

Title	The effect of epithelial rests of Malassez cells on the osteogenic differentiation of pluripotent stem cells
Author(s)	直野, 公一
Journal	歯科学報, 120(2): 238-239
URL	http://hdl.handle.net/10130/5173
Right	
Description	

氏名(本籍)	なおのこういち (愛媛県) 直野公一
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2196 号(甲第 1397 号)
学位授与の日付	平成29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	The effect of epithelial rests of Malassez cells on the osteogenic differentiation of pluripotent stem cells
掲載雑誌名	Clinical Dentistry and Research 第42巻 1号 3-10頁 2018年
論文審査委員	(主査) 井上 孝教授 (副査) 齋藤 淳教授 東 俊文教授 橋本 貞充教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

歯根膜内に存在するマラッセの上皮遺残(ERM)細胞は、歯根膜の幅の維持機能のほか、過度の石灰化抑制やセメント質の修復などの硬組織の恒常性に関与しているとの報告がなされている。一方でERM細胞が骨形成タンパク質2(BMP2)を発現するとの報告がある。本研究では、ERMをiPS細胞と共培養し、骨性細胞への分化の可能性について検索を行った。

2. 研究方法

理化学研究所バイオリソースセンターより得たマウス由来iPS細胞(3×10⁴cells/well)を実験に用いた。また、ERMは、ブタ歯根膜より採取されたものを用いた。ERM細胞の増殖能を不活化する目的でマイトマイシンC処理(MMC群)、細胞を化学固定する目的でホルムアルデヒド処理(FA群)、そして対照群として未処理(未処理群)の3群を比較検討した。各種処理されたERM上iPS細胞を播種し、37℃5%CO₂下でDMEM培地(15%FBS, 1mMピルビン酸ナトリウム, 2mM L-グルタミン, 0.1mM非必須アミノ酸, 0.1mM2-メルカプトエタノール, 1000U/mL(LIF添加))にて培養を行った。培養後6日と10日目に位相差顕微鏡による形態観察と骨分化マーカーとしてRunx2, 骨シアロタンパク質(BSP), オステオカルシン(OCN)を用いたmRNAの発現レベルについてTaqman遺伝子発現Assays[®]にて定量的リアルタイムRT-PCRによって分析した。

3. 研究成績および考察

MMC群のiPS細胞のコロニーの形状は平坦化して広がったが、FA群のiPS細胞はコロニーの中心部に集積していた。未処理群のiPS細胞のコロニーの大きさは最小であった。MMC群のiPS細胞のコロニーの形状は平坦化して広がったが、FA群のiPS細胞はコロニーの中心部に集積していた。未処理群のiPS細胞のコロニーサイズは最小であった。MMC群は細胞周期を停止させることによって細胞増殖を防止しているが、その機能が維持されているためコロニーが平坦化して広がったものと考えられる。FA群は機能はしていないが、iPS細胞の増殖を支持するための未変化の表面トポグラフィを依然として有していたため、コロニー中心部での集積が認められたと考えられる。未処理群においてはフィーダー細胞が増殖しiPS細胞の増殖を妨げたためと考えられる。細胞拡散は、骨形成細胞の分化を促進することが報告されている。

3種類のERM細胞で培養されたiPS細胞によるRunx2のmRNA発現レベルは、培養の6日から10日に増加した。MMC群および未処理群で培養したiPS細胞によるRunx2のmRNA発現レベルは、FA群より10日目で高く、MMC群のiPS細胞によるRunx2のmRNA発現最も高かった。MMC群および未処理群のiPS細胞によるBSPのmRNA発現レベルは培養6日目から10日目に増加し、FA群のiPS細胞にはほとんど変化がなかった。培養10日目に、MMC群のiPS細胞は、FA群のiPS細胞よりも有意に高いレベルのBSP mRNA発現を示した。MMC群のiPS細胞によるOCNのmRNA発現レベルは培養の6日目から10日目まで増加したが、FA群のiPS細胞にはほとんど変化がなかった。培養10日目のFA群および未処理群と比較してMMC群のiPS細胞でOCNのmRNA発現が有意に高かった。

この研究では、MMC処理ERM細胞上で培養されたiPS細胞による骨形成遺伝子のmRNA発現レベルは、培養の6日目から10日目に増加した。ERM細胞が間葉系細胞を骨形成細胞に分化させる役割を果たすBMP2を発現することを報告した。

これらの結果からiPS細胞はERM細胞から分泌される液性因子のために分化誘導される可能性が示唆された。

4. 結 論

本研究の結果から、MMC処理されたERMはiPS細胞の骨分化を誘導させる可能性があることが示唆された。

論 文 審 査 の 要 旨

本研究では、マラッセの上皮遺残(ERM)細胞をマイトマイシンC(MMC)処理したもの、ホルマリン(FA)処理したもの、および未処理のものをフィーダー細胞として用いてiPS細胞と共培養を行い、ERM細胞がiPS細胞への骨性細胞への分化に及ぼす影響について検索した。形態観察においてMMC処理されたERM細胞と共培養を行ったiPS細胞は平坦に広がっており、FA処理されたERM細胞と共培養を行ったiPS細胞は中央に集積していた。これによりMMC処理されたERM細胞上のiPS細胞は骨形成関連遺伝子の発現起こることが示唆された。また、骨分化マーカーであるRUNX2、BSPおよびOCNのmRNAの発現量はMMC群において培養6日目から10日目にかけて、他の群よりも有意に高い値を示した。これはMMC処理されたERM細胞をフィーダー細胞として用いた場合、何らかの液性因子、または細胞間連絡によりiPS細胞を分化誘導したことが示唆された。

本審査委員会では(1)なぜERM細胞をフィーダー細胞として使用したのか、(2)形態観察結果の意味について、(3)ERM細胞からの液性因子について、などの質疑がなされた。(1)については、ERMは歯根膜内においてセメント質形成や歯周組織の恒常性の維持に関与しているため、iPS細胞を骨性の細胞への分化誘導の可能性があると考えたこと、(2)については、MMC群では細胞の機能が残った形態、FA群においては、機能は減弱または喪失するが細胞の表面形態、そして未処理群においては細胞の増殖は抑えられているものの、機能や形態は残っていると考えられる、(3)については、文献的に、ERM細胞からのBMP2やEGFの放出などが知られていて、他の因子と合わせてiPSの分化に寄与したと考える、と概ね妥当な答えが得られた。また、用語、英文表記、材料および方法の詳細の記載、図の修正、論旨の展開の再考等についての多くの指摘が行われた。

その結果、本論文は今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。