

## 〔学位論文〕

FGF-2が歯根膜細胞群中STRO-1<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>細胞の増殖と分化能に与える影響

日高 竜宏

北海道医療大学大学院歯学研究科

## 目 的

歯周病は歯周病原菌を原因とする慢性炎症により歯周組織が破壊され、成人が歯を喪失する主な原因となる疾患である。近年、広範に失われた様々な組織を再生することが可能な治療として幹細胞の応用が試みられている。歯周組織ではヒト歯根膜由来間葉系幹細胞としてSTRO-1<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>細胞の存在が確認されている。しかし、歯根膜由来間葉系幹細胞の供給源は限られており、歯周組織再生療法へ応用するのに十分な量を得るのは困難である。そのため、歯根膜由来間葉系幹細胞を細胞培養にて増殖させ、組織再生療法に必要な細胞数を確保することが重要となる。塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）は骨髄間葉系幹細胞に対して多分化能を保持した状態で細胞増殖を促進する活性を有することが報告されている。しかし、FGF-2が歯根膜由来間葉系幹細胞の増殖と分化能に与える影響は明らかではない。本研究では効果的に歯根膜由来間葉系幹細胞を増殖させることを目的として、ヒト抜去歯の歯根膜細胞群中に占める歯根膜由来間葉系幹細胞の割合を測定し、FGF-2が歯根膜由来間葉系幹細胞の増殖と分化能に与える影響を検討した。

## 材料と方法

## 1. ヒト歯根膜細胞群（HPDL細胞群）の採取

HPDL細胞群は15本のヒト抜去歯歯根膜組織をout-growth法にて増殖させ15細胞群を得た。その後、growth medium（10% ウシ胎児血清、2 mM L-グルタミン、200μg/ml カナマイシン含有DMEM培地；Sigma-Aldrich社）を用いて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で継代培養後実験に使用した。

## 2. FGF-2添加培養

15のHPDL細胞群をそれぞれ播種し、growth mediumにて24時間培養した。各細胞群を20ng/mlのFGF-2添

加群と非添加群に分け10日間培養した。培養後、フローサイトメトリー解析を実施し、STRO-1<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>細胞を分取した。

3. フローサイトメトリー解析と歯根膜由来STRO-1<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>細胞の分取

FGF-2添加・非添加培養したHPDL細胞群を、0.05%（w/v）Trypsin-EDTAで回収し、PBSにて懸濁・洗浄後、ブロッキング処理を行った。その後、抗STRO-1抗体（R&D Systems社）と抗CD146抗体（AbD Serotec社）を反応させ蛍光染色した。フローサイトメトリー解析はFACSAria™（Becton Dickinson社）を用いてSTRO-1<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>細胞の割合を測定した。HPDL 2のFGF-2添加群から分取したSTRO-1<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>細胞をHPDLSC 2 f、FGF-2非添加群から分取したSTRO-1<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>細胞をHPDLSC 2とした。HPDLSC 2とHPDLSC 2 fの特異的マーカー発現と多分化能に対する対照細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞（BMMSC；Lonza社）を用い、以下の実験を行なった。

## 4. 免疫組織化学的観察

8穴チャンバースライドグラスにHPDL 2、HPDLSC 2、HPDLSC 2 f、BMMSCを播種し3日間培養した。4%パラホルムアルデヒドで固定し、ブロッキング処理をした後、抗STRO-1抗体と抗CD146抗体で蛍光免疫染色を施した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

## 5. RT-PCR法による特異的マーカー発現の検討

培養したHPDL 2、HPDLSC 2、HPDLSC 2 f、BMMSCからISOGEN（日本ジーン社）を用いて全RNAを抽出した。その後、逆転写酵素を用いてcDNAを作製し、歯根膜特異的マーカー（PLAP-1：periodontal ligament-associated protein, periostin, S100A4, scleraxis）、脂肪細胞分化マーカー（PPARγ：peroxisome proliferator-activated receptor, LPL：lipoprotein lipase）、骨関連マーカー

受付：平成23年3月30日

ー (Runx2 : runt-related gene2, Col I : type I collagen, OCN : osteocalcin) などに対応したプライマーを用いてPCRを行った。アガロース電気泳動を行いエチジウムブロマイドで可視化した。

#### 6. 脂肪細胞と骨芽細胞への分化誘導

HPDLSC 2 と HPDLSC 2 f の多分化能を検討するために、以下の細胞分化誘導培養条件下で20日間培養した。

1) 脂肪細胞への分化誘導：コンフルエント到達後、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン、0.5 mM ハイドロコルチゾン、60 μM インドメタシン含有 growth medium を用いて20日間培養した。培養後、RT-PCR法を用いPPARγ, LPLのmRNA発現を確認した。また、オイルレッドO染色を用い脂肪染色し、位相差顕微鏡で観察した。

2) 骨芽細胞への分化誘導：コンフルエント到達後、50 μg/ml L-アスコルビン酸、10 mM β-グリセロホスフェート、5 μM デキサメタゾン含有 growth medium を用いて培養した。培養後、RT-PCR法を用いRunx 2, Col I, OCNのmRNA発現を確認した。また、アリザリンレッド染色を用い石灰化結節を染色し、位相差顕微鏡で観察した。

#### 7. 統計学的解析

Tukey's testによる補正を伴うANOVA解析を行い有意検定 ( $p < 0.05$ ) を実施した。

### 結 果

15のHPDL細胞群のフローサイトメトリー解析の結果、FGF-2添加培養10日後におけるHPDL細胞群中に占めるSTRO-1+/CD146+細胞の割合は平均で0.43 ± 0.64%であり、FGF-2非添加培養群 (0%) に比較して有意に増加した。

次に、HPDL細胞群のなかでもSTRO-1+/CD146+細胞の割合が高かったHPDL 2 からSTRO-1+/CD146+細胞のみを分取した。分取したHPDLSC 2, HPDLSC 2 f両細胞群の位相差顕微鏡像では、いずれに

おいてもコロニー形成がみられ、その形態は紡錘形を呈した。対照細胞となるBMMSCの形態は多角形を示した。

また、免疫組織化学で得られたSTRO-1+/CD146+細胞の共焦点レーザー顕微鏡像から任意の5視野を用いてSTRO-1+/CD146+細胞数と核数を計測し、視野内全細胞数に対するSTRO-1+/CD146+細胞の割合を算出したところ、HPDL 2 においては19.66 ± 9.70%であったのに対して、HPDLSC 2 で72.82 ± 12.23%, HPDLSC 2 fで85.00 ± 13.69%, BMMSCで78.10 ± 23.53%であり、いずれの細胞群においても有意に高い値を示した。

さらに、HPDLSC 2 と HPDLSC 2 fにおける歯根膜特異的マーカーの発現を検討したところ、PLAP-1, periostin, S100A4, scleraxisのmRNA発現がみられた。一方で、BMMSCにおいてはPLAP-1のmRNA発現を認めなかった。

最後に、HPDLSC 2 と HPDLSC 2 fを脂肪細胞に分化させるため培養したところ、脂肪細胞分化マーカーであるPPARγ及びLPLのmRNAを発現しており、オイルレッドO染色で脂肪の蓄積が観察された。さらに、骨芽細胞に分化させるために培養したところ、骨関連マーカーであるRunx 2, Col I, OCNのmRNAを発現しており、アリザリンレッド染色陽性の石灰化塊の形成が観察された。

### 考 察

歯根膜細胞群のFGF-2添加培養は、歯根膜細胞群中のSTRO-1+/CD146+細胞の割合を増加させた。さらに、FGF-2添加培養群から分取したSTRO-1+/CD146+細胞は脂肪細胞分化能、骨芽細胞分化能を有していた。これらのことからFGF-2添加培養は歯根膜由来間葉系幹細胞であるSTRO-1+/CD146+細胞の分化能を維持させたまま、その割合を増加させることが明らかとなった。歯根膜由来間葉系幹細胞の歯周組織再生療法への応用には、FGF-2添加培養が有用である可能性が示唆された。



日高 竜宏

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系歯周歯内治療学分野

平成18年3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成18年4月 北海道医療大学歯科内科クリニック臨床研修医

平成18年3月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系歯周歯内治療学分野入局