

論 文 要 旨

マラッセ上皮と歯髄間葉相互作用による
歯根膜様細胞への誘導

2019年度
北海道医療大学大学院歯学研究科

大 西 綾

【 緒論 】

歯科分野で行われている主な再生医療の一つに歯周組織再生療法があり、GTR法やエムドゲインなどが臨床応用されている。近年では、歯根膜幹細胞と臍帯静脈内皮細胞を共培養した細胞シートを用いて歯根膜の再生を試みる報告がなされている(Panduwawala et al., J Periodont Res. 2017)が、抜歯に至るような重度歯周炎に対してGTRやエムドゲインなどは適応外(齋藤, 杉戸, 2013; 野口, 三谷, 2013)であり、また、歯根膜幹細胞を用いた細胞シートは、歯根膜幹細胞の採取が困難なため、実用化が難しいのが現状である。そこで、歯根膜幹細胞に代わるものとして、歯髄幹細胞を有する歯髄細胞を用いた歯根膜様の細胞シート作製が考えられる。歯髄には、歯根膜の主体でもある線維芽細胞をはじめとして、血管内皮細胞や神経線維、骨芽細胞、象牙芽細胞など様々な細胞が混在することから(Grando et al., 2007; Nuti et al., 2016; Luo et al., 2018)、歯根膜に必要な脈管構造の再現構築に適していると考えられ、歯髄全体の細胞にマラッセ上皮細胞を追加することで、歯根膜類似の上皮間葉細胞集団の作製が可能になるのではないかという仮説を立た。本研究では、歯髄の細胞とマラッセ上皮細胞とを組み合わせることで、歯根膜類似の上皮間葉細胞集団への誘導を試みた。

【材料および方法】

1. 歯髄細胞, 歯根膜細胞, の培養

ブタ歯髄細胞(DP)およびブタ歯根膜細胞(PDL)を10% FBS, 100 mg/ml ペニシリンG カリウムおよび30 mg/ml Fungizone含有の α -MEM培地にて培養した。

2. ブタマラッセ上皮細胞

ブタマラッセ上皮細胞(ERM)は、1. で増殖したPDLに10% ディスパーゼ処理を行い、線維芽細胞を除去し、上皮細胞を単離し培養した。

3. ヒト臍帯静脈内皮細胞

購入されたヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、内皮細胞増殖培地である0.5% penicillin-streptomycin含有PromoCellにて培養した。

4. DPとERM, HUVECの共培養による歯根膜様細胞への誘導

DP・ERM共培養群ではDP:ERM比を2:1になるように、DP・ERM・HUVEC共培養群ではDP:ERM:HUVEC比を4:1:2になるようにそれぞれ播種し、0.5% penicillin-streptomycin含有MSC培地にて1週間培養した。

5. PDLへの誘導におけるmRNA発現解析

mRNA発現変化を定量的real-time PCR(qRT-PCR)法により解析した。

6. エピジェネティクス試薬のマラッセ上皮細胞への細胞毒性試験

エピジェネティクス試薬のERMへの細胞毒性を調べるために、5Aza, 0.1, 1.0, 10 μ M, Vpa 0.2, 2.0, 20 mMの各濃度で2日毎に培地交換および試薬添加を行いながらES培地

にて7日間培養を行った。さらに、培養8~14日目には全てにおいて試薬を添加せずにES培地のみで培養を行った。培養7日目および14日目に0.5%Trypan Blue溶液を用いて生細胞数を測定した。

7. エピジェネティクス試薬によるERMの脱分化

1) 5Aza および Vpa による ERM 脱分化細胞の作製

細胞毒性試験の結果より、5Azaを1.0 μ M, Vpaを2.0 mMと決定し、2日毎に培地交換および試薬添加を行いながらMSC培地にてERMを7日間培養した。

2) ERM 脱分化細胞の mRNA 発現解析

mRNA発現変化を定量的real-time PCR (qRT-PCR)法により解析した。

3) ERM 脱分化細胞の幹細胞マーカーNANOG および OCT4 における免疫蛍光染色

培養7日目および14日目の各細胞での幹細胞マーカーであるNANOGおよびOCT4について免疫蛍光染色によるタンパク発現レベルを検討した。

4) ERM 脱分化細胞の幹細胞マーカーSSEA-4 における Flow cytometry 解析

培養7日目および14日目の各細胞での幹細胞マーカーであるSSEA-4についてFlow cytometryによるタンパクレベルでの陽性細胞率を測定した。

8. ERM 脱分化細胞における DNA メチル化解析

Qiagen® DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出し、EpiTect® Fast Bisulfite KitsによりBisulfite処理を行い、定量的メチル化特異的PCR (qMSP)法にてDNAメチル化解析を行った。

9. *in situ* HDAC activity assay

In Situ HDAC Activity Fluorometric Assay Kitを用いてHDAC活性を測定した。

10. DP と De-ERM, HUVEC による 歯根膜様細胞への誘導

DP・De-ERM共培養群ではDP:ERM比を2:1, DP・De-ERM・HUVEC共培養群ではDP:ERM:HUVEC比を2:1:1になるようにそれぞれ播種し、0.5% penicillin-streptomycin含有MSC培地にて7日間培養した。

11. De-ERM を用いた PDL への誘導における mRNA 発現解析

mRNA発現変化を定量的real-time PCR (qRT-PCR)法により解析した。

12. De-ERM を用いた PDL における DNA メチル化解析

Qiagen® DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出し、EpiTect® Fast Bisulfite KitsによりBisulfite処理を行い、定量的メチル化特異的PCR (qMSP)法にてDNAメチル化解析を行った。

13. 統計分析

統計分析は、統計ソフトIBM SPSS Statistics 23 (IBM)を用いたMann-Whitney U検定, Kruskal-Wallis検定および χ^2 検定にて比較・検討し、有意水準 $p < 0.01$, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果および考察】

1. DP と ERM, HUVEC の共培養による PDL への誘導

Control 群と比べ DP・ERM・HUVEC 共培養群では、PDL での発現に似た歯根膜特異的遺伝子の有意な発現上昇を認めなかった。この原因として、用いた ERM は、単離して培養したものを使用していたため、すでに上皮細胞としての分化が進んでしまい、エナメルマトリックスの分泌能や幹細胞特性が失われている可能性が考えられた (Tansriratanawong K et al., 2017)。

2. エピジェネティクス試薬による ERM の脱分化

5Aza・Vpa 共添加群において培養 7 日目および 14 日目で幹細胞の形態的な特徴である球形を呈する細胞が出現し、qRT-PCR 法においても、5Aza・Vpa 共添加群において Control 群に比べ幹細胞マーカー、エナメルマーカーでの有意な mRNA 発現上昇を認め 5Aza・Vpa 共添加群において最も効率良く脱分化が行われ、より未分化なエナメル芽細胞に類似しているものと思われた。さらに免疫蛍光染色および Flow cytometry 解析により、幹細胞マーカーのタンパクレベルでの発現を検討した結果、5Aza および Vpa の共添加によって作製された ERM 脱分化細胞は、エナメルマトリックス分泌能や幹細胞特性を獲得したものと考えられた。

3. De-ERM における DNA メチル化解析および *in situ* HDAC activity assay

qMSP 法の結果、5Aza・Vpa 共添加群において、DNA メチル化レベルの有意な低下が認められた。また、*in situ* HDAC activity assay の結果、Control 群に比べ培養 5Aza・Vpa 共添加群での有意な HDAC 活性低下を認めた。このことより、ERM を脱分化させたことが確認された。

4. DP と De-ERM, HUVEC による PDL への誘導および mRNA 発現解析

mRNA 発現解析を qRT-PCR 法の結果、DP・ERM・HUVEC 共培養群に比べ DP・De-ERM・HUVEC 共培養群では、歯根膜関連遺伝子および間葉系幹細胞関連陽性遺伝子有意な mRNA 発現上昇を認めた。

5. De-ERM を用いた PDL における DNA メチル化解析

qMSP 法の結果、Control 群に比べ DP・De-ERM・HUVEC 共培養群でのメチル化レベルの有意な低下を認め、5Aza を応用して作製した De-ERM を DP および HUVEC と共培養して作製した細胞集団での発現変化には、De-ERM 作製時の 5Aza による脱分化作用が、DP および HUVEC との共培養後にも効果的に影響していることが考えられた。

【結論】

エピジェネティクス試薬を応用すること ERM と DP, HUVEC の共培養において歯根膜に類似した間葉系細胞集団へ誘導される可能性が示唆された。