

初代ヒト乳歯歯髄細胞における
幹細胞特異的遺伝子発現の探索

○乃村俊樹, 齊藤一誠*, 稲田絵美,
長谷川大子, 松本祐子**, 窪田直子, 山崎要一
(鹿大・院医歯・小児歯, *新潟大・
院医歯・小児歯, **鹿大病・歯科総合)

【 目的 】

バイオリサイクルの観点から、乳歯は歯髄幹細胞の有効な細胞供給元として注目されている。特に2003年にヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) の存在が報告されて以降、その性質がいくつか明らかにされたが、まだ不明な点が多く残る。

アルカリフォスファターゼ (ALP) は、幹細胞マーカーの一つとして広く用いられている。我々は最近、乳歯歯髄細胞にiPS化誘導を行なった際、ALP活性の高い細胞ではiPS細胞の樹立効率が高くなっていることを見出した。幹細胞は他の分化体細胞 (繊維芽細胞など) と比べ、iPS化され易いとされる。そこで今回、「ALP活性の高い細胞は他の幹細胞特異的遺伝子も発現するのではないか」という仮説を立て、乳歯歯髄細胞における幹細胞特異的遺伝子の発現をRT-PCR法にて検討した。

【 対象と方法 】

1. ヒト乳歯歯髄細胞の採取および培養

乳歯歯髄細胞は鹿児島大学病院小児歯科外来において、交換期障害のために抜歯された健全乳歯のうち、本研究目的について患児および保護者から同意を得られた5名の乳歯から採取した (本学倫理委員会承認番号: 22-22)。抜去歯から無菌的に歯髄組織を採取後、collagenase、dispaseによる酵素処理を行ない、20%ウシ胎児血清 (FBS)、1% 抗生剤を含む α -minimal essential medium (α -MEM) を用いて37°C、5%CO₂ 湿潤条件下にて培養を行なった。

2. ALP染色

6-cm dishに播種された細胞のコンフルエント時、ALP活性検出キットによる細胞化学染色を行なった。

3. RT-PCR

細胞がコンフルエント時、total RNAを単離した。これをcDNAに置換し、幹細胞特異的とされる遺伝子 (OCT3/4、Nanog、ALP、ABCG2) と繊維芽細胞のマーカーであるFSP1の発現をRT-PCR法にて調べた。

【 結果 】

1. 細胞形態

5種類の歯髄細胞間で細胞形態の差異は認められなかった。

2. ALP活性

iPS細胞の樹立効率が高かった患者1および5の歯髄細胞はALP染色に対して陽性 (50%以上の細胞が明確な染色性を示す) であった。

3. RT-PCR

今回調べた5検体全てにABCG2 (multidrug resistance transporter) の発現を認めたが、OCT3/4、Nanog、ALP全ての発現が認められたものは、ALP活性の高かった患者1と5の歯髄細胞のみだった (下表)。

乳歯歯髄細胞の遺伝子発現

患 児	1	2	3	4	5
iPS 細胞樹立	+	-	No try	No try	+
ALP 活性 ^a	+	-	-	-	+
OCT3/4	+	-	-	-	+
Nanog	+	+	+	-	+
ALP	+	+	+	-	+
ABCG2	+	+	+	+	+
FSP1	+	+	+	+	+

^a 細胞化学染色による

【 考 察 】

今回の結果から、ALP活性が高い乳歯歯髄細胞では、他の幹細胞特異的遺伝子の発現も認められたことから、仮説は立証された。今回、歯髄細胞からiPS細胞を樹立する場合、複数の幹細胞特異的遺伝子を発現する乳歯歯髄細胞を選択することの重要性が示唆された。

【 会員外共同研究者 】

佐藤正宏 (鹿児島大学・医用ミニブタ先端医療開発研究センター・遺伝子発現制御学分野)