本研究では、歯髄幹細胞に着目し、歯周組織再生における細胞源としての有用性について検討することとした。Col-1, POSTN, α -SMA は歯根膜組織に存在する細胞外基質タンパクとして知られており、歯根膜組織および歯根膜細胞に高く発現すると報告されている²⁵⁻²⁷⁾。これまでに Col-1 は歯根膜組織の線維構造の主を成し²⁵⁾、POSTN はコラーゲン線維形成を調節すること²⁶⁾、そして α -SMA を発現する歯根膜線維芽細胞は歯根膜の恒常性維持に働くことなどが明らかとなっている²⁷⁾。本研究においても、ヒト歯根膜細胞における Col-1, POSTN, α -SMA の遺伝子がヒト歯髄細胞と比較して高く発現していることが認められ、歯根膜細胞関連因子として有用であることが確認された。本研

究でヒト歯髄組織ならびにヒト歯根膜組織から single colony selection により単離した細胞クローンは、それぞれがヒト歯髄細胞もしくはヒト歯根膜細胞としての表現型を保持している一方で、多分化能を有し、さらに間葉系幹細胞マーカーの高発現を示したことから、間葉系幹細胞を用いた組織再生療法の細胞源として有用である可能性が示唆された。

失われた組織を再構築するためには、多分化能を有した幹細胞と、その幹細胞を標的組織由来の細胞へと分化誘導させるシグナル因子、そしてそれらを欠損部位へと移植する際の足場材が必要であると考えられている¹⁴⁾。これまでにさまざまなシグナル因子を用いた組織再生に関する研究が行われており、Growth and Differentiation Factors (GDFs) は、ラットの背面皮下移植モデルにおいて移植した担体周囲に腱様構造物を形成することが報告されている²⁸⁾。また、Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF/FGF-2) をビーグル犬の下顎 2 級分岐部病変に投与した結果、歯根膜組織と新生セメント質を伴った歯槽骨の回復が認められ、歯周組織再生を促進する因子としての有用性が示されている²⁹⁾。しかし、創傷治癒過程は止血、炎症、細胞増殖そして組織修復の 4 段階に分類され³⁰⁾、各過程においてさまざまな成長因子が影響を及ぼす³¹⁾ことが報告されていることから、単一の因子によって完全な組織修復を促すことは難しいと考えられる。

重度の歯周炎や、外傷に伴って生じた歯の破折により歯根膜組織が広範囲に損傷を受けた際に、効果的に歯周組織を再生することができる治療法は確立されていない。本研究は、外傷や歯の破折の症例を想定し、意図的再植法に準じた歯の再植時に細胞移植を行うことにより、歯の保存を図るとともに損傷した歯根膜組織が再生可能な新規歯周組織再生療法の開発を企図したものである。われわれは、重度の歯周炎や外傷により歯根膜組織が喪失した症例において、歯根膜スペースとなる歯根と歯槽骨の間に歯髄幹細胞を移植した際に、歯髄幹細胞が両者の基質の硬さを感知して歯髄細胞以外の細胞系統へ分化を遂げるのではないかと仮説を立てた。本研究では、歯周組織環境を *in vitro* 培養系で二次元的に再現するために、ブタの歯槽骨から顎骨スライスを作製し、顎骨スライス上で培養したヒト歯髄幹細胞における歯根膜関連遺伝子発現を検討した。その結果、顎骨スライス上で培養したヒト歯髄幹細胞における歯根膜関連遺伝子発現は、培養ディッシュ上で培養したコントロール群と比較して有意に上昇しており、その遺伝子発現量はヒト歯根膜幹細胞と比較して同等であった。以上の結果より、ヒト歯髄幹細胞を顎骨スライス上で培養すると、歯根膜関連遺伝子発現が上昇し、ヒト歯髄幹細胞の歯根膜細胞様細胞分化が促進されることが示唆された。しかしなが

ら、Engler らは硬い基質上で間葉系幹細胞を培養した結果、骨芽細胞様細胞分化が促進すると報告している¹⁵⁾。本研究においても、顎骨スライス上で培養したヒト歯髄幹細胞において bone sialoprotein, osterix および osteopontin などの骨関連遺伝子発現が上昇していることを確認した。幹細胞分化は細胞外基質に加えさまざまな成長因子によっても影響を受けることが報告されており³²⁾、歯槽骨表面に存在する線維芽細胞分化を促進させる成長因子などの存在や、ヒト歯髄幹細胞と歯根象牙質面との相互作用については明らかとなっていないため、さらなる詳細な検討が必要なものと考えられる。次に、歯髄細胞の移植細胞源としての有用性を検討するために、ラット上顎第一臼歯の意図的再植時にラット GFP 発現歯髄細胞を抜歯窩へ移植した。その結果、再植後 4 週の時点で歯の周囲歯根膜組織内に GFP 発現歯髄細胞が存在し、組織内に生着していることが確認された。これらの結果から、損傷した歯根膜組織を再生させるために細胞移植を応用した歯の意図的再植法を用いる場合、歯根膜組織と由来組織の異なる歯髄幹細胞を用いることができる可能性が示唆された。しかしながら、移植した GFP 陽性歯髄細胞が歯根膜細胞として機能しているのか、あるいは周囲の歯根膜細胞や歯根膜幹細胞にパラクライン的に作用して歯根膜組織の再構成に関与しているかは本研究では明らかとなっていないため、今後さらなる解析が必要である。また、移植細胞源となる歯髄細胞あるいは歯髄幹細胞は、患者自身の智歯や矯正治療に伴い便宜的に抜去した歯から採取し、細胞バンクに保存することにより自家移植が可能となる。今後は、同一個体から樹立したラット歯髄細胞あるいは歯髄幹細胞を用いて、同様に検討する予定である。

本研究の結果より、ヒト歯髄幹細胞は接する基質により分化の方向付けが変わり、ヒト歯髄幹細胞を骨基質上で培養すると歯根膜様細胞分化が促進することが示唆された。また、歯の意図的再植時に歯髄幹細胞を抜歯窩に移植すると、歯根膜組織の創傷治癒が促進する可能性が示唆された。

結 論

ヒト歯髄幹細胞を骨基質上で培養すると歯根膜様細胞分化が促進する。また、歯髄細胞は意図的再植時の移植細胞源として有用である。

本研究は JSPS 科研費 JP17K17136 の助成を受けたものである。

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 491-502.
- 2) Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000 1997; 13: 20-40.
- 3) Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366: 1809-1820.
- 4) Hammarström L, Heiji L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 669-677.
- 5) Heiji L, Heden G, Svärdröm G, Ostgren A. Enamel matrix derivative (EMDGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 705-714.
- 6) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal regeneration by FGF2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res* 2001; 80: 2075-2079.
- 7) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res* 2003; 38: 97-103.
- 8) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
- 9) Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y, Akamine A. Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T antigen and hTERT gene transfer. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 117-125.
- 10) Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 2008; 215: 743-749.
- 11) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13625-13630.
- 12) Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-535.
- 13) Grottkau BE, Purudappa PP, Lin YF. Multilineage differentiation of dental pulp stem cells from green fluorescent protein transgenic mice. *Int J Oral Sci* 2010; 2: 21-27.
- 14) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
- 15) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126: 677-689.
- 16) Wada N, Maeda H, Tanabe K, Tsuda E, Yano K, Nakamura H, Akamine A. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Periodontal Res* 2001; 36: 56-63.
- 17) Yoshida S, Wada N, Hasegawa D, Miyaji H, Mitarai H, Tomokiyo A, Hamano S, Maeda H. Semaphorin 3A induces odontoblastic phenotype in dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2016; 95: 1282-1290.
- 18) Wada N, Maeda H, Hasegawa D, Gronthos S, Bartold PM, Menicanin D, Fujii S, Yoshida S, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Semaphorin 3A induces mesenchymal-stem-like properties in human periodontal ligament cells. *Stem Cells Dev* 2014; 23: 2225-2236.
- 19) Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197: 452-454.
- 20) Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 32-45.
- 21) Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
- 22) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
- 23) 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* 2007; 131: 861-872.
- 24) Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Wada N, Shima K, Akamine A. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Differentiation* 2008; 76: 337-347.
- 25) Romanos GE, Schroter-Kermani C, Hinz N, Wachtel HC, Bernimoulin JP. Immunohistochemical localization of collagenous components in healthy periodontal tissues of the rat and marmoset (*Callithrix jacchus*). I. Distribution of collagen types I and III. *J Periodontal Res* 1992; 27: 101-110.
- 26) Norris RA, Damon B, Mironov V, Kasyanov V, Ramamurthi A, Moreno-Rodriguez R, Trusk T, Potts JD, Goodwin RL, Davis J, Hoffman S, Wen X, Sugi Y, Kern CB, Mjaatvedt CH, Turner DK, Oka T, Conway SJ, Molkentin JD, Forgacs G, Markwald RR. Periostin regu-

- lates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem* 2007; 101: 695-711.
- 27) Arora PD, McCulloch CA. Dependence of collagen remodeling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 1994; 159: 161-175.
- 28) Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney JM, Rosen V. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factor 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest* 1997; 100: 321-330.
- 29) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okaba H. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regenerations in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res* 2003; 38: 97-103.
- 30) Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg* 2004; 28: 321-326.
- 31) Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89: 219-229.
- 32) Engler AJ, Sweeney HL, Discher DE, Schwarzbauer JE. Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 4: 335.

Dental Pulp Stem Cells on Bone Tissue Express Periodontal Ligament-related Gene

—The Effect of Matrix Elasticity on Cellular Differentiation—

YOSHIDA Shinichiro¹, WADA Naohisa², HASEGAWA Daigaku¹,
MITARAI Hiromi², ARIMA Mai³, TOMOKIYO Atsushi¹,
HAMANO Sayuri^{3,4}, SUGII Hideki¹ and MAEDA Hidefumi^{1,3}

¹Division of Endodontology, Kyushu University Hospital, Kyushu University

²Division of General Dentistry, Kyushu University Hospital, Kyushu University

³Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University

⁴OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University

Abstract

Purpose: In severe cases of periodontitis or dental trauma, periodontal tissues including alveolar bone and periodontal ligament (PDL) are destroyed, and so novel therapy by cell implantation to reconstruct the damaged periodontal tissue is strongly required. Human dental pulp (DP) tissue, which has an abundant population of DP stem cells (DPSC), is believed to be a promising source of cells for regenerative medicine in various medical fields. Recently, matrix elasticity has been shown to regulate the differential fate of stem cells. Therefore, in the present study, we investigated whether DPSCs could convert to PDL-like cells by perceiving matrix elasticity, and possess the potential to regenerate periodontal tissues.

Method: Primary human DP cells, PDL cells, DPSCs and PDL stem cells (PDLSCs) were isolated from healthy patients. Gene expression was analyzed by quantitative RT-PCR. Osteogenic, adipogenic and chondrogenic induction assays were examined by alizarin red S staining, oil red O staining and alcian blue staining, respectively. Expression of cell surface markers was analyzed using a flow cytometer. Bone slices (depth 10 mm×width 10 mm×height 3 mm) were created from mandibular bone of healthy swine. Rat GFP-expressing DP cells were transplanted in the tooth socket of a rat tooth replantation model, and homing of transplanted DP cells in PDL tissue was investigated by immunohistochemical staining.

Results: Primary PDL cells showed higher expression levels of PDL-related markers such as *Periostin*, *Col-1*, and α -SMA than those of primary DP cells by quantitative RT-PCR. DPSCs and PDLSCs showed pluripotency, and also expressed mesenchymal stem cell markers, such as CD73, CD90, CD105, CD146, and CD166 similarly to PDLSCs examined by flow cytometric analysis. PDLSCs also highly expressed *Periostin*, *Col-1*, and α -SMA compared to DPSCs by quantitative RT-PCR. DPSCs cultured on bone slices for 2 weeks enhanced gene expression of *Periostin*, *Col-1*, and α -SMA at similar levels to PDLSCs. In addition, transplanted rat GFP-positive DP cells were detected in PDL tissue around the replanted tooth in the rat tooth replantation model.

Conclusion: DPSCs cultured on bone tissue increased the expression of PDL-related genes, suggesting that DPSCs might be a useful source of cells for PDL tissue regeneration.

Key words: dental pulp stem cell, regeneration of periodontal ligament, extracellular matrix

Corresponding author: Dr. WADA, Division of General Dentistry, Kyushu University Hospital, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

TEL: +81-92-642-6523, FAX: +81-92-642-6525, E-mail: wada@dent.kyushu-u.ac.jp

Received for Publication: August 24, 2018/Accepted for Publication: October 29, 2018