

Title	Side population cell derived from dental pulp and dental germ have distinct cell surface marker from born marrow side population cells
Author(s)	岡田, 崇
Journal	歯科学報, 114(6): 598-599
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3536">http://hdl.handle.net/10130/3536</a>
Right	

氏名(本籍)	おか だ たかし 岡 田 崇 (千葉県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 1779 号(甲第 1054 号)
学位授与の日付	平成20年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Side population cell derived from dental pulp and dental germ have distinct cell surface marker from born marrow side population cells
掲載雑誌名	The international journal of periodontics & restorative dentistry
論文審査委員	(主査) 平井 義人教授 (副査) 井上 孝教授 柳澤 孝彰教授 東 俊文教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

口腔内組織の幹細胞がどのような部位にどれだけ存在し、それらの性質がいかなるかについて歯牙発生で修復再生において重要と考えられる。歯髄、歯胚の幹細胞の候補として Side Population 細胞(以下 SP 細胞)を分離し検討した。

#### 2. 研究方法

1 グループあたり 6 匹ずつの SDrat 及び Balb/c マウス(6 週齢)をネンブタール腹腔内注射にて安楽死後、全身に 70% エタノールをかけ消毒した。上下顎 4 前歯を抜去後、根尖部にて切断し歯胚と歯髄を取り出した。コラゲナーゼ処理後 HBSS にて洗浄し  $10^6$  コ/ml の濃度に細胞数を調整しヘキスト 33342 ( $4\mu\text{g/ml}$ ) で 90 分間  $37^\circ\text{C}$  で染色した。また大腿骨より骨髓を採取し、同様にコラゲナーゼ処理とヘキスト染色を施行した。各々の細胞を PE ラベル抗 Sca-1, CD45, CD34, c-kit 抗体にて染色した。その後, Propidium Iodide  $2\mu\text{g/ml}$  により染色し FACS(Aria Becton Dicknson)によりソートした。この時 FACS の設定は励起波長 350nm, 吸収波長 405/BP30 と 585/BP20 とした。ソートした SP 細胞から RNA を抽出し, 1st cDNA を作成し RT-PCR 法にて象牙芽細胞マーカーの発現を検討した。

#### 3. 研究成績および考察

マウス骨髄, 歯髄, および歯胚より採取できた SP 細胞の比率は全細胞中 0.25%, 0.15%, 1.2% であった。またラット骨髄, 歯髄, 歯胚より採取できた SP 細胞の比率は 0.31%, 0.17%, 1.5% であった。各々の SP 細胞から RNA を抽出し born sialoprotein, osteocalcin, dentin sialoprotein, GAPDH の発現を検討したがいずれの SP 細胞においても GAPDH 以外の陽性反応は得られず, これらの蛋白は発現していなかった。骨髄幹細胞の判定に用いられる表面抗原マーカーはいずれもラットの SP 細胞において検討したところ骨髄 SP 細胞では CD45, 99%, CD34, 12.3%, Sca-1, 77.6%, c-kit, 95.3% の陽性であった。一方, 歯髄 SP 細胞では CD45, 92.5%, CD34, 26.5%, Sca-1, 44.3%, c-kit, 28.5%, さらに歯胚 SP 細胞では CD45, 95.3%, CD34, 10.3%, Sca-1, 68.9%, c-kit, 89.8% であった。以上から歯髄, 歯胚から SP 細胞が分離できることが確認され特に歯胚の SP 細胞は存在比率が高く, 表面抗原マーカーの解析から骨髄 SP 細胞に近い集団で

あった。一方、歯髄 SP 細胞はその存在比率は骨髄 SP 細胞と同等であるものの、表面抗原マーカーでは、c-kit の陽性率が非常に低く骨髄 SP 細胞とは異なる細胞集団であった。しかしいずれの SP 細胞も骨分化、象牙芽細胞分化マーカーは陰性であり未分化な細胞集団であることが示唆された。

#### 4. 結 論

ゲッ歯類の歯髄、歯胚には SP 細胞が存在している。歯髄 SP 細胞は骨髄 SP 細胞に特徴的マーカーである c-kit, Sca-1 が低発現であった。一方、歯胚はそれらの発現が骨髄 SP 細胞に近く、歯髄、歯胚の SP 細胞はことなる未分化細胞からなる集団である可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 要 旨

体性幹細胞は ES 細胞などと異なり、生命倫理や拒絶反応の問題が少ない。また、最近では各組織の体性幹細胞は、組織の修復、あるいは新陳代謝において重要な役割を果たすと考えられており Side population 細胞 (以下 SP 細胞) という細胞の集団に属していると報告されている。本研究では歯髄と歯胚の SP 細胞を抽出し、骨髄の SP 細胞と骨髄において特徴的な表面抗原マーカーで比較し検討した。その結果、骨髄同様に歯髄、歯胚ともに SP 細胞が抽出でき、表面マーカーによる比較においては骨髄と歯胚は類似した結果が得られた。また、歯髄から抽出した SP 細胞の表面マーカーによる検討では一部は骨髄と似ているものの、一部の表現型が異なっているという結果が得られた。以上より歯髄、歯胚の SP 細胞は異なる未分化細胞集団である可能性が示唆された。

本審査委員会では、1) マウス、ラットの切歯の構造について、2) dental germ について、3) 動物実験の手技について、4) 今後の展望についてなど、関連事項に関して質疑が行われたが、概ね妥当な解答が得られた。また、論文の記述に関しての英語表現、構成などいくつかの指摘があり訂正等が行われた。本研究で得られた結果は今後の歯科医学の進歩、発展に寄与するところが大きく、学位授与に値するものと判定された。