

エピジェネティクス試薬を応用したマラッセ上皮細胞
による歯髄細胞の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

【緒言】

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るが、抜歯に至る重度歯周炎に対しては適応外となっている（齋藤，杉戸，2013；野口，三谷，2013）。歯周病抜去歯に歯根膜を再生できれば，再植により再度使用可能になるかもしれない。

歯根膜に存在して歯髄に存在しないものはマラッセ上皮細胞であることから，歯髄全体の細胞にマラッセ上皮細胞を追加し，ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて脈管構造を増強することで，歯根膜の代わりとなる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てた。本研究では，歯髄とマラッセ上皮細胞，ヒト臍帯静脈内皮細胞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. 歯髄細胞とマラッセ上皮細胞，ヒト臍帯静脈内皮細胞による歯根膜様細胞への誘導

ブタ歯髄細胞（Dental pulp cells, DP）とブタマラッセ上皮細胞（Epithelial cell rests of Malassez; ERM），およびヒト臍帯静脈内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC）の共培養による歯根膜様細胞への誘導を試みるために，以下の条件で培養を行った。培養条件；DP 単独培養群；ブタ歯根膜細胞（Periodontal ligament cells, PDL）単独培養群；DP と ERM の共培養群（DP・ERM 共培養群）；DP と ERM および HUVEC の共培養群（DP・ERM・HUVEC 共培養群）。DP・ERM 共培養群では DP:ERM 比を 20:1 になるように，DP・ERM・HUVEC 共培養群では DP:ERM:HUVEC 比を 20:1:10 になるようにそれぞれ播種し，間葉系幹細胞増殖培地（MSCGM）にて 1 週間培養した。

2. 歯根膜様細胞への誘導における mRNA 発現解析

歯根膜様細胞への誘導における mRNA 発現変化を，歯根膜関連遺伝子である *Msx1*, *Msx2*, *Ncam1*, *Vcam1*, *Postn*, *S100a4*, 間葉系幹細胞関連陽性遺伝子である *Cd29*, *Cd44*, *Cd90*, *Cd105*, 間葉系幹細胞関連陰性遺伝子である *Cd14*, *Cd45*, および内在性 Control である *Gapdh* を用いて，定量的 real-time PCR（qRT-PCR）法により解析

した.

3. エピジェネティクス試薬による ERM の脱分化

歯根膜様細胞への誘導がうまくいかなかったことから, ERM をより未分化な状態にする必要があると考え, エピジェネティクス試薬で ERM を脱分化させることを試みた.

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から, 5-Aza-2'-deoxycytidine (5Aza) を $1.0 \mu\text{M}$, valproic acid (Vpa) を 2.0mM と決定し, 2 日毎に試薬添加を行いながら, Embryonic Stem Cell Medium (ESCM) にて ERM を 7 日間培養し, 培養 8~14 日目には試薬を添加せずに ESCM のみで培養を行い, ERM 脱分化細胞 (Dedifferentiated ERM, De-ERM) の作製を行った.

2) De-ERM の mRNA 発現解析

De-ERM の mRNA 発現変化を, qRT-PCR 法により解析した.

3) De-ERM の幹細胞マーカー NANOG および OCT4 における免疫蛍光染色

免疫蛍光染色で幹細胞マーカー NANOG・OCT4 のタンパク発現レベルを検討した.

4) De-ERM の幹細胞マーカー SSEA-4 における Flow cytometry 解析

Flow cytometry で幹細胞マーカー SSEA-4 の陽性細胞率を測定した.

4. De-ERM における DNA メチル化解析

5Aza による DNA メチル化への影響を確認するために, 幹細胞マーカー *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* について, 定量的メチル化特異的 PCR 法 (qMSP) 法によるメチル化解析を行った.

5. *in situ* HDAC activity assay

Vpa によるヒストン脱アセチル化酵素阻害への影響を確認するために, *In Situ* HDAC Activity Fluorometric Assay Kit を用いて, HDAC 活性を測定した.

6. 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:De-ERM 比を 20:1, DP・De-ERM・HUVEC 共培養群では DP:ERM:HUVEC 比を 20:1:10 になるようにそれぞれ播種, MSCGM にて 7 日間培養した.

7. De-ERM を用いた PDL への誘導における mRNA 発現解析

De-ERM を用いた PDL への誘導における mRNA 発現変化を qRT-PCR 法により解析した。

8. De-ERM を用いた歯根膜様細胞における DNA メチル化解析

De-ERM を用いた歯根膜様細胞における DNA メチル化への影響を確認するために、qMSP 法にて DNA メチル化解析を行った。

【結果および考察】

1. DP と ERM, HUVEC の共培養による歯根膜様細胞への誘導

DP・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遺伝子の mRNA 発現上昇はみられなかった。この原因として、使用した 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 et al., 2018)。

2. エピジェネティクス試薬による ERM の脱分化

培養マラッセ上皮細胞のエナメルマトリックスの分泌能や幹細胞特性を回復させるために、マラッセ上皮細胞の脱分化を試みた。qRT-PCR 法の結果、5Aza・Vpa 共添加群 14 日目において Control 群に比べ幹細胞マーカーの *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, エナメルマーカーの *ameloblastin* での有意な mRNA 発現上昇を認めた。*ameloblastin* は主にエナメル芽細胞分泌期に発現することから (Landin et al. 2012), ERM 脱分化細胞は ERM に比べ、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、5Aza・Vpa 共添加群では NANOG, OCT4 および SSEA-4 の陽性発現が認められた。De-ERM は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、Control 群に比べ 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。De-ERM 作製には DNMTi である 5Aza および HDACi である Vpa の作用が影響していることが確認された。

4. DP と De-ERM, HUVEC による歯根膜様細胞への誘導および mRNA 発現解析

DP・De-ERM・HUVEC 共培養群では、歯根膜関連遺伝子 *Ncam1*, *Msx1*, *Postn*, *S100A4*, *Vcam1*, 間葉系幹細胞関連遺伝子 *Cd44*, *Cd105*, *Cd29* の mRNA 発現上昇傾向を認めた。

5. De-ERM を用いた PDL における DNA メチル化解析

歯根膜関連遺伝子 *Msx1* の DNA メチル化解析を行なった結果、DP 単独培養群に比べ PDL 単独培養群でのメチル化レベルの有意な低下を認め、DP・De-ERM・HUVEC 共培養群では DP 単独培養群に比べ PDL 単独培養群と同様にメチル化レベルの低下を認めた。DP・De-ERM・HUVEC 共培養群における *Msx1* の発現変化には、DNA メチル化変化が影響している可能性が示唆された。

【文献】

Landin MA, Shabestari M, Babaie E, Reseland JE & Osmundsen H. 2012. Gene Expression

Profiling during Murine Tooth Development. *Front Genet.* 3:139, 2012.

Tansriratanawong K, Wongwan P, Ishikawa H, Nakahara T & Wongravee K.

Cellular responses of periodontal ligament stem cells to a novel synthesized form of calcium hydrogen phosphate with a hydroxyapatite-like surface for periodontal tissue engineering. *J Oral Sci* 60(3) : 428-437, 2018.

齋藤 淳, 杉戸 博記: 第26章 GTR法. 臨床歯周病学 第2版, 医歯薬出版: 266-271, 2013.

野口 俊英, 三谷 章雄: 第27章 エナメルマトリックスタンパク質を用いた歯周組織再生療法. 臨床歯周病学 第2版, 医歯薬出版: 272-277, 2013.