

## 学 位 論 文 内 容 の 要 約

愛知学院大学

甲 第 656 号	論文提出者 堀部 宏茂
論 文 題 目  若齢と同様に高い血管新生能および歯髄再生能を有するヒト高齢歯髄幹細胞の分取	

## I. 緒 言

間葉系幹細胞は生体恒常性維持および組織修復/再生に関与し、様々な疾病や外傷などの組織損傷に対しての治療応用に大きな役割を果たす。組織工学と再生医療に間葉系幹細胞を適用するためには、安定した細胞表現型を示す間葉系幹細胞分取や培養をおこなうことが重要である。さらに、間葉系幹細胞の老化が形質にどう影響を与えるかについても明らかにする必要がある。高齢間葉系幹細胞については量(増殖能)、質(分化能/再生能)、遊走能など若齢の間葉系幹細胞と比較して幹細胞形質が劣る。ところが特殊な幹細胞分取法や培養条件下では、高齢の間葉系幹細胞でも、若齢と比較して幹細胞形質が変わらないという報告がある。また最近開発された遊走因子 (G-CSF) により遊走分離した膜分取歯髄幹細胞は、血管新生/神経栄養因子の高い発現がみられ、また増殖促進、遊走促進、免疫調整や抗アポトーシス作用を有する高い trophic 効果および血管新生、神経原性および再生能を示す幹細胞集団であることがわかった。

本研究では、細胞表現型の安定性を含む分子生物学的特性や長期継代培養下での老化マーカーの発現を高齢の膜分取歯髄幹細胞と若齢の膜分取歯髄幹細胞で比較した。加えて、再生能を下肢虚血モデルや異所性歯根移植モデルにおいて検討した。

## II. 材料および方法

### 1. 若齢者および高齢者より歯髄幹細胞分取

本研究は愛知学院大学および国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を得て行った。高齢者(44-70 歳)および若齢者(21-30 歳)の第 3 大臼歯を抜歯し、即座に歯髄組織を摘出し、37℃で 1 時間 0.04mg/ml リベラーゼ溶液で酵素消化して歯髄細胞を分離し、10%ヒト血清含有の DMEM 培地に  $2-4 \times 10^4$  の細胞数で 35mm ディッシュ上に播種した。

膜分取歯髄幹細胞は上部構造（セルカルチャー・インサート）を、下部構造（24 well plate）に挿入した膜遊走分取器を用いた。この膜上部に、ヒト 3 代目歯髄細胞を  $2 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l、播種し、下部構造体の 24 well 中に 10%ヒト血清を含む DMEM 中に遊走因子 G-CSF を最終濃度で 100 ng/ml 入れ、48 時間後に G-CSF を取り除き、10%ヒト血清を含む DMEM に培地交換した。分取効率は 24 well 下部に付着した細胞数を位相差顕微鏡下で測定し算出した。さらに培養して、70 %コンフルエント後に継代した。コントロールとして、ヒト 3 代目歯髄細胞を  $1 \times 10^3$  cells/ml で 10%ヒト血清を含む DMEM 中で 10 cm dish に播種して、コロニーを形成させたものを、未分取歯髄幹細胞として用いた。

## 2. 細胞表面マーカー発現

膜分取した上記歯髄幹細胞を 6 代継代後、フローサイトメトリーを用いて、幹細胞表面抗原マーカー発現率を測定した。幹細胞マーカー抗体として CD29、CD31、CD44、CD73、CD90、CD105、CD146、CXCR4 および G-CSFR を用いた。コントロールとして、6 代継代後のヒト高齢歯髄組織由

来のコロニー形成法による未分取歯髄幹細胞およびヒト若齢歯髄組織由来の膜分取歯髄幹細胞および未分取歯髄幹細胞を用いた。

### 3. Real-time RT-PCR 解析

ついで、上記歯髄幹細胞の 6 代目の幹細胞マーカー、血管誘導・神経栄養因子の real time RT-PCR を Light Cycler にて行った。幹細胞マーカーとして *Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2*、*Rex1*、*Stat3* および *CXCR4*、血管誘導・神経栄養因子として *GM-CSF*、*MMP-3*、*VEGF-A*、*BDNF*、*GDNF*、*NGF*、*NT-3* のプライマーを用い、*β-actin* で標準化した。

### 4. 多分化能

高齢および若齢の膜分取および未分取歯髄幹細胞の多分化能（血管誘導能、神経誘導能、脂肪誘導能、骨・象牙質誘導能）を行った。さらに分子生物学的に解析するために神経誘導マーカー、脂肪誘導マーカー、骨・象牙質誘導マーカーの mRNA 発現を RT-PCR にて解析を行った。

### 5. 増殖能および遊走能

増殖能、遊走能を高齢者および若齢者膜分取および未分取歯髄幹細胞で比較した。増殖能については、5 代目を 96 well に  $3 \times 10^3$  cells/100μl で播種し、G-CSF (終濃度 100ng/ml) を培地に添加した。細胞数は 450nm の吸光度をプレートリーダーにて経時的に測定した。細胞を含有しない well を negative control とした。遊走能については、real time 水平化学走化性分析を TAXIScan-FL を用いて行った。すなわち、チャンネル内の一端に細胞 ( $10^5$

cells/ml を 1 $\mu$ l) を注入し、10 ng/ $\mu$ l の G-CSF を一定濃度勾配を形成させるように 1  $\mu$ l 反対側に入れた。遊走の video 像から、3 時間ごとの遊走細胞数を 24 時間まで計測した。

## 6. 歯髄幹細胞の培養上清の trophic 効果

高齢および若齢の膜分取および未分取歯髄幹細胞を、60% コンフルエントの状態にて無血清培地に変え、24 時間後、培養上清を回収した。その上清を遠心式限外ろ過フィルターユニットにて約 40 倍に濃縮した。

培養上清の増殖促進作用および遊走促進作用に関しては、NIH3T3 細胞を用いて、培養上清をそれぞれ終濃度 5  $\mu$ g/ml 入れ、上記と同様の方法にて測定した。抗アポトーシス効果に関しては、NIH3T3 細胞を 500 nM staurosporine 含有 DMEM 中で、上記の培養上清をそれぞれ終濃度 5  $\mu$ g/ml 入れ、1 時間後、細胞をはがして細胞分散液に Annexin V-FITC および propidium iodide を加えて 15 分反応させ、フローサイトメトリーで測定した。

ついで、高齢および若齢の膜分取歯髄幹細胞培養上清の免疫調節能を比較するため、培養上清をそれぞれ終濃度 5  $\mu$ g/ml 入れ、mixed lymphocyte reactions (MLR) assay (混合リンパ球培養反応) を行った。

## 7. 増幅に伴う歯髄幹細胞の形質安定性

膜分取した上記歯髄幹細胞の 6 代目および 12 代目において、各種幹細胞表面抗原マーカーの抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。

ついで、膜分取歯髄幹細胞の 6 代目および 12 代目の幹細胞マーカーと血管

誘導因子および神経栄養因子の real time RT-PCR を Light Cycler にて行い、結果は *β-actin* で標準化した。

増殖能および遊走能については、上記と同様の方法で行った。

さらに、老化マーカー (SA- $\beta$ -gal) 染色および細胞老化誘導因子の発現を高齡、若齡の膜分取歯髄幹細胞および未分取歯髄幹細胞の 6 代目および 20 代目で比較した。

またテロメラーゼ活性、テロメア長の測定を、それぞれ高齡、若齡の膜分取歯髄幹細胞および未分取歯髄幹細胞の 8 代目、12 代目および 20 代目で比較した。

## 8. マウス下肢虚血モデルを用いた歯髄幹細胞移植による血流回復と血管新生

SCID マウスを用いて下肢虚血モデルを作製し、24 時間後に高齡および若齡の膜分取、未分取歯髄幹細胞を  $1 \times 10^6$  個、筋肉内に注入し、14 日後レーザードップラーにより血流量を測定した。また、12  $\mu\text{m}$  の厚みの凍結切片を作製し、レクチン染色し、血管新生密度を測定した。

## 9. マウス異所性歯根移植モデルにおける血管新生および歯髄再生

高齡および若齡の膜分取、未分取歯髄幹細胞を 5 代目でそれぞれヒト歯根の根管に注入し、5 週令の SCID マウスに皮下移植した。21 日後、通法に従い 5  $\mu\text{m}$  の厚みのパラフィン切片を作製し、HE 染色後、再生歯髄面積の比率を計算し再生組織量を検討した。また 5  $\mu\text{m}$  の厚みのパラフィン切

片を RECA1 抗体を用いて免疫染色し、血管新生密度を測定した。再生歯髓組織の象牙芽細胞への分化を評価するためマウス *Enamelysin* probe を用いて、in situ hybridization を行い、*Enamelysin* 陽性細胞数を計測した。

動物実験は、愛知学院大学歯学部および国立長寿医療研究センターの動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

## V. 結 果・考 察

今回、高齢の歯髓幹細胞の幹細胞形質、安定性および再生能を若齢の歯髓幹細胞と比較し、幹細胞治療における有用性を検討したところ、以下の結果を得た。

1) 高齢膜分取歯髓幹細胞は若齢膜分取歯髓幹細胞と同様に高い幹細胞形質を有していたが、未分取歯髓幹細胞は高齢では若齢と比較して CD105 および CXCR4 陽性率や血管誘導能、増殖能、血管誘導因子・神経栄養因子発現および培養上清の遊走促進能、免疫調整能や抗アポトーシス効果が劣っていた。以上の結果より、膜分取法により、年齢にかかわらず形質の優れた幹細胞を分取できることが示唆された。この内容は PLOS ONE (May 2014 Volume 9 Issue 5 e98553) の Table 1.、Figure1-2.に掲載している。

2) 高齢膜分取歯髓幹細胞は若齢膜分取歯髓幹細胞と同様に in vivo において高い血管新生能および歯髓再生能を有していたが、未分取歯髓幹細胞は高齢では若齢と比較して血管新生能および歯髓再生能が低かった。これは、高齢膜分取歯髓幹細胞は若齢と trophic 効果が変わらないため、高齢と若齢

歯髄幹細胞の *in vivo* の再生能に差がみられなかったものと示唆される。この内容は PLOS ONE (May 2014 Volume 9 Issue 5 e98553) の Figure5-6.に掲載している。

3) 高齢膜分取歯髄幹細胞は若齢膜分取歯髄幹細胞と同様に長期継代培養による老化マーカー、老化誘導因子発現の抑制、またテロメラーゼ活性やテロメア長の低下がみられず維持されていた。以上のことから、膜分取歯髄幹細胞はより幹細胞を効率よく分取するため前駆細胞が少なく、老化しにくいと考えられる。この内容は PLOS ONE (May 2014 Volume 9 Issue 5 e98553) の Table2.、Figure3-4.に掲載している。

## VI 結 語

高齢膜分取歯髄幹細胞は若齢と同様に幹細胞治療における有効な細胞源となる可能性が示唆された。