

最近のトピックス

歯の損傷後の歯髄修復機構の新規仮説について

New hypothesis on the mechanisms regulating the pulpal healing process following tooth injuries

新潟大学 大学院医歯学総合研究科
顎顔面再建学講座 硬組織形態学分野

大島 勇人

Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue,
Department of Tissue Regeneration and Reconstruction,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental
Sciences

Hayato Ohshima

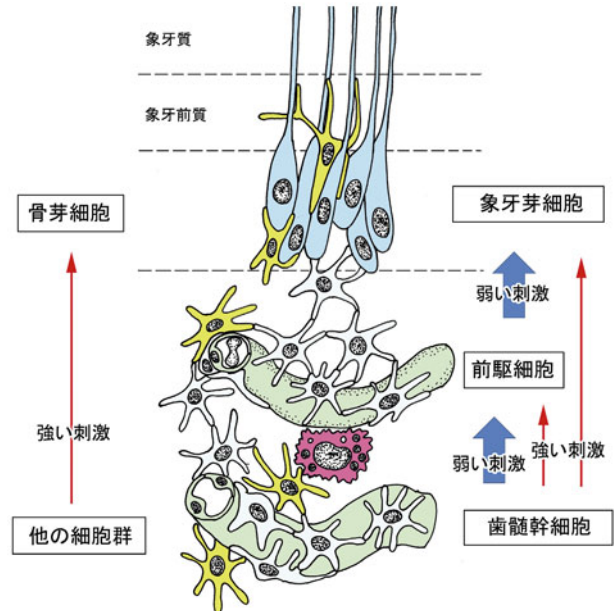


図1 歯の損傷後の歯髄修復機構の新規仮説。歯髄には前駆細胞と歯髄幹細胞が存在し、損傷の程度により異なる修復機構が働く。さらに、骨髄由来細胞などの他の細胞群との相互作用で象牙質形成と骨組織形成の少なくとも二つの治癒パターンが生じると考える。黄色の細胞：樹状細胞，赤色の細胞：マクロファージ

【はじめに】

歯髄は高い修復能力をもち、象牙質が咬耗や摩耗で磨り減ったり、う蝕になったり、治療で削られたりすると、歯髄内では損傷部位に限局して象牙質が形成される。歯の再植・移植後の歯髄治癒過程では、歯髄内に象牙質が形成される場合に加え歯髄が骨組織に置換する場合がある。最近の我々の研究により、歯の損傷後の歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現すると象牙質形成が、同じ由来をもつ破骨細胞系細胞が同部位に出現すると骨組織形成が惹起されることが明らかになっており¹⁻⁴⁾、歯髄修復の場における微小環境と細胞集団の変化が歯髄治癒過程を調節していると考えられる。

これまで我々は、歯の切削、再植、移植等の歯の損傷動物実験モデルを確立し、外的侵襲後の歯髄治癒機構を検索してきた⁵⁾。これらの実験結果に加え最近の歯髄幹細胞に関する我々の研究結果⁶⁾から、従来考えられていたものと異なる歯の損傷後の歯髄修復機構の新規仮説(図1)を提唱したので紹介する。この仮説においては、歯髄には前駆細胞と歯髄幹細胞が存在し、歯の損傷の程度により異なる修復機構が働く。さらに血行性に局所に来る可能性のある骨髄由来細胞などの他の細胞群との相互作用で象牙質形成と骨組織形成の少なくとも二つの治癒パターンが生じると考える。

【象牙質・歯髄複合体の特殊性】

象牙質はコラーゲン線維を主成分とする基質に磷酸カルシウムの水酸化アパタイト結晶が沈着したもので、成分から見ると骨と類似しているが、象牙質は骨とは似て非なる組織である。一番の大きな違いは、骨は絶えず吸収と形成を繰り返しながら新しい骨に置き換わる(リモデリング)のに対し、象牙質は一度造られるとリモデリングされることがない。骨のリモデリングという現象は血清カルシウムの恒常性に関与しているが、一度象牙質に沈着したカルシウムが再利用されることはない⁷⁾。さらに、骨の場合は形成細胞である骨芽細胞がみずから造った骨に埋め込まれ骨細胞となり、その後の骨を造るのは他の細胞に任せてしまう。一方、象牙質の場合は象牙芽細胞がその細胞突起を象牙質に埋め込むだけで、細胞の本体は常に歯髄内にあり、この突起が象牙質内に無数に存在する象牙細管の中を走っている。このような象牙質と骨との違いに関して、系統発生的に両者の由来を考えてみると興味深い⁷⁾。両者の起源は脊椎動物

の中でも進化的に最も古い無顎類(異甲類)の甲羅(皮甲)に辿り着く。異甲類は内骨格を持たず、外骨格であるアスピディンと呼ばれる骨様組織の最表層が細管構造をもつ結節状の象牙質で覆われているのである。この構造は皮甲と呼ばれ、象牙質があたかも皮膚の代わりをしている外観を呈する。この様に、骨と象牙質は進的にはほぼ同時に派生し、脊椎動物が外骨格から内骨格へ移行する過程で骨が体の支持組織として進化したことが分かる。それに対し、皮甲から皮歯、そして咀嚼器としての歯が派生する過程で象牙質は感覚器として進化した硬組織であると言えるのではないだろうか⁸⁾。この考えに従えば、感覚器であるが故に、象牙質基質の中には象牙芽細胞突起が存在し、外的な刺激を受容し反応する能力が象牙質・歯髄複合体に備わっていると言える。

次に象牙質と歯髄の由来を考えてみる。両者は共に歯乳頭に由来する間葉組織であるが、その歯乳頭の由来は、脳や脊髄などの中枢神経の原基(神経管)が造られる時に、上皮から間葉にこぼれ落ちた細胞群(神経堤細胞)である。神経堤細胞は、歯のできる領域(主に第一鰓弓)まで遊走し、歯胚上皮の誘導を受けて歯乳頭細胞に分化する。さらに歯胚上皮(内エナメル上皮)に面した歯乳頭細胞が象牙芽細胞に分化する。象牙芽細胞はその細胞突起を象牙細管中に伸ばしているため、ひとたび象牙質に侵襲が加わると象牙細管が口腔内に露出することになり、象牙細管もしくは象牙芽細胞突起を通して歯髄が影響を受け、引き続き歯髄炎が惹起される。このように、象牙質と歯髄は、発生学的・構造的・機能的に互いに密接な関係を持つことから、歯の外的刺激に対する歯髄反応は、象牙質・歯髄複合体の反応として捉える必要がある⁵⁾。

【歯の切削後の歯髄反応】

我々のからだは、外傷や切断などの物理的損傷に対する治癒能力を備えており、その傷を受けた場所に依じて修復し、元通りに再生する。象牙質・歯髄複合体においても再生現象が知られており、歯の損傷に対して、歯髄は再生能力を有している。象牙質の修復に関して、咬耗・摩耗、う蝕、歯の切削等の刺激に反応して局所的に形成される象牙質を第三象牙質と呼ぶ。そして、反応の開始の原因となる外来刺激の強さの程度により、さらに反応象牙質と修復象牙質に分類される。反応象牙質が、適度な刺激に反応して、生き残った象牙芽細胞によって形成されるのに対し、修復象牙質は、損傷部位の象牙芽細胞の死後、新しく分化した象牙芽細胞により形成される⁹⁾。

ラットを用いた歯の切削後の歯髄治癒過程^{2,3,10,11)}では、損傷部位(象牙質の厚みのほぼ半分を削られた部位)の

象牙芽細胞が機械的刺激により死滅し、6時間後にはマクロファージや好中球により変性細胞が除去される。12時間後には局所の掃除が終わり、歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現し、その細胞突起を象牙細管の中に深く侵入させる。2日以降に新しく分化した象牙芽細胞が配列すると、樹状細胞は歯髄・象牙質界面から姿を消す。樹状細胞は初期免疫応答に重要な役割を果たす細胞なので、この現象は象牙細管経由で侵入する可能性のある外来抗原を待ち構えるために集まるとも考えられるが、歯髄が治癒に向かわないと見られない。この細胞の出現とその機能に明確な答えは今のところないが、少なくとも歯髄の治癒過程に一過性に起こる興味深い現象であることは確かである。

上記の様な歯の切削後の象牙芽細胞の消失と再生の過程は、象牙芽細胞の分化マーカーである低分子量のストレスタンパク質 heat-shock protein (HSP)-25 発現を見ることで捉えることが出来る。HSP-25 は多機能タンパク質であり、シャペロン機能、アポトーシスの抑制、アクチンフィラメントとの関与などが知られているが、発生と分化過程への関与も報告されている¹²⁾。歯の発生過程においては、細胞増殖が終わると歯髄間葉細胞が一過性に HSP-25 を発現し、その後象牙芽細胞が持続的に HSP-25 を発現することが知られており^{13,14)}、歯の切削や再植などの歯の損傷後の歯髄修復過程では再生象牙芽細胞が HSP-25 を発現することが明らかになっている^{2,3,4,15-19)}。これらの結果は HSP-25 が象牙芽細胞の優れた分化マーカーであることを示している。歯の損傷後の HSP-25 発現を電子顕微鏡レベルで観察すると、象牙芽細胞の損傷程度と HSP-25 発現との間に相関が見られ、HSP-25 が細胞の生死を区別するマーカーになることが示された^{2,19)}。

上記の歯の切削実験モデルでは、象牙芽細胞が機械的に損傷を受け変性した後に、限局した炎症反応が起こり、局所的に象牙芽細胞の再生が起こる。すなわち、弱い歯髄損傷に引き続き象牙芽細胞再生実験モデルである。成書によれば、歯の切削後の歯髄修復過程における細胞動態は、細胞分裂、細胞遊走、細胞接着、細胞分化のステップを踏むと考えられている⁹⁾。しかし、最近の我々の研究結果¹⁹⁾においては、術後1日に細胞の分化と遊走が起こり、細胞増殖活性が増加する術後2日には象牙芽細胞分化がほぼ終了していることが明らかになった。その後、損傷を受けた歯髄広範囲にわたる細胞増殖活性の亢進は術後5日まで続いた。従って、歯の切削後の再生象牙芽細胞が歯髄・象牙質界面に配列した後に、損傷を受けた歯髄の広範囲にわたり細胞増殖が亢進する事実より、歯髄内には細胞増殖前に象牙芽細胞に分化する前駆細胞が存在し、再生象牙芽細胞分化後に歯髄の組織改変が進行することが明かとなった。増殖細胞の一部が象牙

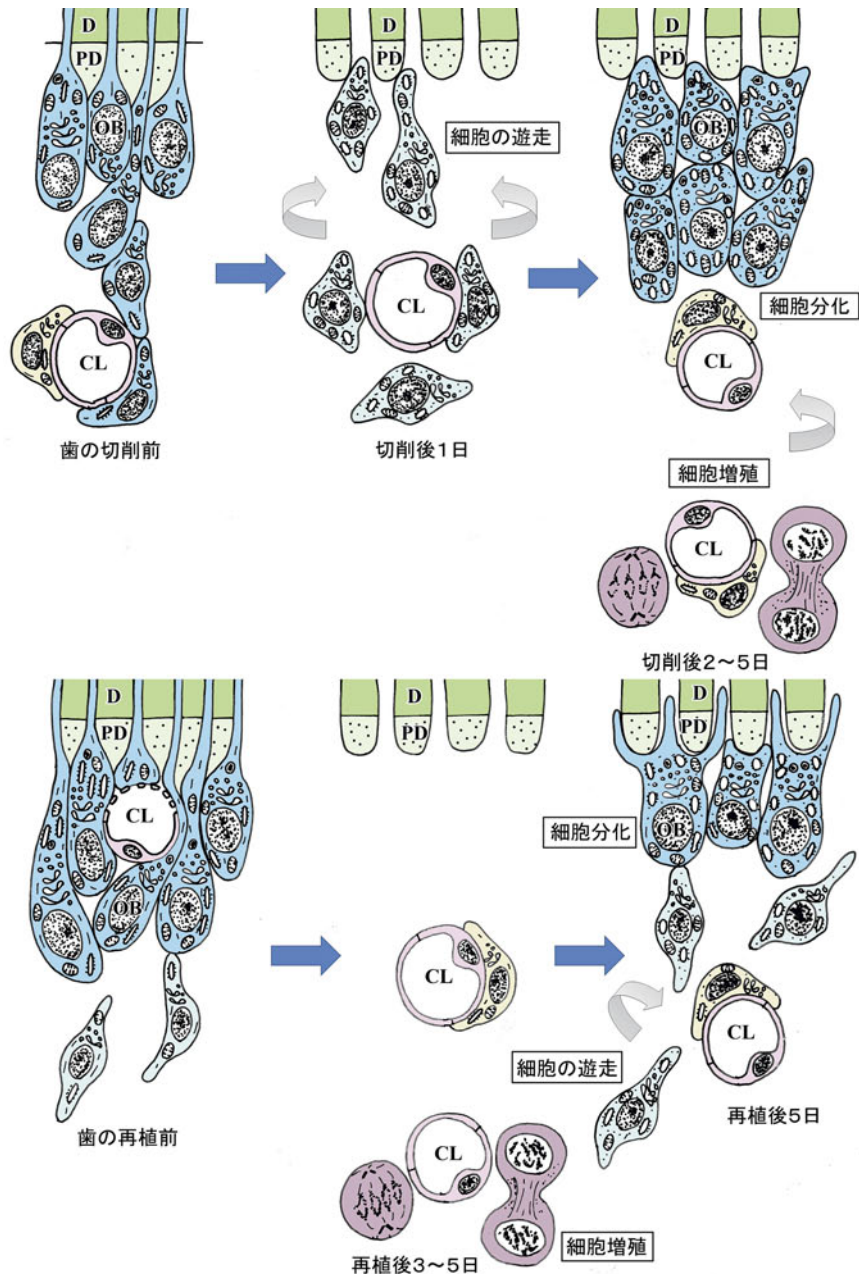


図2 歯の切削／再植後の治癒過程における歯髄・象牙質界面を示す図。歯の切削後には象牙芽細胞下層の間葉細胞が細胞増殖せず象牙芽細胞に分化し、その後歯髄内広範な細胞増殖の亢進が起こるのに対し、歯の再植後には歯髄広範にわたる細胞増殖の後に象牙芽細胞分化が起こる。CL：血管，D：象牙質，OB：象牙芽細胞 PD：象牙前質

芽細胞に分化することは否定できないが、歯髄には細胞増殖をせずに象牙芽細胞に分化する前駆細胞と歯髄広範の修復に働く組織幹細胞が配置している可能性を示すものとなった（図2）。

【歯の再植・移植後の歯髄反応】

我々はこれまで、ラット及びマウスを用いた動物実験モデルにより歯の再植後の歯髄治癒過程を検索してき

た^{1,2,4,15,20}。歯の再植後の歯髄では、根尖で神経と血管が切断されるので、歯髄内の血行が遮断されることになる。血行の遮断は歯髄細胞への酸素供給が低下し、象牙芽細胞は酸素不足で死んでいくことになる。低酸素状態を強いられた象牙芽細胞が生き残るか否かは血行回復までの時間にかかっていると思われるが、影響を与える因子として抜歯から歯の再植までにかかった時間や歯髄の機械的な傷害程度が考えられ、対合歯による咬合性外傷も大きなファクターとなる²⁰。

象牙芽細胞が死んでしまうと、死んだ象牙芽細胞に代わり歯髄間葉細胞が新しい象牙芽細胞に分化する。低酸素状態により象牙芽細胞が死滅し、局所の掃除が終わると術後3日後に歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現し、その細胞突起を象牙細管内に深く侵入させ、5日後に新しく分化した象牙芽細胞が配列すると、その後歯髄・象牙質界面から姿を消す。歯の切削後の歯髄治癒過程においても同様な現象が起こることは既に述べたが、歯の切削であれ、歯の再植後であれ、歯髄の治癒過程において、樹状細胞の出現から象牙芽細胞の分化までの時間は変わらない(約2日間)。歯の再植後の象牙芽細胞再生実験モデルにおいても、歯髄におけるHSP-25発現を調べることで、象牙芽細胞の消失と再生過程をモニターすることが可能になる(但し、マウス実験系においてはHSP-25発現が弱く、象牙芽細胞分化マーカーとしてはネスチンの有用性が高い^{20,23})。歯の切削モデルに比較すると、歯髄の損傷が大きく殆どすべての象牙芽細胞が変性する歯の再植実験モデルは、強い歯髄損傷と広範な炎症反応に引き続く象牙芽細胞再生実験モデルであると言える。同モデルでは、象牙芽細胞の分化が術後5日に起こり、歯髄修復のタイミングも遅れることとなるが、歯髄内細胞増殖活性が増加するタイミングは術後3~5日で、歯の再植後には、まず細胞増殖が起こり、その後細胞分化が起こることが分かる²⁰。従って、歯が再植のような強い損傷を受ける場合は、象牙芽細胞に加え、前駆細胞も損傷を受けることが予想され、歯髄幹細胞が増殖後に直接象牙芽細胞に分化すると考えられた(図2)。

歯の再植後には、歯髄内に象牙質が形成される場合と歯髄が骨組織に置換する場合があることは既に述べた。歯の再植後に骨芽細胞分化が起こるのは、術後12~14日であり、象牙芽細胞分化に比べて大分遅い⁴。歯髄細胞の骨組織形成能は我々の歯の移植実験においても確認されている。マウスの歯を抜いて、歯冠部だけを軟組織に移植すると、歯髄内には象牙質に加え、骨形成が確認できた²¹。興味深いことに、既存の象牙質に連続して象牙質が造られているが、象牙質から離れた部位では骨が形成されている。さらに、歯の再植後の歯髄治癒過程と同様に歯髄内における破骨細胞系細胞の出現が骨形成と関係があることも示された。また、既存の象牙質表面においても、この破骨細胞系細胞が出現すると骨組織が誘導される。この事実は、象牙芽細胞の分化には、象牙質などの細胞外基質の足場が必要であると共に、局所の細胞間相互作用が硬組織形成に重要であることを示唆している。歯の切削の場合は、局所で象牙芽細胞が死ぬと、そこに新しい象牙芽細胞が供給され修復象牙質形成が惹起される。一方、歯の再植の場合は、歯髄が広範な損傷を受けるために象牙芽細胞と骨芽細胞に分化する能力の

ある二つの細胞群のバランス、もしくは両者の分化を調節しているシグナルのバランスがくずれ、場合によっては歯髄が完全に骨に置換すると考えられる。それに対して正常歯髄では、骨芽細胞への分化を抑制する何らかのメカニズムが働いているのかもしれない。

歯髄内骨組織形成に分化する細胞の由来を確かめるために、歯冠部の軟組織への移植実験とROSA26遺伝子改変マウスを組み合わせた実験を行った²²。ROSA26領域とはマウス第6染色体に存在するゲノム領域で、ここにガクトシダーゼ(ラクトースを分解する酵素)をコードした遺伝子(*LacZ*と呼ぶ)が挿入されたマウス(ROSA26遺伝子改変マウス)は全身すべての細胞が、ある染色方法(X-gal染色)で青色を呈する。この実験により、象牙芽細胞系細胞と骨芽細胞系細胞が歯髄に存在し、歯の移植後の歯髄再生過程においては、ホストとドナー(歯髄)の双方の細胞が骨組織形成に関与することが明らかになった。ホスト細胞の由来については、周囲の軟組織細胞に加え、歯の移植後に血行性に局所に到達する骨髄由来細胞の可能性もあると考えられた。

【歯髄幹細胞と歯髄再生】

歯の損傷後の歯髄修復に関わる細胞の供給源になる歯髄幹細胞について、その存在については異論がないところであるが²⁴、その存在部位については推測の域を出ておらず、明らかになっていないのが現状であった。最近我々は、幹細胞の特徴である非対称分裂(細胞分裂後に幹細胞と一時的増幅細胞に分かれる特性)を利用して幹細胞をプロモデオキシウリジン(BrdU)でラベルする胎生期ラベリング法を確立することに成功し⁶、歯の切削及び再植動物実験モデルと組合せ、歯髄幹細胞の局在と分化能を検索した。胎生期ラベリング法でラベルした細胞とSTRO-1やCD146などの幹細胞マーカー、幹細胞としての特徴をもつと考えられているSide population(SP)細胞との関係を検索し、濃くラベルされる歯髄幹細胞と顆粒状にラベルされる一次的増幅細胞とを区別することができ、歯髄幹細胞は歯髄中央部血管周囲に局在すると考えられた。

胎生期ラベリング法によってラベルされた歯髄幹細胞と一次的増幅細胞は細胞分裂後も、(ラベルが薄まり消失する可能性もあるが)核内にラベルが残るので、その後の運命を追跡することが可能となる。歯の再植後には少なくとも象牙質形成と骨組織形成の二つの治癒パターンがあることは上記で述べたが、歯髄幹細胞と思われる細胞が新しく分化した象牙芽細胞にコミットされていたのに対し、骨芽細胞にはコミットされなかった。したがって、強い損傷モデルである歯の再植後には、象牙芽細胞や前駆細胞が死滅するために、歯髄幹細胞が直接象牙芽

細胞に分化したと考えられた。一方、骨芽細胞は胎生期ラベリング法により濃くラベルされる歯髄幹細胞とは別の細胞群に由来していると考えられた。歯の切削後には、顆粒状にラベルされる細胞が新しく分化した象牙芽細胞にコミットされていたことより、弱い損傷モデルである歯の切削後に切削部位の象牙芽細胞が損傷を受け、失われた象牙芽細胞層を補填するために象牙芽細胞下層の顆粒状にラベルされる細胞（前駆細胞）が象牙芽細胞に分化したと考えられた。つまり、歯の損傷程度によって、歯髄幹細胞は前駆細胞と協調して異なる治癒モードを用いて外的刺激に対する歯髄反応を調整していると考えられた（図3）。

【おわりに】

本稿では、我々が確立した *in vivo* 動物実験モデルで起こる現象を元に歯の損傷後の歯髄修復機構の新規仮説について紹介した。しかしながら、歯の損傷後に歯髄内で惹起される象牙質形成と骨組織形成を調節するメカニズムや骨組織形成に関わる細胞の特定は未解決の問題である。歯の再植後に歯髄内に骨組織形成が惹起されると歯根吸収やアンキロシス（骨性癒着）を起こしやすいことから¹⁴⁾、将来の歯髄幹細胞を用いた歯髄再生療法を実現するのにあたり、歯髄内には象牙質形成を誘導することが望ましい。従って、歯の損傷後の歯髄再生過程における治癒パターンを調節するメカニズムや歯髄固有の幹細胞（歯髄幹細胞）と骨芽細胞分化に関わる細胞群

との相互作用を明らかにすることは、臨床上極めて重要な問題である。歯の損傷後の歯髄治癒過程における細胞動態を直接観察するために象牙質・歯髄複合体の *in vitro* イメージング・システムを確立したり、我々が歯髄幹細胞と考えている細胞の *in vitro* 及び *ex vivo* における分化能の検証など、我々の仮説を実証する実験系を確立することが、今後の大きな課題である。

【参考文献】

- 1) Shimizu A, Nakakura-Ohshima K, Noda T, Maeda T, Ohshima H: Responses of immunocompetent cells in the dental pulp to replantation during the regeneration process in rat molars. *Cell Tissue Res* 302: 221-233, 2000.
- 2) Nakakura-Ohshima K, Watanabe J, Kenmotsu S, Ohshima H: Possible role of immunocompetent cells and the expression of heat shock protein-25 in the process of pulpal regeneration after tooth injury in rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo)* 52: 581-591, 2003.
- 3) Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Takeuchi K, Hoshino M, Takano Y, Maeda T: Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells. *Microsc Res Tech* 60: 483-490, 2003.

歯の損傷後の歯髄反応(仮説)

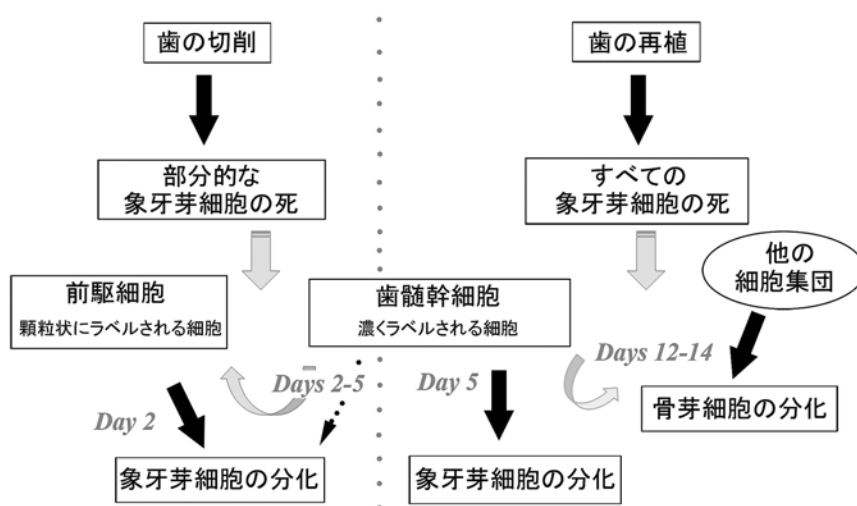


図3 歯の切削／再植に対する歯髄反応の仮説を示す図。歯の切削は局所的な象牙芽細胞の変性を引き起こし、象牙芽細胞下層の前駆細胞が象牙芽細胞に分化し、その後歯髄幹細胞の増殖亢進が起こり前駆細胞を補填する。一方、歯の再植後には歯髄広範にわたる象牙芽細胞の変性を引き起こし、歯髄幹細胞が増殖後に失われた前駆細胞と象牙芽細胞に分化するが、骨芽細胞に分化するのは他の細胞群であると考えられる。

- 4) Tsukamoto-Tanaka H, Ikegame M, Takagi R, Harada H, Ohshima H: Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation. *Cell Tissue Res* 325: 219-229, 2006.
- 5) 大島勇人 : 歯の損傷後の歯髄修復過程と象牙質・歯髄複合体の生物学的特性. *新潟歯学会雑誌*, 34: 165-177, 2004.
- 6) Ishikawa Y, Nakakura-Ohshima K, Kenmotsu S, Suzuki H, Jung HS, Ohshima H: Responses of dental pulp stem cells against exogenous stimuli. *Eur Cell Mater* 14(Supple 2): 116, 2007.
- 7) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明, 田中 栄, 中村浩彰, 森 諭史: 新骨の科学. 医歯薬出版, 東京, 1-327, 2007.
- 8) Teaford MF, Smith MM, Ferguson MWJ: Development, function and evolution of teeth. Cambridge University Press, Cambridge, 1-314, 2000.
- 9) Hargreaves KM, Goodis HE: Seltzer and Bender's Dental Pulp. Quintessence Publishing Co Inc, Chicago, 1-500, 2002.
- 10) Ohshima H: Ultrastructural changes in odontoblasts and pulp capillaries following cavity preparation in rat molars. *Arch Histol Cytol* 53: 423-438, 1990.
- 11) Ohshima H, Sato O, Kawahara I, Maeda T, Takano Y: Responses of immunocompetent cells to cavity preparation in rat molars: an immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. *Connect Tissue Res* 32: 303-311, 1995.
- 12) Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C: Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* 1: 53-60, 2007.
- 13) Nakasone N, Yoshie H, Ohshima H: An immunohistochemical study of the expression of heat-shock protein-25 and cell proliferation in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in rat molars. *Arch Oral Biol* 51: 378-386, 2006.
- 14) Nakasone N, Yoshie H, Ohshima H: The relationship between the termination of cell proliferation and expression of heat-shock protein-25 in the rat developing tooth germ. *Eur J Oral Sci* 114: 302-309, 2006.
- 15) Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Yamamoto H, Maeda T: Alteration in the expression of heat shock protein (Hsp) 25-immunoreactivity in the dental pulp of rat molars following tooth replantation. *Arch Histol Cytol* 64: 425-437, 2001.
- 16) Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Yamamoto H, Maeda T: Responses of odontoblasts to cavity preparation in rat molars as demonstrated by immunocytochemistry for heat shock protein (Hsp) 25. *Arch Histol Cytol* 64: 493-501, 2001.
- 17) Suzuki T, Nomura S, Maeda T, Ohshima H: An immunocytochemical study of pulpal responses to cavity preparation by laser ablation in rat molars by using antibodies to heat shock protein (Hsp) 25 and class II MHC antigen. *Cell Tissue Res* 315: 311-319, 2004.
- 18) Kawagishi E, Nakakura-Ohshima K, Nomura S, Ohshima H: Pulpal responses to cavity preparation in aged rat molars. *Cell Tissue Res* 326: 111-122, 2006.
- 19) Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H: Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol* 130: 773-783, 2008.
- 20) Hasegawa T, Suzuki H, Yoshie H, Ohshima H: Influence of extended operation time and of occlusal force on determination of pulpal healing pattern in replanted mouse molars. *Cell Tissue Res* 329: 259-272, 2007.
- 21) Ogawa R, Saito C, Jung HS, Ohshima H: Capacity of dental pulp differentiation after tooth transplantation. *Cell Tissue Res* 326: 715-724, 2006.
- 22) Takamori Y, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Cai J, Cho SW, Jung HS, Ohshima H: Capacity of dental pulp differentiation in mouse molars as demonstrated by allogenic tooth transplantation. *J Histochem Cytochem* 56: 1075-1086, 2008.
- 23) Unno H, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Ohshima H: Pulpal regeneration following allogenic tooth transplantation into mouse maxilla. *Anat Rec (Hoboken)* 292: 570-579, 2009.
- 24) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13625-13630, 2000.