

氏名	中島 隆
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4927号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	抜歯窩肉芽組織からの間葉系幹細胞の同定
学位論文審査委員	山本 敏男 教授      滝川 正春 教授 窪木 拓男 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

組織幹細胞は、様々な組織に存在し、組織の発生、発育から恒常性の維持、創傷治癒など、その機能と性質は多岐にわたる。そして、組織幹細胞の一つである骨髄由来間葉系幹細胞(Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cells: BMSCs)は、すでに臨床応用され、骨再生、表皮水疱症、移植片対宿主病などへの有効性が明らかにされつつある。しかしながら、組織幹細胞を採取する条件により細胞増殖能や多能性が制限されることがあり、十分量の細胞数の確保が困難になることや、幹細胞治療の効果を期待できないことが知られている。そこで本研究では、周囲組織から多くの未分化幹細胞が遊走される創傷治癒部位に注目し、歯科臨床で簡単にアクセス可能な抜歯後治癒過程にある抜歯窩肉芽組織から、組織再生に最適化された幹細胞が採取できないかと考え、抜歯窩肉芽組織から細胞を分離し、その細胞の性質および有用性を検討した。

### 【方法】

イヌ抜歯窩肉芽組織より未分化な細胞を分離するため、抜歯窩の経時的変化を組織学的に検討し、分化度の低い細胞が多量に含まれる抜歯3日および10日目に肉芽組織のサンプリングを実施した。採取した抜歯窩肉芽組織は、細片化と酵素処理によって単一細胞を得て、コロニー形成能を指標に幹細胞候補細胞の分離を行った。対照として、同一個体の大腿骨骨髓液から、dog BMSCs (dBMSCs)を採取し、使用した。初めに、イヌ抜歯窩肉芽組織由来細胞(dog Dental Socket derived Cells: dDSCs)の特徴を明らかにするため、コロニー形成能、細胞増殖能、細胞遊走能、テロメラーゼ活性を評価した。また、細胞膜表面抗原発現動態をフローサイトメトリーを用い確認した。次に、dDSCsの多分化能を、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞の分化誘導培地を用いて培養し、*in vitro*にて評価した。また、免疫不全マウス背部皮下に $\beta$ -TCPと混合し移植し、異所性骨形成能を評価した。最後に、歯周組織再生治療への応用を考慮し、イヌ下顎第一大臼歯近心に一壁性骨欠損ならびにセメント質を除去し根面の象牙質を完全に露出させ、歯周病モデルを作製した。そこへ、UPCell<sup>®</sup>を用い同一個体から採取したdDSCsの細胞シートを作製し、根面に密着させるよう移植し、骨欠損部を $\beta$ -TCPで満たした。8週後に組織を回収し、組織学的に検討した。

## 【結果】

抜歯3日目の抜歯窩肉芽組織から、線維芽細胞様の細胞形態を示す細胞を分離することができた。一方、抜歯10日目の抜歯窩肉芽組織から採取した細胞は、細胞増殖に乏しく、十分量の細胞数を分離することができなかった。そこで、以降の実験には、抜歯3日目の抜歯窩肉芽組織から分離した細胞をdDSCsとして使用し、dBMSCsと比較検討した。

dDSCsの細胞増殖能、遊走能、コロニー形成能はdBMSCsと比較して有意に高かった。テロメラーゼ活性は、dBMSCsと比較し、高い傾向を示した。また、dDSCsの細胞膜表面抗原発現動態は、dBMSCsと同様に、間葉系幹細胞マーカーであるCD44、CD90、CD271が陽性、かつ血球系マーカーであるCD34、CD45が陰性であった。多分化能を検討した結果、*in vitro*において、dDSCsは骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有していた。また、異所性骨形成能を検討した結果、dBMSCs移植群では $\beta$ -TCP周囲に骨様硬組織を、その内部に脂肪組織を形成している像が観察された。一方、dDSCs移植群では形成された硬組織内部は線維性組織で満たされ、その線維の一部が硬組織に侵入している像が観察された。最後に、イヌ歯周病モデル実験において、dDSCs移植群では、露出象牙質表面にセメント質様硬組織、ならびにその周囲に骨様硬組織が形成され、それら硬組織をつなぐようにシャープー線維様組織が両組織に入り込む像が観察された。

また、同じ抜歯窩から繰り返し間葉系幹細胞の採取が可能であることを確認するため、一度肉芽組織を採取した抜歯窩から3日後に再度肉芽組織を採取し、細胞を分離し（dDSCs-repeat:dDSCs-r）、その細胞の性質を解析した。その結果、dDSCs-rはdDSCsと比較し、類似した性質を有していることが明らかとなった。

## 【考察】

本研究では、幹細胞移植治療のための新たな細胞ソースの探索を目的に、創傷治癒組織である抜歯窩に着目した。抜歯窩肉芽組織から間葉系幹細胞を分離し、細胞の性質および有用性を検討した結果、抜歯3日後の抜歯窩肉芽組織からコロニー形成能を有した細胞を分離・培養可能であることが明らかとなった。そしてこの細胞の性質を検討した結果、抜歯窩肉芽組織から分離される細胞は骨髄由来のものと比較し、類似した細胞膜表面抗原発現動態を示し、コロニー形成能、細胞増殖能および細胞遊走性が有意に高い細胞群であった。この結果は骨髄と比べ抜歯窩から、より効率的に質の高い間葉系幹細胞もしくは前駆細胞が採取可能であることを示している。また、抜歯窩から採取した細胞群の分化能を確認したところ、骨髄由来のものとは比べ遜色ない多分化能を有していた。さらに本細胞は、骨組織再生能のみならず、シャープー線維を含む歯周組織再生能をも有する細胞群である事を確認した。これは、本細胞が歯周組織再生療法に適した細胞であることを示すと同時に、抜歯窩の創傷治癒には残存した歯根膜細胞・組織が関与しており、間葉系幹細胞ニッチがそこに存在する可能性を示唆している。

## 【結論】

1. イヌ抜歯窩肉芽組織から，コロニー形成能および多分化能を有する細胞群が採取できた。
2. イヌ抜歯窩肉芽組織由来細胞は，骨髄由来間葉系幹細胞と比較し，細胞増殖能，遊走性が優れていた。
3. イヌ抜歯窩肉芽組織由来細胞は，セメント質を含む歯周組織再生能を有した細胞群であった。

以上より，簡便にアプローチ可能な抜歯窩内の肉芽組織から，間葉系幹細胞を分離することができ，骨髄組織などに変わる新たな幹細胞供給源となりうる事が示された。

## 学位論文審査結果の要旨

本研究は、臨床現場において有効性が指摘されている間葉系幹細胞の新たな細胞ソースの探索を目的に、創傷治癒組織である抜歯窩に注目し、抜歯窩肉芽組織から間葉系幹細胞を分離、その細胞の性質および有用性を検討したものである。

方法として、イヌ（ビーグル成犬、n=8）抜歯窩肉芽組織を、細片化と酵素処理によって単一細胞を得て、コロニー形成能を指標にイヌ抜歯窩肉芽組織由来細胞（Dental Socket derived Cells: DSCs）の分離を行っている。骨髄由来間葉系幹細胞（Bone Marrow Stromal Cells: BMSCs）を対照とし、DSCs の幹細胞性を検討している。

その結果、DSCs は、BMSCs と同様の細胞膜表面抗原発現動態を示し、*in vitro* において、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への多分化能を有していた。また、DSCs は、BMSCs と比較し、コロニー形成能が1.8 倍（ $p < 0.01$ , One way ANOVA/Tukey）、細胞遊走能が2.6 倍（ $p < 0.001$ , One way ANOVA/Tukey）、細胞増殖能が1.3 倍（ $p < 0.001$ , One way ANOVA/Tukey）高かった。免疫不全マウスを用い、異所性骨形成能を評価した結果、BMSCs、DSCs 移植群ともに、骨様硬組織の形成を認め、硬組織内部はBMSCs 移植群では、脂肪組織で満たされていたが、DSCs 移植群は線維性組織で満たされ、その線維の一部が硬組織に侵入する像が観察された。イヌ歯周病モデルにDSCs 細胞を移植した結果では、歯周組織様組織の再生が観察された。また、同じ抜歯窩から繰り返し間葉系幹細胞の採取が可能であることを確認するため、一度肉芽組織を採取した抜歯窩から3日後に再度肉芽組織を採取し、細胞を分離（DSCs-repeat: DSCs-r）、その細胞の性質を解析した結果、DSCs-rはDSCsと比較し、類似した性質を有していることを明らかにした。

以上の結果から、歯科臨床で簡単にアクセス可能な創傷治癒過程にある抜歯窩に、コロニー形成能および多分化能を有する細胞群が存在し、それら細胞群は骨髄由来間葉系幹細胞と比較し、細胞増殖能、遊走能が優れていた。

本研究により、抜歯窩肉芽組織に間葉系幹細胞の存在が確認されたと同時に、質の高い間葉系幹細胞の新たな細胞ソースとなりうる事が示された。よって審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。

平成26年1月17日午後5時からインプラント再生補綴学分野教授室において論文審査および最終試験を行った。まず、本申請者に研究の概要を説明させ、続いて最終試験が行われた。

試験は下記の内容を問うものであった。

1. 本研究の目的について
2. 抜歯窩肉芽組織由来細胞と骨髄由来間葉系幹細胞との違いについて
3. 本実験に用いた抜歯窩肉芽組織由来細胞の継代数、またそれに伴う細胞の性質の変化について
4. 抜歯窩肉芽組織由来細胞の細胞起源の解釈について

5. 抜歯窩肉芽組織由来細胞が様々な細胞の集合体であることへの解釈について
6. 抜歯窩肉芽組織由来細胞の中に歯根膜幹細胞が含まれている可能性について
7. 歯周病モデルへの細胞移植実験において、他の細胞を用いた過去の報告について
8. 抜歯窩肉芽組織を採取することの問題点について
9. 同一の抜歯窩から採取した細胞の増殖能が有意に高いことへの考察について

これらの試問に対していずれも適切な回答が得られた。よって、試験担当者は本申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに足る学識を有すると認めた。