

論文内容要旨

ヒト乳歯歯髄由来間葉系幹細胞、ヒト永久歯歯髄由来
間葉系幹細胞およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞
における骨再生能の比較検討

主指導教員：谷本 幸太郎 教授
(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：里田 隆博 教授
(医歯薬保健学研究科 生体構造・機能修復学)

副指導教員：國松 亮 講師
(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

中島 健吾

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

口唇裂・口蓋裂（CLP）は、複数の遺伝子要因と環境要因から発症する多因子疾患である。日本人における発症率は0.19%であり、頭頸部に発症する先天異常では最も多い疾患である。顎裂を有する患者は、矯正歯科治療および顎裂部骨移植がほとんどの症例において必要となる。顎裂部骨移植は、1972年にBoyneらが、顎裂部への新鮮自家腸骨海綿骨移植により犬歯を骨移植部位へ萌出誘導することを報告して以来、secondary alveolar bone graft が積極的に行われるようになってきた。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は小さくなく、合併症として、外側大腿皮神経損傷、3ヶ月以上継続する疼痛、術後疼痛に伴う歩行障害、移植骨の吸収などがある。これらは、学童期である患者にとって大きな負担となる。当科では、これらの外科的侵襲を回避しながら、骨再生を達成する方法を模索し、これまでにビーグル犬顎裂モデルを用いて骨髄由来間葉系幹細胞（BMSCs）移植による顎骨再生を達成した。さらに、再生部位への歯の移動が可能であることを明らかにした。しかしながら、骨髄液を採取するためには、骨髄穿刺が必要であり、患者の負担を十分に軽減したとは言えない。

そこで、2000年に永久歯歯髄より単離に成功したヒト永久歯歯髄由来間葉系幹細胞（human dental pulp stem cells; hDPSCs）および2003年には、乳歯歯髄より単離に成功した乳歯歯髄由来間葉系幹細胞（stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED）に着目した。これらは、human BMSCs（hBMSCs）と比較して高い増殖能および多分化能を有し、in vivoにおける骨再生が報告されている。さらに、hBMSCsと比較して容易に入手できるため、その有用性が期待されている。

以上の背景より、本研究では、SHED および hDPSCs の生体内における骨再生能を hBMSCs と比較・検討を行うことを目的とした。当院通院中の患者より矯正歯科治療のため抜去された乳歯および永久歯を採取し、SHED および hDPSCs を単離・培養した。その性質を確認するため、蛍光免疫染色法を用いて多分化能を確認し、フローサイトメーターを用いて、幹細胞マーカーとして知られる表面抗原 CD29、CD44、CD73、CD105、CD146、および STRO-1 を解析した。さらに、SHED および hDPSCs の生体内における骨再生能を評価するため、6週齢免疫不全マウスの頭頂骨に骨欠損を作製し、SHED（SHED 群）、hDPSCs（hDPSCs 群）および hBMSCs（hBMSCs 群）を播種した PLGA メンブレンを移植した。一方、メンブレン移植のみを行った免疫不全マウスを対照群とした。移植12週後に Micro CT を撮影し、再生骨体積率を算出し比較した。そして、屠殺後に脱灰・固定を行った後、パラフィン包埋を行った。さらに、染色により、組織切片上における骨欠損部面積に対する、残存 scaffold の面積率およびコラーゲン線維および類骨の面積率を算出した。

蛍光免疫染色により骨分化、軟骨分化および脂肪分化が確認された。表面抗原は、CD29、CD44、CD73、CD105、CD146、STRO-1 全てにおいて陽性を示した。これらより、乳歯、永久歯より単離した細胞は、それぞれ SHED および hDPSCs であることが確認された。動物実験による検討では、再生骨体積率は SHED 群、hDPSCs 群、hBMSCs 群、対照群の順に大きく、細胞を移植した3群はそれぞれ対照群と比較して有意に高い値であった。組織学的検討では、残存 scaffold の面積率は、各群において有意な差は認められなかったが、コラーゲン線維および類骨の面積率にお

いて、SHED 群は、hDPSCs 群、hBMSCs 群および対照群と比較して、それぞれ有意に大きな値を示した。hBMSCs 群も同様に対照群と比較して、有意に大きな値であったが、hBMSCs 群および hDPSCs 群の間には有意差は認められなかった。

以上の結果より、SHED 群または hDPSCs 群は、hBMSCs 群と同程度の再生骨を誘導することが明らかとなった。また、コラーゲン線維や類骨の広がりについては、hDPSCs 群は、hBMSCs 群と同程度であったものの、SHED 群は、hDPSCs 群、hBMSCs 群および対照群と比較して大きく、長期的な観察により、さらなる成熟した再生骨が生じることが期待された。

これらより、SHED は生体内への移植により、hDPSCs および hBMSCs と同等もしくはそれ以上の骨再生能を有することが明らかとなり、口蓋裂顎裂部骨再生治療の細胞源としての有用性が示唆された。