

論文内容要旨

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)

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：柴 秀樹教授

(医系科学研究科 歯髓生物学)

副指導教員：國松 亮准教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

力武 航大

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景および目的】

口唇裂・口蓋裂 (CLP) 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が伴う。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の応用が期待されている。我々の研究グループでは、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、以前より歯髄由来 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、ヒト乳歯歯髄由来間葉系幹細胞 (SHED) 移植は、骨髄由来 MSCs (BMSCs) 移植と同程度の骨再生能を有することを解明した。以上の結果より、SHED の顎裂部骨再生治療に対する有効な細胞源であることが示唆されるものの、歯髄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、解明されていない。

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示唆されている。しかしながら、SHED に含まれる CD146 陽性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 の表面抗原 CD146 が骨再生能に及ぼす影響について検討することとした。

【試料および方法】

実験 1: 当院に来院された患者の抜去乳歯歯髄から SHED を単離・培養後、フローサイトメトリーを行い、CD146 および MSCs マーカーについて解析を行った。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 5 mm の骨欠損を作製し、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 BALB/c-nu の骨欠損部へ移植した。移植後 0、4、8 週間後に μ CT を撮影し、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、成熟骨を評価した。さらに、骨形成因子である ALP の発現について免疫組織染色を行った。そして、VEGF および CD31 の発現について免疫組織染色を行い、組織内の血管新生についても検討した。

実験 2: CD146 が細胞増殖能に及ぼす影響を調べるため、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 タンパク質発現量について検討した。そして、骨分化誘導開始 28 日目において、Alizarin red 染色を行い、石灰化沈着物の発現について評価を行った。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を行った。さらに、血管新生能を比較するため、SHED、CD146⁺SHED、CD146⁻SHED をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と共培養し、管腔形成能について検討した。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解析において、表面抗原 CD146 を有する細胞は、ヘテロな SHED 細胞集団全体の約 70.9%であった。また、MSCs ポジティブマーカーである CD73、CD90、および CD105 の表面抗原発現率は、100%に近い値を示した。動物による検討では、移植 8 週間後の CT において、CD146⁺群は、SHED および CD146⁻SHED の群と比較して、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⁺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、移植部位のうち、発現領域が示す割合は CD146⁺群で最も高い値を示した。また、CD31 免疫染色において、陽性血管数を比較したところ、CD146⁺群と SHED 群は、CD146⁻群と比較して、有意な血管数の増加が認められた。

実験 2: SHED、CD146⁺SHED、CD146⁻SHED において、細胞増殖能の有意な差を認めなかった。ALP 染色および Alizarin red 染色では、CD146⁺SHED 群は SHED 群、CD146⁻SHED 群と比較して、高い骨分化能を示した。骨分化マーカーの遺伝子発現は、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 日目において、CD146⁺SHED 群は、SHED 群および CD146⁻SHED 群と比較して、ALP、BMP-2、OCN の有意な遺伝子発現の増加が認められた。HUVEC との共培養による管腔形成の検討では、CD146⁺SHED 群および SHED 群は、CD146⁻SHED 群と比較して、有意な管腔形成の増加が認められた。さらに、CD146⁺SHED 群は、SHED 群および CD146⁻SHED 群と比較して、VEGF、VEGFR2、bFGF、CD31 の有意な遺伝子発現の増加が認められた。

【結論】

以上の結果から、CD146⁺ SHED は、SHED および CD146⁻ SHED と比較して、高い骨分化能、血管新生能を有することが示された。CD146 を発現する SHED は、骨再生治療に有用な細胞集団である可能性が示唆された。