

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	村上 智哉
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第338号
学位授与の日付	平成28年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1 positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a <i>piggyBac</i> vector containing <i>LEF1</i> promoter-driven selection markers ( <i>LEF1</i> プロモーターを配した <i>piggyBac</i> ベクターを遺伝子導入した乳歯歯髄幹細胞を用いた遺伝子工学的的手法による <i>LEF1</i> 陽性乳歯歯髄幹細胞系細胞の単離および解析)
論文審査委員	主査 大島 勇人 教授 副査 早崎 治明 教授 副査 寺尾 豊 教授

### 博士論文の要旨

**【目的】** *LEF1* は、48-kD の核タンパク質であり、前B細胞および前T細胞での発現が報告されている。この *LEF1* は、生物の発生に重要な *Wnt/β-catenin* シグナルにおける転写因子であり、*β-catenin* を介して *Wnt* 標的遺伝子の転写に関与することが報告されている。また、未分化歯髄幹細胞 (ES細胞) における未分化の維持・増殖に関与することも報告されている。さらに、*Lef1* 遺伝子の欠損したマウスによる研究より、歯の発生において *LEF1* は重要な役割を担っていることが示唆されている。*LEF1* はES細胞の未分化の維持・増殖および歯の発生の初期の段階で関与することから、*LEF1* が歯髄幹細胞を含めた未分化歯系細胞のマーカーとなるのではとの考えにいたった。そこで、遺伝子工学的的手法を用いて *LEF1* 陽性細胞を単離し、単離した細胞が幹細胞としての性質を有しているのかを明らかにすることを目的に実験を行った。

**【方法】** 2種類の乳歯歯髄幹細胞 (HDDPC-11、12) に対し、*LEF1* の発現を免疫染色法にて確認した。2.5kb の *LEF1* プロモーターの下流に *EGFP* 発現遺伝子を配した pTA-LEN プラスミドベクターを実験に用いた。pTA-LEN プラスミドベクターには、Neomycin (*neo*) 耐性遺伝子を含んでおり、遺伝子導入された細胞は *neo* 耐性を示す。遺伝子導入法として、Neon<sup>®</sup> トランスフェクションシステムを採用し、*piggyBac* トランスポゾン発現ベクター (pTrans) とともに HDDPCs へ遺伝子導入を行った。その後、G418 にて薬剤選択に伏した。EGFP を発現したコロニーを濾紙法にて採取した。得られた2株 (HDDPC-LEN-1、HDDPC-LEN-2) に対して、ゲノムへ pTA-LEN が挿入されているのかを確認するため、PCR 法にて *neo* および *EGFP* 遺伝子の検出を行った。また、代表的な幹細胞マーカーである STRO-1、CD44、SSEA-4 を用い免疫染色を行い、幹細胞としての特性の有無を確認した。加えて、RT-PCR 法にて未分化マーカーである *OCT3/4*、*SOX2*、*NANOG* および *REX1* 遺伝子の検出を行った。単離した HDDPC-LEN-11 を骨系へ分化誘導を行い、Von Kossa 染色および Alizarin 染色にて骨系細胞へ分化することを確認した。また、神経系へ分化誘導を行い、Nissl 染色にて神経系細胞へ分化することを確認した。

**【結果】** 免疫染色の結果、HDDPC-11、12 において *LEF1* 陽性細胞を認め、株間において、陽性細胞の割合に違いを認めた。*LEF1* 陽性細胞の割合の高かった HDDPC-11 へ pTA-LEN を遺伝子導入後、2日目には蛍光顕微鏡にて EGFP の発現を認めた。次に、単離した LEN-1 および LEN-2 のゲノム DNA において、PCR 法にて *neo* および *EGFP* 遺伝子が検出された。さらに、幹細胞マーカーである STRO-1、CD44 および SSEA-4 による免疫染色の結果、LEN-11 においてネガティブコントロール (乳歯歯髄幹細胞) と比較し、陽性細胞の割合が優位に多く認めた。RT-PCR 法にて、いずれの細胞株においても *OCT3/4*、*SOX2*、*NANOG* および *REX1* が検出された。

**【考察】** 今回、乳歯歯髄幹細胞より *LEF1* プロモーターを用いて *LEF1* 陽性細胞を単離することができた。単離された細胞は、幹細胞マーカーである STRO-1、CD44 および SSEA-4 の発現を認めた。また、骨系細胞への分化能および神経系細胞への分化能を有していた。以上より、*LEF1* は歯髄幹細胞マーカーの一つである可能性が示唆された。今後はより多くの幹細胞マーカーを用いることで、単離した細胞の性質を解析する必要がある。また、本研究ではプロモーターとして *LEF1* を用いたが、プロモーターを変えることで (*OCT3/4* 等)、様々な性質を持った幹細胞の単離が可能

となり、歯科領域での再生医療の発展に寄与するものと考えられる。

#### 審査結果の要旨

幹細胞は様々なタイプの特殊化した細胞への分化能をもつ未分化自己複製細胞である。幹細胞は、歯髄の他にも、皮膚、脂肪組織、末梢血、骨髄、膵臓、脳、毛包などの成体組織で同定されている。歯髄幹細胞は間葉系幹細胞の表現型を示し、多分化能をもつと考えられているので、歯科再生治療における利用に大きな潜在能力をもつと考えられている。ヒト乳歯歯髄幹細胞は異種の細胞ポピュレーションからなるが、その2%以下がヒト乳歯歯髄幹細胞である。10年以上前に Miura らは SSEA-4 と CD146 などの細胞表面マーカーを用いてヒト乳歯歯髄幹細胞から骨髄幹細胞様細胞の単離に成功している。これらの細胞は SHED と呼ばれ、高い細胞普適性をもち、*in vitro* で神経様細胞、象牙芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞への分化能をもつ。しかしながら、ヒト乳歯歯髄幹細胞に含まれる幹細胞の特徴の詳細を明らかにするためには、これらの細胞で特異的に発現しているマーカーの同定が必要である。

Lymphoid enhancer factor-1 (LEF1) は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの調節因子で、 $\beta$ -catenin の核内移行で活性化され、幹細胞増殖を含む多くの生物学的な事象に重要な役割を果たす。過去の研究では、*Lef1* 遺伝子欠損で歯の発生の停止、前象牙芽細胞・前エナメル芽細胞での *Lef1* 発現、*Lef1* による象牙質シアロリントパク質発現の調節を通じた象牙芽細胞分化に鍵となる役割を果たすことが示唆されている。これらの研究結果は、LEF1 が歯の幹細胞を含む歯の未分化な細胞型に高度に発現しているという仮説を提唱するに至った。

本研究は、ヒト *LEF1* プロモーターを用いた遺伝子工学技術によりヒト乳歯歯髄幹細胞から LEF1 陽性細胞を単離することを試みた。また、RT-PCR 解析により、これらの細胞株からの単離した RNA を用いて細胞特異的な転写発現を解析した。結果として、LEF1 陽性細胞を分化誘導培地で培養することにより、骨芽細胞や神経細胞分化が誘導された。RT-PCR 解析により、LEF1 陽性細胞に *OCT3/4*、*SOX2*、*REX1*、*NANOG* を含む幹細胞マーカー発現を認めた。

異種の細胞ポピュレーションから特定の細胞型を単離することは、その生物学的機能を理解するために重要である。FACS を用いた細胞型の単離は、細胞表面分子により選択する方法であるので、核での局在を示す転写因子を基に単離することが出来ない。本研究は、*LEF1* プロモーターに *EGFP* 遺伝子導入に成功して、*LEF1* 発現ヒト乳歯歯髄幹細胞を得た。

本研究は、遺伝子工学的細胞選別法により、初めて LEF1 発現ヒト乳歯歯髄幹細胞の単離に成功し、これらの細胞が幹細胞マーカー発現を示すことを明らかにした。さらに、これらの細胞が骨芽細胞と神経細胞への分化能を示した。これらの所見は、歯の組織再構築における LEF1 陽性細胞の潜在能力を示唆している。

以上、本研究結果は、ヒト LEF1 陽性乳歯歯髄幹細胞が幹細胞の特徴を示すことから、LEF1 がヒト乳歯歯髄幹細胞のマーカーとして役立つことを示唆しており、歯髄幹細胞研究への貢献度が極めて高いので、学位論文としての価値を認める。

