

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	渡邊 昌弘
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部教授 澁谷 俊昭 (副 査) 朝日大学歯学部教授 滝川 俊也 (副 査) 朝日大学歯学部教授 近藤 信夫
論文題目	
5-Ethynyl-2'-deoxyuridine Labeling 法を用いた歯周組織における組織幹細胞の検討	
論文内容の要旨	
<p><b>【目的】</b></p> <p>歯髄，顎関節，歯根膜には，自己再生能や多分化能を有する組織幹細胞（成体幹細胞）が存在することが報告されている．すでに歯根膜に対しては歯根膜由来細胞を応用した再生療法が考案されている．歯髄組織には歯髄幹細胞が存在すること，間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 や CD146 を発現し，自己再生能と多分化能を有することが知られている．また，5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を用いた「胎生期ラベリング法」では歯髄幹細胞の局在の経時的な変化が報告されている．胎生期ラベリング法では，組織幹細胞の非対称分裂をする時期に BrdU を腹腔内投与後一定期間放置することにより，ラベルの薄まった一時的増殖細胞や分化細胞の中に，核が濃くラベルされた細胞である label retaining cells (LRCs) が同定されることが明らかになっている．しかしながら，5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を用いた歯周組織幹細胞の局在はよく知られていない．本研究では，核に取り込まれた EdU の蛍光標識を用いて下顎第一臼歯歯根膜における組織幹細胞を免疫蛍光染色にて同定し，局在と経時的な変化を検討した．</p> <p><b>【実験方法】</b></p> <p>妊娠 CD1 (ICR) マウス (E14) に，EdU を 1 日 2 回 5 日間 (1 回につき 6.25mg/ml) 150mg/kg の容量で腹腔内に投与した．出生 1 か月後 (1M 群) (n=5)，2 か月後 (2M 群) (n=5)，3 か月後 (3M 群) (n=5) に屠殺し，4%PFA にて固定した．10%EDTA にて脱灰し，脱水後通法に従いパラフィン包埋した．切片はアザン染色，Hoechst 33342 を用いた DNA 染色および Click-iT® Edu Imaging Kits を使い，取りこまれた EdU を Alexa 488 により LRCs を確認した．また間葉系幹細胞マーカーである STRO-1，CD146 により間接蛍光抗体法を行い，LRCs との関係については蛍光免疫二重染色を施した後，光学顕微鏡で観察を行った．その後，マウスの下顎第一臼歯の歯根膜の歯槽骨頂部，根尖部，根分岐部における三か所の蛍光発色した細胞数をもとに，それぞれの部位の 1M 群，2M 群，3M 群ごとに割合を算出した．統計学的有意差の検定は分散分析を行った後，多重比較検定 (ANOVA, Tukey HSD test) を行った．</p>	

### 【結果】

EdU を用いた染色の結果から、1M 群では LRCs が歯根膜、辺縁歯肉、歯髄で観察できた。各群と各部位ごとの、繰り返しのある二元配置分散分析を行った結果、歯槽骨頂部、根尖部、分岐部の歯根膜で、LRCs は 1M 群、2M 群、3M 群の順で減少していた。近遠心歯槽骨頂部の LRCs を比較したところ、すべての群において有意差は認められなかった。近遠心根尖部でも、各群間において有意差は認められなかった。各部位での比較において、1M 群、2M 群、3M 群では歯槽骨頂部、根尖部、分岐部の順で減少していた。蛍光免疫二重染色を行った結果、LRCs は間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 または CD146 を発現した。すべての群で LRCs の多くが血管周囲やセメント質表面に存在しており、核が濃くラベルされた LRCs は 3M 群で減少したのに対し、顆粒状に染まった LRCs は 3M 群においても認められた。

### 【考察】

今回、EdU Assay を用い胎生期ラベリング法を行ったところ、マウスの歯周組織において核が濃くラベルされた LRCs を認めた。さらに、間葉系幹細胞マーカーとして知られている STRO-1、CD146 を用い、LRCs との関係性を蛍光免疫染色法により検討した結果、STRO-1、又は CD146 を発現していた。そのため、マウスにおける胎生期ラベリング法を用いた実験において、EdU は有効であると考えられる。今回 1M 群において、LRCs は歯根膜中に数多く存在したが、経時的に減少した。さらに、生後 3 か月の成熟した歯髄や歯肉においても存在し、歯根膜における血管周囲やセメント質表層にも認められた。しかし、月齢を増すごとにラベルが顆粒状に薄くなった細胞が次第に増加した。幹細胞は、細胞分裂によって生じた娘細胞の一方は分裂せず幹細胞としてその場に留まり、他方は一時的増幅細胞になり活発な細胞増殖を経て分化する（非対称分裂）、という特徴を持つと考えられている。そのため、LRCs は非対称分裂して幹細胞としてとどまった歯根膜幹細胞であると考えられ、顆粒状の発光を認める LRCs は、増幅細胞または前駆細胞であると考えられる。また LRCs は、STRO-1 または CD146 抗原を有しており、これらの結果から核が EdU により濃く染まった LRCs は歯根膜組織幹細胞であることが示唆された。また、本研究において歯槽骨頂部、根尖部、分岐部の歯根膜における組織学的所見で、LRCs が歯根膜中央の血管周囲に多く認められた。この結果は、歯髄組織または、歯根膜組織においても血管周囲の結合組織の存在は、幹細胞において自己複製や未分化性を維持するための生態学的適所（ニッチ）を提供していることが示唆される。

### 【結論】

EdU を用い胎生期ラベリング法を行ったところ、核が濃くラベルされた LRCs は歯槽骨頂部歯根膜のセメント質や血管周囲に多く観察され、歯槽骨頂部、根尖部、分岐部における LRCs 陽性率は、経時的に減少した。また、歯槽骨頂部、根尖部における近遠心の LRCs 陽性率は有意差を認められなかった。LRCs は STRO-1 および CD146 陽性を示したことから、歯根膜における組織幹細胞であることが示唆された。以上の結果から EdU を用いた胎生期ラベリング法を行ったところ、LRCs から STRO-1 および CD146 を発現したことから歯根膜における組織幹細胞であることを同定し、歯根膜における組織幹細胞の局在を明らかにした。