

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 末山有希子
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第390号
学位授与の日付 平成29年9月20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 Effect of lipopolysaccharide stimulation on stem cell-associated marker-expressing cells in rat incisors
(ラット切歯における幹細胞関連因子発現細胞に対する LPS 刺激の影響)

論文審査委員 主査 野杵 由一郎 教授
副査 大峽 淳 教授
副査 吉江 弘正 教授

博士論文の要旨

【目的】

学位申請者らのグループは、MAP1B および CD146 を発現する幹細胞様細胞がラット歯髄に多数分布することを報告した。しかし炎症性刺激が幹細胞の動態や遺伝子発現に及ぼす影響の詳細は不明である。そこで本研究では、LPS により歯髄炎を誘発したラット切歯歯髄組織を検索対象として、CD146、MAP1B、stem cell factor(SCF)、stromal-derived factor 1(SDF-1) mRNA 発現および MAP1B/CD146、STRO-1/CD146 二重陽性細胞数の変化を併せて解析した。さらにウエスタンブロット法にて SCF、SDF-1 のタンパク発現を検索した。

【材料および方法】

5 週齢 Wistar 系雄性ラットに全身麻酔を施した後、下顎切歯を切削、露髄させ LPS を貼付したのち、窩洞を封鎖した。LPS 刺激 3、12、48 時間経過後に切歯歯髄を摘出し、全 RNA を抽出後、real time PCR 法を用いて CD146、MAP1B、SCF、SDF-1 mRNA の発現解析を行った。また上述と同様に施術した組織に対し、ウエスタンブロット法による SCF、SDF-1 のタンパク発現の検索、また固定、凍結包埋、薄切後、MAP1B/CD146、STRO-1/CD146 に対する免疫二重染色を行い、二重陽性細胞数を定量解析した。

【結果】

MAP1B+CD146⁺、STRO-1+CD146⁺の二重陽性細胞数は、LPS 刺激 3 時間後から有意に亢進し(Kruskal-Wallis non-parametric test, Mann-Whitney U test, $P < 0.05$)、48 時間後には正常歯髄と比較して 4 倍から 6 倍まで増加した。CD146 mRNA 発現は LPS 刺激 3 時間後に有意に亢進し($P < 0.05$)、MAP1B、SCF、SDF-1 の mRNA 発現も LPS 刺激 3 時間後と 72 時間後に有意に亢進した($P < 0.05$)。SCF、SDF-1 のタンパク発現も LPS 刺激後に上昇した。

【考察】

VEGF、SCF、SDF-1 を含む成長因子が合わさるとアポトーシスが減少し、細胞移送が増加し、新たな血管新生が生じることが報告されているが、本研究の結果から、炎症を生じた歯髄では CD146 mRNA 発現が亢進し、それにより SDF-1 と SCF mRNA 発現亢進へとつながり、これが幹細胞様細胞の移送や増殖に関わるメカニズムである可能性を示唆している。また本研究結果では、LPS 刺激後に MAP1B mRNA 発現は亢進しており、MAP1B は象牙芽細胞に発現し、未分化のヒト間葉系幹細胞においても発現する MAP1B が幹細胞の増殖を促進している可能性を示唆している。これらの結果から、LPS 刺激による SDF-1、SCF の発現亢進により幹細胞様細胞の移送と増殖を促進することを示唆している。

【結論】

LPS 刺激を行ったラット歯髄組織では、幹細胞分化能マーカーの mRNA 発現亢進がみられ、MAP1B+CD146⁺、STRO-1+CD146⁺二重陽性幹細胞数の増加が認められた。

審査結果の要旨

これまで、ヒト歯髄幹細胞 (DPSC) に対して代表的な炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子- α (TNF- α) で刺激すると間葉系幹細胞マーカーの一つである SSEA4 の発現上昇が上昇したとの報告がある。従来、強い炎症環境は細胞のプログラムされた死を誘導するなど、負の側面を持つことが知られていたが、適度な炎症環境が組織幹細胞の未分化性獲得や維持、炎症制御に密接に関わり、再生の場の準備に強く関わる可能性を示唆しており、この報告は、今後の組織再生の考え方 (概念) に大きな影響を与える研究となり得るものである。

今回の研究では、この報告を参照し、初期の歯髄炎においては炎症性刺激によって歯髄幹細胞の増殖能や分化能が亢進するのではないかという仮説を想定した物であり、従来の発想では未解明であった領域に新たな足跡を示す研究課題と考えられた。炎症性刺激については、ラット切歯の実験的歯髄炎の報告において、大腸菌からの LPS を用いたものがあり、それを参照している。口腔内細菌からの LPS を用いた解析も必要と考えるが、これまでに報告がなく、炎症の経時的な変化をコントロールするためには、大腸菌由来の LPS が最適であると考えて本実験に使用した。LPS 刺激と細菌刺激の相違に関しては、LPS 刺激は細菌刺激の中の一つであり、細菌刺激は LPS 刺激の他にも外毒素 (exotoxin) による刺激や付着因子、侵襲性等の病原性因子が存在する。今後は実際の齶蝕を想定し、口腔由来細菌を用いた解析も必要であろう。一方、LPS (lipopolysaccharide) で誘発したラット切歯実験的歯髄炎において、CD146 や MAP1B (microtubule-associated protein 1B) などの幹細胞関連遺伝子の発現亢進が、幹細胞様細胞の増殖に関連する可能性を報告している。しかし、LPS 刺激を受けた幹細胞の動態、あるいは幹細胞関連遺伝子発現の詳細は、未解明で不明な点が多い。本研究ではこの点を解明する端緒として、ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞に *in vitro* で LPS 刺激を加えた後、幹細胞関連遺伝子 CD146 および MAP1B mRNA の遺伝子発現を経時的に定量解析した。この検索は、今後の組織再生、特に歯髄再生の考え方に大きな影響を与え、歯髄再生療法の確立に重要な役割を果たすものと言える。

検索の結果、LPS 刺激 3 時間経過後では、コントロール群よりも LPS 刺激群の方が CD146 および MAP1B mRNA 発現は有意に低かった。しかし、CD146 mRNA 発現は 3 時間以降亢進し、LPS 刺激 24 時間経過後にピークを示した。また、12、24、48 時間経過後では、LPS 刺激群がコントロール群より有意に高値を示した。一方、MAP1B mRNA 発現は、3 時間以降亢進し、48 時間経過後にピークを示した。48 時間経過後のみ、LPS 刺激群がコントロール群より有意に高値を示した。本報告は、初期の歯髄炎においても幹細胞を採取可能であることを示唆した、最初の報告である。

また、MAP1B+CD146⁺、STRO-1+CD146⁺の二重陽性細胞数は、LPS 刺激 3 時間後から有意に亢進し、48 時間後には正常歯髄と比較して 4 倍から 6 倍まで増加した。CD146 mRNA 発現は LPS 刺激 3 時間後に有意に亢進し、MAP1B、SCF、SDF-1 の mRNA 発現も LPS 刺激 3 時間後と 72 時間後に有意に亢進した。SCF、SDF-1 のタンパク発現も LPS 刺激後に上昇した。

これら本研究の結果から、炎症を生じた歯髄では CD146 mRNA 発現が亢進することにより SDF-1 と SCF mRNA 発現が亢進し、そして幹細胞様細胞の移送や増殖に関わるメカニズムが存在する可能性を示した。

本研究から、LPS の刺激により幹細胞様細胞の増殖能が亢進することが示唆された。これは、初期の不可逆性歯髄炎において抜髄を行う際に、より多くの歯髄幹細胞を採取できる可能性を暗示し、再生治療へ寄与できる大きな知見と考えられる。今後は、LPS で刺激を受けた歯髄幹細胞の分化能を、osteopontin や Nestin などの象牙質形成関連因子との関係などから、*in vitro* にて検索していくとともに、*in vitro* 実験と平行して、LacZ などレポーターを使用して、LPS 刺激幹細胞をラット臼歯に移植し、幹細胞分化能を *in vivo* でも検索していくことで、歯髄幹細胞を用いた歯髄再生療法の確立への道がより開かれるものと期待される。

この所見は、不可逆性歯髄炎を生じた歯髄組織も、歯髄幹細胞の供給源となる可能性を示し

たもので、この細胞を用いて歯髄再生療法が確立できれば、人体で初めての炎症組織、炎症器官、炎症臓器由来の細胞による組織再生療法の開発の可能性を示す重要な基礎的知見であり、得られた本研究の成果は学位取得に十分な内容であると考えられる。他方で、審査員3名の口頭試問の結果（別紙：最終審査結果の要旨参照）、本人は歯学博士に十分な学力を有していると認められた為、大学院博士課程の修了に相当する。