

1-4-86

## 炎症環境による歯髄細胞の幹細胞化

—歯髄細胞分化に与えるTNF- $\alpha$ の影響—

○上枝麻友, 藤澤拓生, 大野充昭, 正木明日香, 三木春奈, 園山 亘, 窪木拓男

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科インプラント再生補綴学分野

TNF- $\alpha$  Induced Reprogramming of Human Dental Pulp Cells

Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Masaki A, Miki H, Sonoyama W, Kuboki T

Department of Rehabilitation and Regenerative Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

## I. 目的

象牙質・歯髄複合体は自己修復能を持っており、歯の損傷時には歯髄保護のために象牙芽細胞の活性化や、前駆細胞や歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化により象牙質の修復が生じることが推測されている。

炎症性サイトカインに分類される腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) は、炎症時に様々な細胞から産生され組織破壊に深く関与していることが知られている。一方、近年の研究によると、創傷治癒過程では損傷局所において初期の段階で発現し、様々な成長因子、サイトカインの誘導、それに引き続く細胞遊走によって組織再生に関与する可能性も示唆されるようになった。事実、TNF- $\alpha$ は齶蝕に罹患した歯髄組織においても初期に発現が確認されている。

しかし、象牙質・歯髄複合体の損傷に端を発する炎症再生連関において、TNF- $\alpha$ が歯髄細胞にどのような影響を及ぼしているのかは未だ明らかにはなっていない。そこで本研究では、TNF- $\alpha$ が歯髄細胞に与える作用を検討することとした。

## II. 方法

実験には、Gronthosら(2000)の手法に準じて単離したヒト歯髄細胞を用いた(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会承認番号:418)。まず、TNF- $\alpha$ が培養ヒト歯髄細胞の細胞増殖に与える影響についてMTS法で検討した。続いて、歯髄の炎症環境を*in vitro*において模するために、TNF- $\alpha$ で2日間刺激したのちに継代培養したヒト歯髄細胞をTNF- $\alpha$ 前処理群とした。TNF- $\alpha$ 前処理による細胞表面抗原の変化を細胞免疫染色およびFACSにて、幹細胞マーカー遺伝子の発現を定量的リアルタイムRT-PCR、そして幹細胞特性を表す指標としてコロニー形成能とテロメラーゼ活性をそれぞれ評価した。

さらにTNF- $\alpha$ で前処理した歯髄細胞の多分化能を各種(脂肪、軟骨および骨)分化誘導培地で培養後、各細胞の分化マーカー遺伝子の発現ならびに染色にて検討した。

## III. 結果と考察

培養ヒト歯髄細胞をTNF- $\alpha$  (0~160 ng/ml) で刺激しても細胞増殖能は影響を受けなかった。一方、細胞免疫染色において、TNF- $\alpha$ 前処理群はコントロール群と比較して間葉系幹細胞マーカーであるSTRO-1およびSSEA4陽性細胞数が増加した。FACS解析においても、TNF- $\alpha$ 前処理群において間葉系幹細胞マーカーのSSEA4およびCD146の陽性率が上昇した。続いて、幹細胞マーカーである*oct4*、*nanog*の遺伝子発現量はTNF- $\alpha$ 前処理によりともにコントロール群と比較して、それぞれ1.6倍 ( $p<0.001$ , t-test), 2.1倍 ( $p<0.05$ , t-test) に上昇した。また、培養ヒト歯髄細胞のコロニー形成能とテロメラーゼ活性もそれぞれTNF- $\alpha$ 前処理により上昇した。さらに前処理群の培養ヒト歯髄細胞は、各種分化誘導培地で培養することによりそれぞれ脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現が亢進しており、各系統の細胞に分化することが可能であった。

本実験で用いた培養ヒト歯髄細胞は純粋な歯髄幹細胞の集団ではなく、前象牙芽細胞や歯髄線維芽細胞を含む、分化度が異なる、あるいは分化の方向が異なるヘテロな細胞集団であると推測される。これら細胞集団にTNF- $\alpha$ を添加することで、生細胞数には変化がなく、幹細胞様の性質を持つ細胞の比率が増加したことは、TNF- $\alpha$ 刺激によりある種の細胞が脱分化することにより、自己複製能を有する幹細胞様細胞が増加した結果と推測された。すなわち、TNF- $\alpha$ は創傷部位に存在するある種の細胞を未分化な状態、いわゆる多分化能を有する幹細胞様細胞に脱分化させ、再生に必要な細胞成分を供給する役割を担っている可能性が示唆された。

## IV. 文献

- 1) Gronthos S, Mankani M, Brahim J et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 13625-30, 2000.