

〔原著〕

## マラッセ上皮遺残細胞における細胞増殖の特異性

倉重 圭史<sup>1)</sup>, 村井 雄司<sup>1)</sup>, 首藤 かい<sup>1)</sup>, 村田 佳織<sup>1)</sup>, 山崎さや夏<sup>1)</sup>,  
林 良宣<sup>1)</sup>, 永易 裕樹<sup>2)</sup>, 安彦 善裕<sup>3)</sup>, 齊藤 正人<sup>1)</sup>

- 1) 北海道医療大学口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野
- 2) 北海道医療大学生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野
- 3) 北海道医療大学生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野

## Specific properties of the cell proliferation in epithelial rests of Malassez.

Yoshihito KURASHIGE<sup>1)</sup>, Yuji MURAI<sup>1)</sup>, Kai SHUDOU<sup>1)</sup>, Kaori MURATA<sup>1)</sup>, Sayaka YAMAZAKI<sup>1)</sup>,  
Yoshinobu HAYASHI<sup>1)</sup>, Hiroki NAGAYASU<sup>2)</sup>, Yoshihiro ABIKO<sup>3)</sup>, Masato SAITOH<sup>1)</sup>

- 1) Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.
- 2) Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Human Biology and Pathophysiology, Health Sciences University of Hokkaido.
- 3) Division of Oral Medicine and Pathology, Department of Human Biology and Pathophysiology, Health Sciences University of Hokkaido.

## Abstract

Fragments of Hertwig's epithelial root sheath persist in small clusters known as epithelial rests of Malassez (ERM) in periodontal ligaments. These ERM cells are unique epithelial cells that are present in periodontal tissue throughout the life of organisms, and play a role in the homeostasis of the periodontium through reciprocal interactions with other periodontal cells. However, the function and cell proliferation properties of ERM cells are not fully understood. This study investigated whether ERM cells have cell growth capabilities and primitive stem cell characteristics.

Undifferentiated epithelial markers and the G0 cell cycle marker of ERM *in vivo* were identified by immunohistochemical staining using anti-CK-19 and anti-p27<sup>kip1</sup> antibodies. The ERM cells were isolated from porcine periodontal ligament and cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium with serum. Porcine gingival epithelium (GE) cells were also cultured in the same way as the ERM cells. The ability of the ERM cells to proliferate was examined by a cell proliferation assay

using CyQUANT GR dye, which produces fluorescence enhancement upon binding to cellular nucleic acids. Expressions of Nanog and Stat3 as pluripotent genes and TERT as the catalytic components of telomerase were observed in the ERM cells by RT-PCR.

As a result, localization of immunohistochemical staining for p27<sup>kip1</sup> and CK-19 were detected in the cytoplasm, but for GE both were negative. The cell growth rates of the ERM cells were significantly higher than the GE cells *in vitro* ( $p < 0.05$ ). The signal of the catalytic components of the telomerase, TERT, in the ERM cells was stronger than in the GE cells by RT-PCR. The ERM cells were expressed as pluripotent genes of Nanog and Stat3 by RT-PCR.

The results suggest that The ERM cells are unusual cells that exhibit the immaturity and cell growth arrest of ectoderm-derived epithelial cells. The ERM cells may also have the properties of a unique stem cell population.

**Key words** : epithelial cell rests of Malassez, stem cell, cell proliferation

## 緒 言

歯胚の内エナメル上皮と外エナメル上皮の癒合部であるcervical loopから伸びるヘルトヴィッヒの上皮鞘は、歯胚間葉の増殖と分化を誘導し歯根象牙質やセメント質形成を促す。歯根形成後は細かく断裂し、マラッセ上皮遺残として歯根膜セメント質側に残存することで歯根膜周囲組織の恒常性維持を担っている (Luan et al., 2006)。マラッセ上皮遺残は若年者の歯根根尖部付近に多く存在し、増齢に伴い減少傾向を示すため通常は細胞増殖を停止していると考えられるが、完全に消失することはない (Luan et al., 2006)。さらに、マラッセ上皮遺残細胞は何らかの刺激により増殖を開始し、歯根嚢胞の嚢胞裏層上皮や歯原性腫瘍などの由来となり、上皮幹細胞の特性を持つとの報告もある (Lin et al., 2006; Agostini et al., 2011; Oka et al., 2012)。

細胞増殖を調節する細胞周期は、DNA合成期 (S期)、核分裂期 (M期)、およびその間を埋めるGap期 (G期)があり、さらにM期からS期にかけてはG1期、S期からM期にかけてはG2期、そしてG1期間に細胞周期を脱し休止期に入った細胞をG0期に区分されている。細胞増殖は、G1期、S期、G2期およびM期の4つのステージを1方向のサイクルで進んでいる (Cobrinik, 2005)。細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼインヒビターの一つであるp27<sup>kip1</sup>は、G1期で細胞周期を停止させる蛋白質として1994年にクローニングされた (Polyak et al., 1994; Suryadinata et al., 2010; Starostina & Kipreos, 2012)。p27<sup>kip1</sup>はG0期において核内に蓄積し、細胞周期を促進するサイクリン依存性キナーゼを抑制しており、これまでにp27<sup>kip1</sup>の強制発現により正常細胞の細胞増殖は停止することが報告されている (Sgambato et al., 1998; Yamamoto et al., 1999)。

テロメアは、染色体の両末端に存在する部分で6塩基 (-TAAGGG-) の反復配列からなる12kbpの塩基配列である (Blackburn, 2001; Blasco, 2005)。DNA複製の際に約50~150bpずつ短縮し (Harley et al., 1990; Iwama et al., 1998; Guan et al., 2007)、テロメアサイズが5000bpに近づくとサイクリン依存性キナーゼインヒビターなどの遺伝子群が発現上昇することにより、細胞増殖を停止させる (von Zglinicki et al., 1995)。Greider & Blackburn (1989) は、テロメア長と細胞の持つ分裂可能回数との間に密接な相関関係があることを明らかにした。生殖細胞、幹細胞およびガン細胞ではテロメラーゼの活性が高く、テロメアが短縮することなく細胞分裂を継続できるのに対し、体細胞ではテロメアは徐々に短縮し、その分

裂回数は規定されている (Bodnar et al., 1998)。

本研究では、歯根膜に存在するマラッセ上皮遺残細胞に細胞増殖傾向があるのか否かを確認し、マラッセ上皮遺残細胞と口腔粘膜上皮細胞を単離・培養して、細胞増殖能、テロメラーゼ活性、さらに幹細胞マーカーの発現を精査することにより、マラッセ上皮遺残細胞における細胞増殖の特異性について検証することを目的とした。

## 方 法

### 1. 組織標本の作製

マラッセ上皮遺残の組織標本は、生後6か月齢のブタ小臼歯部を用いた。下顎骨を摘出後、薄切機 (BS3000<sup>®</sup> Exact, Germany) にて厚さ5mmに薄切後、4%パラホルムアルデヒドにて1週間浸漬固定を行った。組織をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄し、10%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) にて1か月間脱灰を行った後、通法に従いパラフィン包埋し、切片を作製した。切片の一部はマイヤー・ヘマトキシリン (武藤化学, 東京) にて核染を行い、エオジンY (和光純薬, 大阪) にて染色を施し、他は免疫組織染色に用いた。

### 2. 免疫組織蛍光染色

パラフィン切片は通法に従い脱パラフィンを行い、10nmol/l, pH6.0のクエン酸ナトリウム緩衝液に浸水し、加圧および加熱して賦活化を行った。0.1Mウシ血清アルブミン (BSA, Invitrogen, OR, USA) 含有PBSにより洗浄し、3%ヤギ血清 (Dako, Denmark) により30分間ブロッキングを行った。一次抗体として1/150に希釈した抗ヒトcytokeratin (CK)-14 mouse monoclonal抗体 (Abcam, Cambridge, UK) および抗ヒトCK-19 mouse monoclonal抗体 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) と、1/250に希釈した抗ヒトp27<sup>kip1</sup> rabbit polyclonal抗体 (Abcam) を4℃にてオーバーナイトで反応させた。標本は0.1M BSA含有PBSにて洗浄後、二次抗体としてAlexa Flour<sup>®</sup> 488 goat anti-mouse IgGおよび546 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) を加え、Dapi Fluoromount-G (SouthernBiotech, AL, USA) にて封入し、共焦点レーザー顕微鏡DIGITAL ECLIPSE C1 (Nikon, 東京) を用いて観察、撮影した。

### 3. 細胞の単離および培養

マラッセ上皮遺残細胞は、生後6か月齢のブタ小臼歯歯根膜からBrunetteら (1979) の方法に従った。詳細として、細菌感染を回避するためブタ小臼歯および歯肉を5%次亜塩素酸ナトリウム溶液 (関東化学, 東京) によ

り消毒し、歯肉剥離を行った。抜歯後、歯肉粘膜上皮の混入を防止するため、歯根膜の根尖側1/2を剥離し、outgrowth法にて培養を行った。歯肉も同様にoutgrowth法を行い、歯肉粘膜上皮の培養を行った。outgrowth法にて歯根膜に含まれていたマラッセ上皮遺残の上皮細胞と、同じく歯肉粘膜からの上皮細胞は、2%ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma, MO, USA), 5 µg/ml アムホテリシンB (Sigma), 10% 非働化ウシ胎児血清 (Gibco, NY, USA) 含有Dulbecco modified Eagle medium (Gibco) で培養し、ディスパーゼ® (合同酒精, 東京) により数回酵素処理して線維芽細胞の完全な除去を行った。得られた上皮細胞はそれぞれマラッセ上皮様細胞、歯肉粘膜上皮様細胞として5回継代を行い、実験に使用した。

#### 4. 細胞増殖能

マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞の細胞増殖能を測定するために、96穴プレート (AGCテクノグラフ, 静岡) に  $1 \times 10^4$  個の細胞をそれぞれ播種し、24, 48, 72および96時間培養した。その後、CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit (Life technology, Carlsbad, CA, USA) を使用して、得られたDNA量をInfinite® F200 (Tecan, Seestrasse, Switzerland) で計測した。

#### 5. 統計学的検討

得られた測定値はIBM統計解析ソフトウェアIBM SPSS Statistics (IBM, 東京) にて統計学的検討を行った。統計処理はスチューデントのt検定を用い、危険率が5%未満の場合に有意差ありとした。

#### 6. RT-PCR

幹細胞マーカーであるNanogおよびStat3と、テロメラーゼのサブユニットである逆転写酵素, Telomere reverse transcriptase (TERT) の発現を確認するためRT-PCRを行った。マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞からTRIZOL® Reagent (Invitrogen) にてtotal RNAを抽出した。その後、Oligo (dT)<sub>12-18</sub>プライマー (Gibco) およびSuperScript® II Reverse Transcriptase (Gibco) による逆転写反応を行い、cDNAを作製した。作製したcDNAはAmpliQ Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, CA, USA) を用い、プロトコールに従って標的遺伝子の増幅を行った。Nanog, Stat3およびTERTのプライマーは表1に示す。TaKaRa PCR Thermal Cycler (タカラバイオ, 滋賀) を用い、至適条件の下で反応・増幅させた。得られた産物はMidori Green DNA Stain (Genetics,

表1 Stem cell makerの特異的primer配列

Nanog	sense	: 5'-CCGAAGCATCCATTTCCAGCG-3'
	anti-sense	: 5'-GGTATTCTGTACTGGCTGAGCC-3'
Stat3	sense	: 5'-GAAGGGTACATAATGGGCTTTATCAGT-3'
	anti-sense	: 5'-GGGCTTACCGCTGATGTCCCTT-3'
TERT	sense	: 5'-GAGGTGCACTGCGACTATGC-3'
	anti-sense	: 5'-AGACTGTTACCTGCAGGTCC-3'

東京) 含有1.5%アガロースゲル (Genetics) にて電気泳動を行い、ライトキャプチャー (AE-6961, アトー, 東京) にて当該バンドを検出した。マーカーはHae III (タカラバイオ) を使用し、コントロールとしてハウスキープング遺伝子であるGAPDHの増幅も行った。

## 結 果

1. マラッセ上皮遺残細胞および歯肉粘膜上皮細胞におけるcytokeratinおよびp27<sup>kip1</sup>の発現および局在

マラッセ上皮遺残細胞および歯肉粘膜上皮細胞におけるCK-14, -19およびp27<sup>kip1</sup>の発現および局在の観察をするために、免疫組織蛍光染色を行った。CK-14は、歯肉粘膜上皮において錯角化層に特異的に局在を認めるものの、マラッセ上皮遺残では発現が認められなかった (図1 c, d)。一方、CK-19では、マラッセ上皮遺残細胞に局在を認めたが、歯肉粘膜上皮細胞の発現はみられなかった (図1 e, f, g)。p27<sup>kip1</sup>は、CK-19発現を認めたマラッセ上皮遺残細胞に局在を認めたが、歯肉粘膜上皮細胞では発現しなかった (図1 h, i)。それぞれの組織はヘマトキシリン・エオジン染色にて確認した (図1 a, b)。

2. マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞の細胞増殖能の比較

ブタ歯根膜組織より単離・培養したマラッセ上皮様細胞、およびブタ歯肉より単離・培養した歯肉上皮様細胞において、DNA量で測定するProliferation Assay Kitを使用して細胞増殖能の比較検討を行った。24, 48, 72および96時間で測定した結果、マラッセ上皮様細胞は歯肉上皮様細胞と比較して、24, 48, 72および96時間で有意な細胞増殖を認めた (図2)。

3. マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞におけるTERT発現の比較

RT-PCRにてGAPDHのマラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞のバンドを確認後 (図3)、テロメラーゼのサブユニットであるTERTの発現をマラッセ上皮様細胞と歯肉上皮様細胞で比較した。TERTの発現は、歯肉上

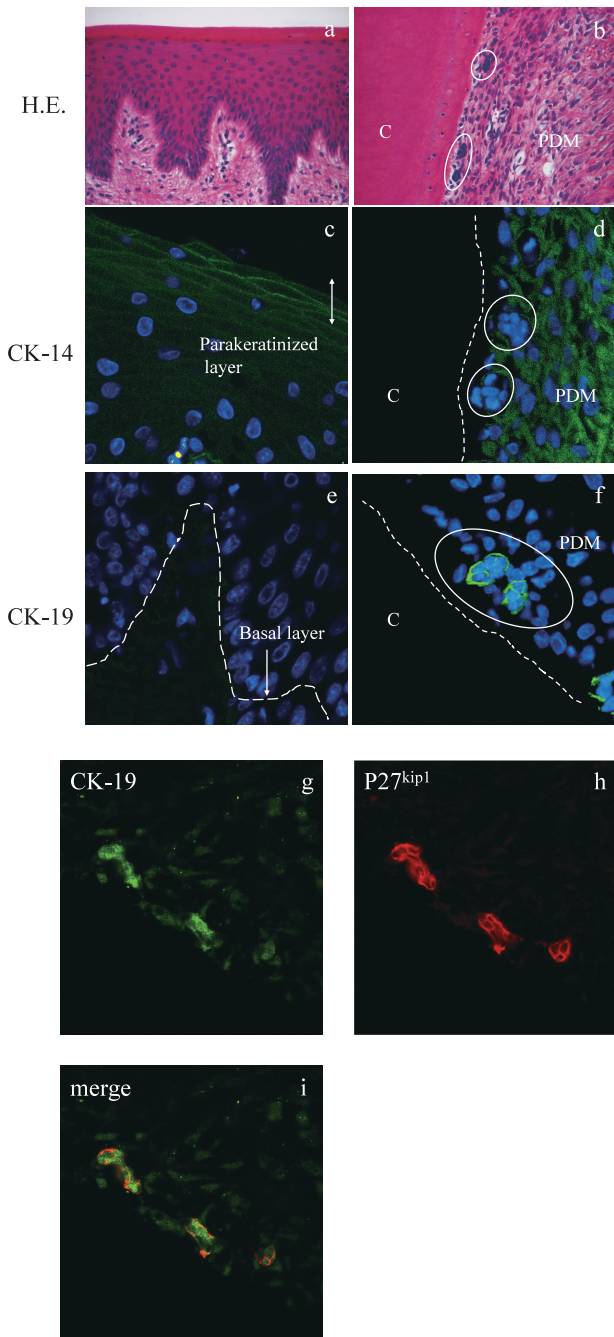


図1 歯肉粘膜上皮細胞およびマラッセ上皮遺残細胞におけるCK-14, -19およびp27<sup>kip1</sup>の局在. CK-14は歯肉粘膜上皮細胞において錯角化層で発現を認めるものの、マラッセ上皮遺残細胞では発現を認めなかった(c, d). CK-19は歯肉粘膜上皮細胞において発現を認めなかったが、マラッセ上皮遺残細胞では強発現を認めた(e, f). P27<sup>kip1</sup>はCK-19発現を認めたマラッセ上皮遺残細胞に局在を認めた(g-i). (a: 歯肉粘膜上皮細胞におけるH.E.染色像(×200), b: マラッセ上皮遺残細胞におけるH.E.染色像(×200), c: 歯肉粘膜上皮細胞におけるCK-14局在, d: マラッセ上皮遺残細胞におけるCK-14の局在, e: 歯肉粘膜上皮細胞におけるCK-19の局在, f, g: マラッセ上皮遺残細胞におけるCK-19の局在, h: マラッセ上皮遺残細胞におけるP27<sup>kip1</sup>の局在, i: マラッセ上皮遺残細胞におけるCK-19(緑)およびP27<sup>kip1</sup>(赤)の合成像. e-i: 1200倍拡大像)(b, d, f; C: セメント質, PDM: 歯根膜, 円部: マラッセ上皮遺残細胞, 点線: 歯根膜セメント質境界部)

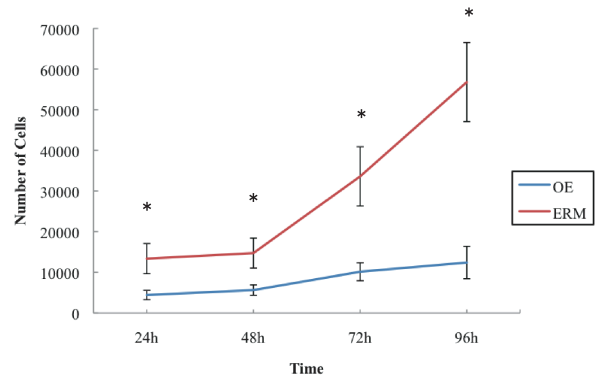


図2 細胞増殖能の測定. 歯肉上皮様細胞(OE)と比較し、マラッセ上皮様細胞(ERM)では全ての時間において有意な細胞増殖を認めた.

\*: p < 0.05

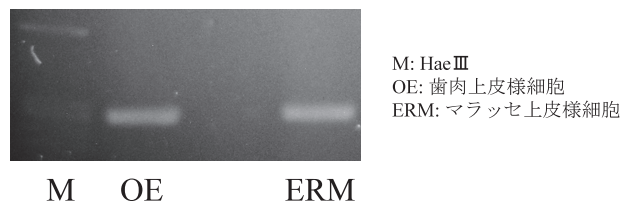


図3 GAPDHの遺伝子発現. OEおよびERMに同程度の発現を認めた.

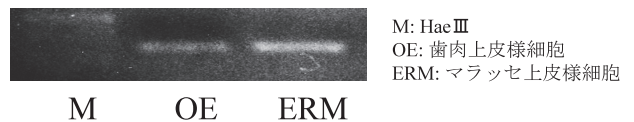


図4 TERTの遺伝子発現. ERMにおいてTERT mRNAの強発現を認めた.

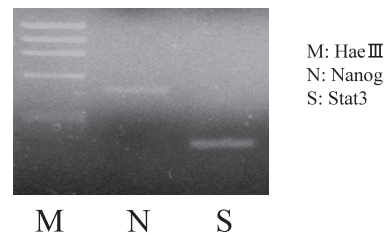


図5 幹細胞マーカーの遺伝子発現の分析. マラッセ上皮様細胞において幹細胞マーカーであるNanogおよびStat3の発現を認めた.

皮様細胞と比較してマラッセ上皮様細胞で強いシグナルを認めた(図4).

4. マラッセ上皮様細胞における幹細胞マーカーの発現  
マラッセ上皮様細胞において、幹細胞マーカーであるNanogおよびStat3の発現についてRT-PCRで確認した。マラッセ上皮様細胞ではNanogおよびStat3の発現を認めた(図5)。

## 考 察

細胞増殖がみられないマラッセ上皮遺残細胞は、CK-19とp27<sup>kip1</sup>を発現していた。単離・培養したマラッセ上皮様細胞では歯肉上皮様細胞よりも細胞増殖能が高く、テロメアーゼのサブユニットであるTERTの発現も強かった。また、マラッセ上皮様細胞は幹細胞のマーカーであるNanogおよびStat 3の発現を認めた。

### 1. マラッセ上皮遺残細胞におけるCK-19とp27<sup>kip1</sup>の発現

CK-19は分子量40kDの低分子で、ほとんどの単層上皮と非角化扁平上皮に発現することが知られている (Jain et al., 2010)。本結果においてもマラッセ上皮遺残細胞にCK-19の局在が認められた。これまでに、マラッセ上皮遺残細胞がCK-5, 7, 8, 14, 15, 17, 18, 19に陽性であるとの報告がある (Rincon et al., 2006)。そのため、マラッセ上皮遺残細胞は、様々なCKに陽性の特殊な細胞であることが示唆されている。歯と類似した発生過程を示す毛包細胞で、毛隆起部の基底細胞がCK-19陽性を示し (Demirkesen et al., 1995)、リボソームに富み未分化であることから毛隆起部細胞が幹細胞である可能性を示唆している (Akiyama et al., 1995)。Cotsarelisら (1990) は、マウスの皮膚組織に<sup>3</sup>H-thymidineを取り込ませ、成長期毛包において立毛筋付着付近の毛隆起部である毛包上皮突出部に<sup>3</sup>H-thymidine標識が長時間残留する細胞群をslow-cycling cellとみなした。また、Okaら (2012) は、マウスの歯胚形成過程にBromodeoxyuridineを投与し、マラッセ上皮遺残細胞において長期間残留していたことから、マラッセ上皮遺残細胞をslow-cycling cellとし休止期上皮幹細胞と位置づけている。slow-cycling cellは増殖が抑制された細胞群であり、何らかの影響を受けて活性化され増殖する幹細胞であると想定している。Yangら (1993) は、ヒト毛包細胞を組織培養し、毛隆起部からの上皮細胞の増殖が他の部位と比較して著しいことを示している。本結果において、毛包組織の毛隆起部上皮細胞と同様に、マラッセ上皮遺残細胞はCK-19を発現し、さらに細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼインヒビターであるp27<sup>kip1</sup>の発現も認めた。細胞質p27<sup>kip1</sup>はRhoAの活性化阻害薬との報告がある (Assoian, 2004)。Rhoファミリーは、細胞形態の主な制御因子であり (Etienne-Manneville & Hall, 2002)、Rhoサブクラスの活性化の阻害は細胞分裂を抑制することがいわれている (Morii et al., 1992)。そのため、歯根膜で周囲と孤立し一塊で存在するマラッセ上皮遺残は、増殖傾

向を示さないことから、休止期であるG0期に停滞し、さらに幹細胞のようにslow-cycling cellであると考えられる。

### 2. マラッセ上皮様細胞の細胞増殖能とTERTの発現

本結果において、マラッセ上皮遺残より単離・培養したマラッセ上皮様細胞は、歯肉粘膜上皮から得た歯肉上皮様細胞と比較して高い増殖能を示した。歯肉などの口腔粘膜上皮は、基底細胞から表層まで分化し剥離脱落するターンオーバー期間が、通常9~12日である (下野, 2011)。歯の発生は、胎生期において口腔上皮の陥入から開始されるため、マラッセ上皮遺残細胞も本来は口腔上皮細胞由来であるが、これまでの歯肉粘膜上皮細胞とマラッセ上皮遺残細胞の比較において、それぞれ似て非なる細胞であると考えられている (Rincon et al., 2006; Kurashige et al., 2008)。生殖細胞や幹細胞はテロメアーゼ活性が高いため、細胞分裂を重ねてもテロメア長を維持することができる (Günes & Rudolph, 2013)。テロメアーゼは逆転写酵素であるTERT、内在性RNA鋳型およびDyskerinなどの関連タンパク質によりサブユニットを構成し、テロメアの安定化に寄与している (Smogorzewska & de Lange, 2004; Gu et al., 2009)。TERTの発現量はテロメアーゼ活性を反映し、多くの実験に用いられている。本結果では、マラッセ上皮様細胞は歯肉上皮様細胞と比較してTERTの発現量が高いため、幹細胞の特性を有している可能性が示唆された。

### 3. マラッセ上皮様細胞における幹細胞マーカーの発現

マラッセ上皮様細胞において、RT-PCRによりNanogの発現が認められた。Nanogはホメオドメインタンパク質であり (Mitsui et al., 2003)、胚性幹細胞 (ES細胞) のマーカーの一つとして用いられている。Namら (2011) は、マラッセ上皮様細胞において上皮幹細胞マーカーおよびNanogを含むES細胞マーカーの発現を報告しており、マラッセ上皮遺残細胞は初期幹細胞を含んでいることを示唆した。マウスES細胞において多能性を維持するためには、Leukemia inhibitory factor (LIF)が必要であり、LIFを培地から取り除くとES細胞はたちまち分化を始めてしまう (Park et al., 2011)。LIFは幾つかのシグナル経路を介して、多能性を維持する転写因子であるSox2、NanogおよびOct3/4を制御していると考えられているが詳細は不明である (Griffiths et al., 2011)。近年、LIFの非存在下でも、NanogあるいはStat3を過剰発現することで、マウスES細胞の多能性を維持できることが明らかになった (Guo et al., 2009; Guo & Smith,

2010). 本結果において, マラッセ上皮様細胞はNanogおよびStat3を発現しており, マラッセ上皮様細胞の特異性が明らかとなった。

## 結 論

マラッセ遺残上皮細胞は, 口腔上皮が原基となり歯形成期間から長期間消失せずに存在している。 *in vivo*において, マラッセ遺残上皮細胞はCK-19およびp27<sup>kip1</sup>を特異的に発現しているため, 歯肉粘膜上皮とは異なった細胞分化および増殖過程にある。 マラッセ遺残上皮細胞は, 通常増殖することなく歯根膜で周囲と孤立し一塊で存在しており, p27<sup>kip1</sup>を発現しているため, 生体内においてG0期の細胞休止期にあることが示された。 マラッセ遺残上皮細胞より単離・培養したマラッセ上皮様細胞は増殖傾向が強く, TERTの発現増強を認め, さらにNanogおよびStat3などの多能性維持遺伝子の発現を認めることから, マラッセ遺残上皮細胞は幹細胞の特性を有することが示唆された。

## 文 献

- Agostini T, Sacco R, Bertolai R, Acocella A, Colafranceschi M & Lazzeri D. Peri-implant squamous odontogenic tumor. *J Craniofac Surg* 22 : 1151-1157, 2011.
- Akiyama M, Dale BA, Sun TT & Holbrook KA. Characterization of hair follicle bulge in human fetal skin : the human fetal bulge is a pool of undifferentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol* 105 : 844-850, 1995.
- Assoian RK. Stopping and going with p27kip1. *Dev Cell* 6 : 458-459, 2004.
- Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106 : 661-667, 2001.
- Blasco MA. Telomeres and human disease : ageing, cancer, and beyond. *Nat Rev Genet* 6 : 611-622, 2005.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S & Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279 : 349-352, 1998.
- Brunette DM, Heersche JN, Purdon AD, Sodek J, Moe HK & Assuras JN. In-vitro cultural parameters and protein and prostaglandin secretion of epithelial cells derived from porcine rests of Malassez. *Arch Oral Biol* 24 : 199-203, 1979.
- Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24 : 2796-2809, 2005.
- Cotsarelis G, Sun TT & Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit : implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61 : 1329-1337, 1990.
- Demirkesen C, Hoede N & Moll R. Epithelial markers and differentiation in adnexal neoplasms of the skin : an immunohistochemical study including individual cytokeratins. *J Cutan Pathol* 22 : 518-535, 1995.
- Etienne-Manneville S & Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420 : 629-635, 2002.
- Greider CW & Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337 : 331-337, 1989.
- Griffiths DS, Li J, Dawson MA, Trotter MW, Cheng YH, Smith AM, Mansfield W, Liu P, Kouzarides T, Nichols J, Bannister AJ, Green AR & Göttgens B. LIF-independent JAK signalling to chromatin in embryonic stem cells uncovered from an adult stem cell disease. *Nat Cell Biol* 13 : 13-21, 2011.
- Gu B, Bessler M & Mason PJ. Dyskerin, telomerase and the DNA damage response. *Cell Cycle* 8 : 6-10, 2009.
- Guan JZ, Maeda T, Sugano M, Oyama J, Higuchi Y & Makino N. Change in the telomere length distribution with age in the Japanese population. *Mol Cell Biochem* 304 : 353-360, 2007.
- Guo G & Smith A. A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. *Development* 137 : 3185-3192, 2010.
- Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W & Smith A. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136 : 1063-1069, 2009.
- Günes C & Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 152 : 390-393, 2013.
- Harley CB, Futcher AB & Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345 : 458-460, 1990.
- Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M & Shay JW. Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 102 : 397-402, 1998.
- Jain R, Fischer S, Serra S & Chetty R. The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18 : 9-15, 2010.

- Kurashige Y, Saitoh M, Nishimura M, Noro D, Kaku T, Igarashi S, Takuma T, Arakawa T, Inoue T & Abiko Y. Profiling of differentially expressed genes in porcine epithelial cells derived from periodontal ligament and gingiva by DNA microarray. *Arch Oral Biol* 53 : 437-442, 2008.
- Lin LM, Huang GT & Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod* 33 : 908-916, 2006.
- Luan X, Ito Y & Diekwisch TG. Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev Dyn* 235 : 1167-1180, 2006.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113 : 631-642, 2003.
- Morii N, Teru-uchi T, Tominaga T, Kumagai N, Kozaki S, Ushikubi F & Narumiya S. A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *J Biol Chem* 267 : 20921-20926, 1992.
- Nam H, Kim J, Park J, Park JC, Kim JW, Seo BM, Lee JC & Lee G. Expression profile of the stem cell markers in human Hertwig's epithelial root sheath/Epithelial rests of Malassez cells. *Mol Cells* 31 : 355-360, 2011.
- Oka K, Morokuma M, Imanaka-Yoshida K, Sawa Y, Isokawa K & Honda MJ. Cellular turnover in epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament of the mouse molar. *Eur J Oral Sci* 120 : 484-494, 2012.
- Park Y, Kim JH, Lee SJ, Choi IY, Park SJ, Lee SR, Sung HJ, Yoo YD, Geum DH, Choi CW, Kim SH & Kim BS. Human feeder cells can support the undifferentiated growth of human and mouse embryonic stem cells using their own basic fibroblast growth factors. *Stem Cells Dev* 20 : 1901-1910, 2011.
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P & Massagué J. Cloning of p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78 : 59-66, 1994.
- Rincon JC, Young WG & Bartold PM. The epithelial cell rests of Malassez--a role in periodontal regeneration? *J Periodontal Res* 41 : 245-252, 2006.
- Sgambato A, Zhang YJ, Ciaparrone M, Soh JW, Cittadini A, Santella RM & Weinstein IB. Overexpression of p27<sup>Kip1</sup> inhibits the growth of both normal and transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 58 : 3448-3454, 1998.
- 下野正基. 新編治癒の病理. 医歯薬出版, 2011.
- Smogorzewska A & de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73 : 177-208, 2004.
- Starostina NG & Kipreos ET. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends Cell Biol* 22 : 33-41, 2012.
- Suryadinata R, Sadowski M & Sarcevic B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep* 30 : 243-255, 2010.
- Yamamoto H, Soh JW, Shirin H, Xing WQ, Lim JT, Yao Y, Slosberg E, Tomita N, Schieren I & Weinstein IB. Comparative effects of overexpression of p27<sup>Kip1</sup> and p21 Cip1/Waf1 on growth and differentiation in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 18 : 103-115, 1999.
- Yang JS, Lavker RM & Sun TT. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential. *J Invest Dermatol* 101 : 652-659, 1993.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W & Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence? *Exp Cell Res* 220 : 186-193, 1995.



倉重 圭史

平成15年 3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成19年 3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成19年 4月 北海道医療大学口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野 助教

平成22年 4月 同上 講師