

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

竹内教雄

論文題目

歯髄再生治療法における遊走因子 bFGF の検討

I. 緒 言

幹細胞移植による歯髄再生は、歯髄炎または根尖性歯周炎の治療のための有望なアプローチであり、歯の寿命を伸ばし、QOLの改善に役立つと考えられる。Ioharaらは、これまで、イヌ抜髄後の根管内に幹細胞である歯髄CD105⁺細胞または歯髄CD31⁺SP細胞をSDF-1とともに移植し、歯髄を完全に再生させることに成功した。また、歯髄膜分取細胞(MDPSCs)をgranulocyte-colony stimulating factor(G-CSF)とともに移植することによっても歯髄を完全に再生することに成功した。その再生メカニズムとして、G-CSFによる周囲組織の幹細胞の遊走、増殖促進効果、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、血管新生促進作用および神経突起伸長効果が示唆されている。

一方、basic fibroblast growth factor (bFGF) は歯髄幹細胞に対して、*in vitro*における遊走促進作用、増殖促進作用、血管新生作用を有し、線維芽細胞に対して抗アポトーシス作用が知られている。

bFGFはG-CSFと、遊走・増殖促進、血管新生、抗アポトーシス作用などの類似した作用を有することが示唆されている。よって、本研究の目的は、*in vitro*および*in vivo*におけるbFGFの効果とG-CSFと比較し、歯髄再生治療に用いる最適な遊走因子を検討することである。

II. 材料および方法

1. ヒト歯髄幹細胞分取

第3大臼歯を抜歯し、即座に歯髄組織を摘出し、37°C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 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) に $2-4 \times 10^4$ の細胞数で 35mm ディッシュ上に播種した。MDPSCs 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 2×10^4 cells/100 μ 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 (Neutrogen®) (Chugai Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) を最終濃度 100 ng/ml 入れ、48時間後に G-CSF を取り除き、10%ヒト血清含有 DMEM に培地交換した。さらに培養して、70%コンフルエント後に継代した。この細胞を MDPSCs として使用した。

なお、この研究は愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認 (承認番号: AGUD291) を得て行われた。

2. 細胞培養

MDPSCs は 10%ヒト血清含有 DMEM にて培養した。ヒト歯根膜線維芽細胞 (PdLF) は、bFGF 及び IGF 含有の SCGM™ SingleQuots® (Lonza, Muenchensteinerstrasse, Switzerland) にて培養した。骨髄由来間葉系幹細胞 (BM) は、Powered By 10 (GP bio science, Sapporo, Japan) にて培養した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) 含有の EGM2

(Lonza) にて培養した。ヒト神経芽細胞腫 (TGW) は、10%FBS 含有 DMEM にて培養した。

3. 培養上清の調製

MDPSCs を、50% 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 (CM) として回収した。その上清を遠心式限外濾過フィルターユニット (Millipore, Billerica, MA, USA) にて約 25 倍に濃縮した。CM 中のタンパク濃度は、BradfordUltra™ (Expedeon, Cambridge, UK) により定量した。

4. 遊走能、増殖能および抗アポトーシス作用の測定

MDPSCs、HPdLF、BM、HUVEC、TGW の bFGF (Fiblast Spray®) (Kaken Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) 、G-CSF および CM に対する遊走能を比較するために、TAXIScan-FL (Effector Cell Institute, Kanagawa, Japan) を用いて解析を行った。チャンネル内の一端に細胞を注入し、10 ng/ μ l の遊走因子を一定濃度勾配が形成させるように 1 μ l 反対側に入れた。細胞遊走のビデオ画像を経時的に撮影し、画像解析により遊走細胞数を測定した。

増殖能については、歯髄幹細胞 5 代目を 96 well に 1×10^3 cells で播種し、DMEM 中に、最終濃度 50 ng/ml になるように bFGF、G-CSF あるいは CM (タンパク質濃度 5 μ g/ml) を培地に添加し培養した。10 μ l の Tetra-color one® (Seikagaku Kogyo, Co., Tokyo, Japan) を 96 well plate

に添加し、細胞数を経時的に吸光度 (450 nm) を測定した。細胞を含有しない条件をネガティブコントロールとした。

抗アポトーシス作用に関しては 500 nM staurosporine (Sigma-Aldrich) 含有 DMEM 中に、最終濃度 100 ng/ml の bFGF、G-CSF あるいは CM (タンパク質濃度 5 µg/ml) を添加し 3 時間作用させた。その後、Annexin V-FITC と propidium iodide (Roche, Mannheim, Germany) で 15 分反応させ、アポトーシス細胞を標識した後フローサイトメトリーにて測定した。

5. 多分化能

bFGF および G-CSF の分化促進作用 (血管内皮細胞分化促進作用、神経突起伸長促進作用、象牙質誘導促進作用) を比較した。さらに分子生物学的に解析するために象牙質マーカーの mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。

6. 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

最終濃度 15 µg/ml bFGF、G-CSF またはブタ遊走歯髄膜分取細胞 (5 代目)、をコラーゲン TE (Nitta Gelatin, Tokyo, Japan) と混合し、ブタ歯根の根管内に注入した。これらを 5 週齢の SCID マウス (CB17, CLEA, Tokyo, Japan) に皮下移植した。21 日後、通法に従い 5µm 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。象牙質マーカーである *enamelysin* probe を用いて、*in situ* hybridization を行い、*enamelysin* 陽性細胞数を計測した。また、

歯髄のマーカーである *thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme* (*TRH-DE*) を *in situ* hybridization にて確認した。

7. 再生歯髄組織の遺伝子解析

bFGF、G-CSF あるいは細胞を移植後 21 日間経過した歯を使用し、Real-time RT-PCR にて解析を行った。それぞれの再生歯髄組織から RNA を抽出し、歯髄のマーカーである *TRH-DE* と、象牙質のマーカーである *enamelysin* を解析した。ネガティブコントロールとしてはコラーゲンのみ移植したものをを用いた。

なお、上記動物実験は国立長寿医療研究センターおよび愛知学院大学歯学部動物実験指針に基づいて、動物実験倫理委員会の承認（承認番号：AGUD156）を得て行われた。

V. 結 果

歯髄再生に使用する最適な遊走因子を検索するために、bFGF および G-CSF の *in vitro* における遊走因子の効果と *in vivo* における歯髄再生能を比較検討したところ次のような結果を得た。

1) 遊走促進作用

TGW 以外の細胞で bFGF および G-CSF による遊走促進作用が認められた。なお、両者には有意差は認められなかった。

2) 細胞増殖促進作用

すべての細胞で bFGF および G-CSF による細胞増殖作用がみとめられ、

両者には有意差は認められなかった。

3) 抗アポトーシス作用

すべての細胞で bFGF および G-CSF による抗アポトーシス作用がみとめられ、両者には有意差は認められなかった。

4) 血管内皮細胞分化促進作用

血管内皮細胞分化促進作用に関して、血管誘導培地に bFGF および G-CSF を添加することにより、分化促進が認められた。また、管腔形成量においては、両者に有意差は認められなかった。

5) 神経突起伸張促進作用

神経突起伸張促進作用について、GDNF に bFGF および G-CSF を添加すると伸張促進作用があり、両者には有意差は認められなかった。

6) 石灰化の促進作用

象牙質誘導促進誘導条件下において、誘導培地に G-CSF を添加すると石灰化の促進が認められたが、bFGF では認められなかった。

7) 歯髄再生作用

SCID マウスに移植した際の bFGF および G-CSF による歯髄再生を比較したところ、両者には有意差は認められなかった。

VI. 結 論

本研究は、歯髄再生治療時に用いる最適な遊走因子を検討するため、*in vitro* および *in vivo* における bFGF の効果を G-CSF の効果と比較し、以下の結

論を得た。

1) *in vitro*において、bFGF および G-CSF において遊走促進作用、増殖促進作用、抗アポトーシス作用、血管内皮細胞分化促進作用、神経突起伸長促進作用において有意な差は認められなかった。

2) *in vivo*において、bFGF および G-CSF において歯髄再生能に有意な差は認められなかった。

歯髄再生治療法に用いる遊走因子として、bFGF も G-CSF と同様に有用であると考えられる。