

学位論文題名

Establishment of cell lines that exhibit pluripotency
from miniature swine periodontal ligaments

(ミニブタ歯根膜から採取した多分化能力をもつ細胞株の樹立)

学位論文内容の要旨

【緒言】歯根膜は顎骨と歯根との間に存在する線維性の結合組織であり、歯の顎骨内への保持のほかに歯周組織への栄養補給や恒常性の維持、また咬合力の緩衝として重要な役割を果たしている。歯根膜組織中には線維芽細胞様細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞のほかに、上皮細胞(マラッセの上皮遺残)や血管を構成する細胞(血管内皮細胞、血管平滑筋細胞及び周皮細胞)などさまざまな種類の細胞が存在している。一方、歯根膜には歯小嚢由来のいわゆる未分化間葉系細胞もしくは前駆細胞とよばれる細胞が存在していると考えられている。しかし、このいわゆる未分化間葉系細胞もしくは前駆細胞の細胞分化の運命づけに関する詳細については、未だ明らかではない。そこで、本研究ではクラウン系医用ミニブタ歯根膜から採取した歯根膜由来細胞にヒト TERT 遺伝子発現プラスミドを導入し歯根膜組織の特性を反映したクローン化した細胞株を樹立し、これらの細胞株を用いて多分化能力を調べることを目的とした。

【材料と方法】雄28ヶ月齢のクラウン系医用ミニブタ(ジャパンファーム、鹿児島)の下顎より前臼歯を抜去し、Somermanらの方法に準じ、歯根中央部周囲に付着した歯根膜組織を剥離し、10%ウシ胎仔血清および1 ng/mlヒト組換え fibroblast growth factor (FGF)-2を含むMEM培地で37°C、5%CO₂存在下にて培養を行い、分離増殖した細胞を歯根膜由来細胞とした。分離増殖した歯根膜由来細胞を3回継代後、I型コラーゲンコートしたディッシュに細胞を1×10⁶個/dishで播種し、コンフルエントに近い状態になったところでヒトTERT発現プラスミド(pCI-neoTERT)をリン酸カルシウム法によりトランスフェクトした。トランスフェクト1週間後、アミノグリコシド系抗生物質であるG418によりトランスフェクタントの選別を行った。10日後、G418耐性クローン細胞がコンフルエントに近い状態になったところで、限界希釈法を用いて細胞のクローニングを行った。得られた細胞株をTeSPDL(Telomerase Swine Periodontal Ligament)と名付け、うち4種類の細胞株(TeSPDL 1-4)についてI型コラーゲンコートしたディッ

シュにて細胞を培養し位相差顕微鏡により細胞の形態、reverse transcriptase-polymerase chain reaction法によるmRNA発現、ALP活性染色及びフォンコッサ染色を行った。細胞のテロメラーゼ活性はTeloChaserを用いた方法で測定した。細胞培養の条件を変えTeSPDL-3及びTesPDL-4細胞を、石灰化誘導培地（50 µg/ml アスコルビン酸, 10 mM β-glycerophosphate, 5 µM デキサメサゾン）にて21日間培養した。また、TeSPDL-3は、10 ng/ml もしくは20 ng/mlのFGF-2存在下で2日間培養を行った。vWF抗体を用い細胞を染色しvWFの発現を調べた。

【結果】 TeSPDL1-4細胞の形態を観察したところ、すべての細胞が線維芽細胞様の形態を示し、TeSPDL1-3細胞は紡錘形で細長いのに対し、TeSPDL4細胞は星型に近いような形態をしていた。各TeSPDL細胞は、テロメラーゼ活性が認められ、Runx2, ペリオスチン, α1(I)コラーゲン, オステオポンチンならびにsmooth muscle α-actinのmRNAを発現していた。また、各TeSPDL細胞は、いずれもアルカリフォスファターゼ活性染色で陽性となったが、各細胞間でその程度に違いが見られ、TeSPDL4細胞では他の3種類と比較して活性が低かった。TesPDL3細胞ならびにTeSPDL4細胞を、石灰化誘導培地にて培養を行ったところ、TesPDL3細胞では、フォンコッサ染色にて陽性の石灰化塊の形成が見られた。他方、TeSPDL4細胞ではフォンコッサ染色にて陽性ではなかった。TesPDL-3細胞を、10 ng/mlのFGF-2存在下で2日間培養したところ、CD31, VE-cadherin及びvWF mRNAの発現が増加した。また、vWF抗体にて陽性に染色された細胞が観察された。

【考察】 調べた4種類のTeSPDL細胞は、細胞の形態及びRunx2, ペリオスチン, α1(I)コラーゲン, オステオポンチンならびにsmooth muscle α-actinのmRNAを発現していたことから、歯根膜の線維芽細胞様の性質を有していることが考えられた。TesPDL3細胞は、石灰化誘導培地によって石灰化物の形成が認められたことから、骨芽細胞もしくはセメント芽細胞に分化しうる可能性が考えられた。TeSPDL4細胞は、この石灰化物形成を起こさなかったことから、細胞株間による分化の方向付けが異なっていることが考えられた。TesPDL3細胞は、CD31, VE-cadherin及びvWF因子の発現が見られたことから、血管内皮細胞へ分化しうる可能性が考えられた。

【結論】ミニブタ歯根膜由来の線維芽細胞様TesPDL-3細胞は、培養条件下でその培養条件によって骨芽細胞（もしくはセメント芽細胞）及び血管内皮細胞に分化しうることを示唆された。本研究より、歯根膜組織中に、骨芽細胞（もしくはセメント芽細胞）および血管内皮細胞に分化しうる線維芽細胞様の前駆細胞が存在する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 山 敦 郎
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Establishment of cell lines that exhibit pluripotency from miniature swine periodontal ligaments

(ミニブタ歯根膜から採取した多分化能力をもつ細胞株の樹立)

審査は、主査、副査が一堂に会し、論文提出者が論文内容の要旨を説明しながら、その内容について審査担当者が口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文要旨

歯根膜は顎骨と歯根とのあいだに存在する線維性の結合組織であり、歯の顎骨内への保持のほか、歯周組織への栄養補給や恒常性の維持、また咬合力の緩衝として重要な役割を果たしている。歯根膜中には線維芽細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞など多数種の細胞群が混在している。一方、歯根膜には重要な細胞成分として、歯小嚢由来の未分化間葉系細胞または前駆細胞とよばれる細胞が存在している。しかし、これらの細胞が歯根膜中の各細胞の共通の前駆細胞であるのか、それともそれぞれの細胞に分化することを運命づけられた前駆細胞が存在して、それぞれの成熟した細胞に分化していくのかは、いまだ明らかになっていない。そこで、本研究ではクラウン系医用ミニブタ歯根膜から採取した歯根膜由来細胞にヒトTERT遺伝子発現プラスミド(pCI-neoTERT)を導入し、樹立された細胞株を用いてこれらの細胞の多分化能力とその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

hTERTを導入しクローン化されたミニブタ歯根膜由来線維芽細胞様細胞4種(TesPDL1-4)を用いて、これらの細胞株の各種遺伝子発現等の特徴を調べた。いずれの細胞株も線維芽細胞様の形態をしており、歯根膜関連遺伝子であるRunx2、ペリオスチン、I型コラーゲン、オステオポンチンならびにSmooth muscle α -actin mRNAの発現やアルカリフォスファターゼ活性が認められた。次に、TesPDL3細胞が多分化能力をもつかどうかについて検討した。TesPDL3細胞は石灰化誘導培地にて培養すると骨芽細胞あるいはセメント芽細胞様に細胞間基質石灰化能力をもつことがわかった。また、TesPDL3細胞は血管内皮細胞マーカーであるCD31、VE-cadherin及びvWF因子を発現しており、それらの発現はFGF-2存在下によって促進された。

以上の結果より、歯根膜中には多分化能力をもつ細胞が存在すること、またこれらの細胞が血管構成細胞の起源となる可能性が示唆された。

審査の内容

1. 歯根中央部から歯根膜組織を剥離する理由について
歯根膜組織を採取する際、根尖部付近では歯髓組織の細胞が、また歯頸部付近では歯肉組織の細胞が混在する可能性があるため、より歯根膜組織のみを採取するため歯根中央部とした。
2. 樹立したミニブタ歯根膜由来細胞株 (TeSPDL cells) の性質について
 - ① type I collagen をコートしていない培養 dish で培養した場合について
 - ② 各細胞株による増殖時の変化についてTeSPDL1-3 細胞に関しては、dish 底面に接着するが、TeSPDL4 細胞では dish 底面に接着することもできず、全く生育できなかつた。また TeSPDL3 細胞は長期培養すると pile up してくるが、TeSPDL4 細胞ではまったくみられなかつた。これらの結果から TeSPDL4 細胞は他の細胞とは異なつた性質をもつことが推測された。
3. FGF-2 を最初から添加して培養細胞を採取した理由について
FGF-2 を加えて培養すると細胞が out growth しやすいことから本研究では添加した。もし、この段階で FGF-2 を添加せずに細胞を単離した場合では性質が異なつた細胞株が単離された可能性も考えられた。
4. 増殖中の TeSPDL3 細胞のオステオポンチンの mRNA の発現の低下について
TeSPDL3 細胞において、オステオポンチンの mRNA の発現が他の細胞と比べて低いが発現は認められた。この細胞を石灰化誘導培地で培養すると石灰化塊を形成し、mRNA レベルでも明らかに発現が増加することから、TeSPDL3 細胞が骨芽細胞あるいはセメント芽細胞様に分化しようということが推測された。
5. 歯根膜細胞の前駆細胞の存在について
本研究の結果より歯根膜中には多分化能をもつ前駆細胞が存在することが示された。また一方では個々の細胞に運命づけられた前駆細胞が存在しているのではという報告もされている。従つてもしかするとどちらか一方だけというわけではなく、両方の前駆細胞 (多分化能力を有する前駆細胞とそれぞれの細胞に分化することを運命づけられた前駆細胞) が存在している可能性も考えられた。

本研究は、歯根膜由来細胞には多分化能力 (骨芽細胞もしくはセメント芽細胞及び血管構成細胞への分化) をもつ細胞が存在することを示した。これは歯科臨床である歯周病やインプラント治療において歯根膜再生の可能性として大変有意義な研究であると評価できる。よつて学位申請者は博士 (歯学) の学位授与にふさわしいものと認めた。