

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	力武 航大
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Effect of CD146 positive stem cells from human exfoliated deciduous teeth on bone regeneration (CD146陽性細胞がヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞の骨再生能に及ぼす影響)			
論文審査担当者			
主査	教授	太田 耕司	印
審査委員	教授	加藤 功一	
審査委員	教授	水野 智仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【目的】口唇口蓋裂（Cleft lip and/or palate；CL/P）は、頭蓋顎顔面領域において最も高い発症率を示す先天性疾患である。顎裂を有する患者において、顎裂部への腸骨海綿骨移植が広く行われている。しかしながら、腸骨採取時の外科的侵襲は、患者にとって大きな負担となり、腸骨採取後の疼痛等の問題を伴う。そのため、低侵襲で顎裂部骨再生を達成しうる手段として、間葉系幹細胞（MSCs）を用いた骨再生医療が期待されている。申請者の所属する研究グループでは、腸骨採取に伴う侵襲を低減しながら骨再生を達成する方法として、以前より歯髓由来 MSCs に着目し、検証を重ねてきた。これまでの検討より、頭蓋骨骨欠損免疫不全マウスにおいて、ヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞（SHED）移植は、骨髄由来 MSCs（BMSCs）移植と同程度の骨再生を誘導できることが明らかになった。以上の結果は、SHED が顎裂部骨再生治療に対する有効な細胞源であることを示唆するものの、歯髓組織におけるどの細胞成分が骨再生誘導に関与しているかについては解明されていない。</p> <p>近年、再生医療分野において、MSCs の表面抗原に関する研究が盛んに行われている。MSCs が有する表面抗原の一つである CD146 は MSCs の骨再生能に影響を及ぼす可能性があることが報告されている。しかしながら、SHED に含まれる CD146 発現細胞が骨再生に及ぼす影響については明らかとなっていない。以上の背景より、本研究では、SHED における骨再生に有用な細胞集団を解明するため、SHED に含まれる CD146 発現細胞が骨再生能に及ぼす影響について検討した。</p> <p>【方法】実験 1: 広島大学病院に来院した患者の抜去乳歯歯髓から SHED を単離・培養後、フローサイトメトリーにより CD146 および MSCs マーカーの発現について解析した。また、CD146 に基づいてセルソーティングを行い、CD146+SHED、CD146-SHED を単離・培養した。次に、免疫不全マウス（BALB/c-nu）の頭蓋骨に直径 5 mm の骨欠損を作製し、その欠損部へアテロコラーゲンを担体として、セルソーティングを行っていない SHED、CD146+SHED、および CD146-SHED を移植した。移植後 0、4、8 週間後に μCT 撮影を行い、移植部位の三次元画像構築と骨再生率の算出を行った。また、移植 8 週間後に移植部位の組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン（H&E）染色およびマッソントリクローム（MT）染色を行い、骨の成熟度を評価した。さらに、骨形成関連因子であるアルカリフォスファターゼ（ALP）ならびに血管新生に関連する血管内皮細胞成長因子（VEGF）およ</p>			

び CD31 の免疫組織染色を行った。

実験 2: CD146 発現細胞の増殖能を調べるため、SHED、CD146+SHED、CD146-SHED を培養し、BrdU assay および倍加時間の算出を行った。また、骨分化能について比較するため、骨分化誘導開始 21 日目に ALP 染色にて評価するとともに、ALP タンパク質発現量を調べた。さらに、骨分化誘導開始 28 日目に Alizarin red 染色を行い、石灰化物の沈着について評価した。また、骨分化誘導開始 0、21 および 28 日目に RT-PCR を行い、骨分化マーカーである ALP、BMP-2、および OCN の遺伝子発現について解析した。血管新生能の比較は、SHED、CD146+SHED、CD146-SHED と共培養したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) による管腔形成能をもとに行った。また、SHED、CD146+SHED、CD146-SHED について RT-PCR を行い、血管新生マーカーである VEGF、VEGFR2、bFGF、CD31 の遺伝子発現について解析した。

【結果】実験 1: フローサイトメトリー分析において、表面抗原 CD146 を有する細胞は、SHED 細胞集団全体の 70.9%であった。また、MSCs マーカーである CD73、CD90、および CD105 の発現細胞率は、100%に近い値を示した。動物実験による検討では、移植 8 週間後の μ CT において、CD146+SHED 群は、SHED 群および CD146-SHED 群と比較して、有意に高い骨再生率を示した。H&E 染色および MT 染色による評価では、CD146+SHED 群において、著しい骨再生組織像が観察された。VEGF-A、ALP 免疫染色において、移植部位における発現領域の割合は CD146+SHED 群で最も高い値を示した。また、CD31 の免疫染色の結果から CD146+SHED 群と SHED 群は、CD146-SHED 群と比較して、血管数が有意に多いことがわかった。

実験 2: SHED、CD146+SHED、CD146-SHED において、細胞増殖能に有意な差はなかった。ALP 染色、Alizarin red 染色の結果から、CD146+SHED が SHED、CD146-SHED より高い骨分化能をもつことが明らかになった。骨分化マーカーである ALP、BMP-2、OCN の遺伝子発現は、0 日目には三群間に有意な差を認めなかったものの、骨分化誘導開始 21 および 28 日目に於いて、CD146+SHED は、SHED および CD146-SHED より有意に多かった。HUVEC による管腔形成は、CD146+SHED あるいは SHED と共培養した場合に比べ、CD146-SHED と共培養した場合のほうが顕著であった。さらに、CD146+SHED は、SHED および CD146-SHED と比較して、VEGF、VEGFR2、bFGF、CD31 の遺伝子発現量が有意に多かった。

【考察】乳歯歯髄より採取した SHED 細胞集団のうち 70.9%の細胞が CD146+SHED であり、これらは、セルソーターを使用することで単離、培養することが可能であった。したがって、将来的な臨床応用を考慮すると、十分な細胞数を採取、培養可能であるという点から、CD146+SHED は顎裂部移植に対する有用な細胞源として期待できる。また、*in vivo* および *in vitro* の実験において、CD146+SHED が SHED、CD146-SHED と比較して、優れた骨再生能と血管新生能を有することが示された。BMSCs において、CD146 は細胞膜上に存在する VEGFR2 のコレセプターとして作用し、VEGF や BMP-2 などの発現を増強することで、血管新生や骨分化を促進することが報告されており、本研究においても同様の機序によって、CD146+SHED の高い血管新生能および骨分化能が発揮されたものと考察した。

以上の結果から、本論文は、CD146 陽性乳歯歯髄由来間葉系幹細胞が優れた骨分化能、血管新生能を有し、顎裂部移植の有用な細胞源となる可能性を示した有意義なデータを提供し、矯正歯科学ならびに関連歯科医学の発展に寄与するところが大きいと高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(歯学)の学位を授与するに十分価値あるものと認めた。