

論文内容の要旨

論文提出者氏名 本城 賢一

論文題目

Evaluation of a dental pulp-derived cell sheet cultured on amniotic membrane substrate

論文内容の要旨

【緒言】

歯周病は、歯を支持する歯周組織を破壊し、歯の喪失を招く慢性炎症疾患であり、歯周組織再生は歯科臨床において大きな課題の一つである。

羊膜は胎盤の最表層を覆う無血管の薄膜であり、通常分娩後に破棄されるので、倫理的および技術的に問題なく採取、利用することが可能である。また、抗炎症作用・感染抑制作用等を有するとされ、手術の際の癒着防止や熱傷後の皮膚被覆などに用いられてきた。一方、歯髓由来細胞は、歯の内部に位置するために有害刺激や細菌感染の機会が少なく、乳歯や智歯等の永久歯など、従来抜歯後に医療廃棄物として処理されていた組織から比較的簡便に採取が可能である。歯髓由来細胞は近年、幹細胞ソースとしても着目されている。そこで今回、歯髓由来細胞および羊膜に着目し、新たな歯周組織再生療法への応用を試みた。具体的には、羊膜を基質とした培養歯髓由来細胞シート（以下、羊膜上培養歯髓由来細胞シート）を作成することを目的とした。

【材料と方法】

インフォームド・コンセントを得たのち便宜抜歯された智歯をセメントエナメル境で横断、歯髓組織のみを無菌的に採取し、一部から凍結ブロックを作成した。残りの歯髓組織を細分し、酵素消化と濾過の後、10%FBSと抗菌薬を添加したDMEMを用いて初代培養を行い、3~4継代培養したものを歯髓由来細胞とした。羊膜上にこれら歯髓由来細胞を播種し、約2週間培養後、凍結ブロックを作成した。作成した歯髓組織および羊膜上培養歯髓由来細胞シート凍結ブロックを8 μ mに薄切し、H-E染色およびvimentin（間葉系細胞マーカー）、Ki-67（細胞増殖マーカー）、ZO-1（タイト結合構成蛋白質）、desmoplakin（デスモゾーム関連蛋白質）、CD29、CD44、CD105、CD146、STRO-1（間葉系幹細胞マーカー）、collagen IV、collagen VII、laminin 5、laminin α 5（基底膜構成蛋白質）について免疫組織化学的検討を行った。また、チャンバースライド上に歯髓由来細胞を播種し、サブコンフルエントに達するまで培養後、上記と同様に免疫組織化学的検討を行った。

【結果】

1. 歯髓組織と培養歯髓由来細胞の形態と蛋白質発現

歯髓組織のH-E染色では、細胞質が星状形で、楕円形かつ濃染性の細胞核を有する線維芽細胞様の歯髓細胞が観察できた。免疫蛍光染色では、vimentin、Ki-67、ZO-1、desmoplakinが部分的に発現していた。培養歯髓由来細胞と生体内の歯髓細胞との性質が

異なるかどうか検討するため、歯髓から採取し培養した歯髓由来細胞の形態および細胞表面蛋白質の発現について検討した。その結果、培養歯髓由来細胞は均一で紡錘状の形態であり、免疫蛍光染色では歯髓組織と比べてKi-67陽性細胞が多くみられ、活発な細胞増殖を示した。さらに、培養歯髓由来細胞においてvimentin、Ki-67、ZO-1、desmoplakinの発現が認められた。したがって、培養歯髓由来細胞は歯髓組織の歯髓細胞に類似すると考えられた。

2. 羊膜上培養歯髓由来細胞の形態と蛋白質発現

羊膜上培養歯髓由来細胞が培養歯髓由来細胞と性質が異なるかどうか検討を行った。その結果、培養歯髓由来細胞は羊膜上で充実性かつ密に重層構造を示した。また、Ki-67の染色性で示されるように活発な細胞増殖を示し、vimentin、ZO-1、desmoplakinの発現が認められた。そこで、羊膜上培養歯髓由来細胞における蛋白質発現は、歯髓細胞に類似すると考えられた。

3. 羊膜上培養歯髓由来細胞の基底膜蛋白質の発現

Collagen IV、collagen VII、laminin 5とlaminin α 5 chainは、上皮と間質の間の基底膜を構成する細胞外マトリックスである。羊膜上培養歯髓由来細胞において、これらの基底膜蛋白質は均一に発現していた。そこで羊膜上培養歯髓由来細胞はシート状の形態を示し、基底膜を有し、かつ羊膜と接着していると考えられた。

4. 間葉系幹細胞マーカーの発現

代表的な間葉系幹細胞マーカーとされるCD29、CD44、CD105、CD146ならびにSTRO-1は、歯髓組織で部分的に陽性細胞が認められたが、培養歯髓由来細胞では、歯髓組織と同様にこれらのすべての分子の発現が認められた。さらに、羊膜上培養歯髓由来細胞でも、これら間葉系幹細胞マーカー陽性細胞が存在していた。

【考察】

組織再生において重要とされている基質として、これまでに様々な種類の細胞シートが作成されているが、理想的な基質は未だ開発されていない。そこで、本研究では抗炎症作用・感染抑制作用等を有するとされている羊膜に着目し、幹細胞として近年注目されている歯髓由来細胞を用いて羊膜上培養歯髓由来細胞シートを作成した。その結果、歯髓由来細胞は羊膜上で増殖し、デスモゾームやタイト結合といった強固な細胞間接着装置が存在し、個々の細胞ではなく、羊膜上に一枚の細胞シートを形成しているものと考えられた。また、羊膜上に基底膜を構成し接着していた。さらに、間葉系幹細胞マーカーの発現が認められたことより、シート中に幹細胞が存在している可能性を示した。

以上の結果より、羊膜は歯髓由来細胞の培養に適切な足場として機能すると考えられ、基質として有用であることが示された。