

表 題 歯根膜前駆細胞および歯根膜細胞における
転写制御因子 *SIX1* の役割についての研究

論文の区分 博士課程

著 者 名 河崎 立樹

担当指導教員氏名 森 良之 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
消化器疾患学 分野
歯科口腔外科学

2016年1月8日申請の学位論文

目次

1. 緒言

1-1: 歯科領域における再生医療	1
1-2: 歯根膜の機能と発生	1
1-3: 歯根膜線維芽細胞の特徴	3
1-4: 転写制御因子 <i>Six1</i> と <i>Six</i> ファミリー遺伝子	4
1-5: 研究目的	6

2. 材料と方法

2-1: 実験動物	7
2-2: 凍結切片の免疫染色	7
2-3: ヒト培養歯根膜細胞の初代培養	9
2-4: 培養細胞の免疫染色	10
2-5: 組織および培養細胞の EdU 標識法	10
2-6: ヒト培養歯根膜細胞の分化誘導実験	11
2-7: ヒト培養歯根膜細胞への siRNA 導入	12
2-8: ウェスタンブロット解析	13
2-9: 画像撮影と細胞数計測	14

3. 結果

3-1: 生後マウスの歯小嚢および歯根膜における <i>SIX1</i> の発現	15
3-2: 生後マウス歯根膜における増殖性細胞数の変化	18
3-3: 野生型および <i>Six1</i> ^{-/-} マウス歯小嚢における増殖性細胞比率の比較	21
3-4: ヒト培養歯根膜細胞の性質	25
3-5: siRNA を用いた <i>SIX1</i> の細胞増殖制御解析	32

4. 考察	
4-1: 胎仔期、生後および成体マウスの歯周組織細胞における SIX1 の発現様式の変化	39
4-2: ヒト培養歯根膜細胞における SIX1 の発現とその性質	41
4-3: <i>SIX1</i> による歯根膜細胞の増殖制御	42
4-4: 石灰化抑制因子としての <i>SIX1</i> の可能性	43
4-5: 歯周組織形成における <i>Six</i> ファミリー遺伝子の機能的重複の可能性	44
4-6: 今後の展望	45
5. 総括	47
6. 謝辞	49
7. 参考文献	50

1. 緒言

1-1: 歯科領域における再生医療

歯科領域における再生医療研究には主として2つの潮流がある。1つは齲蝕や外傷で喪失した歯を再生させるために、歯そのものを作り出そうとする研究である。もう1つは歯を支持する歯周組織を再生させる研究である（辻孝、岩田隆紀、他、2012）。一般には、歯の喪失理由として齲蝕、いわゆるむし歯を連想するが、実際には、歯周病がその大半である。歯周病は、不可逆的な歯槽骨の破壊を伴う炎症性疾患であり、炎症が治まっても歯周病で破壊された歯槽骨の修復は起こらない。そのため、歯周病治療の現状は、症状の進行を食い止め、歯周組織の現状を維持させる施術、といった保存的な治療が中心である。昨今、急速に普及しているインプラント（人工歯根）治療も、歯槽骨が維持されていなければインプラントを支持出来ないため、歯槽骨の破壊が進んでいる重度の歯周病の場合には、適用できない。

こうした歯科医療の背景をうけ、歯や歯周組織に存在する幹細胞を治療に活用する試みがなされている。歯科領域においては数種類の幹細胞が知られている。すなわち、歯の内部の歯髄から得られる歯髄幹細胞、歯根表面と歯槽骨の間の歯根膜から得られる歯根膜幹細胞、生えかわる乳歯の歯髄から得られる乳歯髄幹細胞、顎骨に埋伏し、口腔内に萌出する以前の歯胚を取り囲む歯小囊幹細胞、そして歯根完成前の根尖部から得られる根尖部幹細胞である（Achilleos and Trainor et al., 2012; Mayo et al., 2015）。なかでも、歯根膜幹細胞は歯周組織への分化能があり、入手や単離が容易なことから、歯周組織の再生材料として最も期待されている（Seo et al., 2004）。

1-2: 歯根膜の発生と機能

歯と歯周組織の発生機序の解明は、これらを再生させる医療技術の開発に有益な情報をもたらす。歯と歯周組織は歯胚に由来する。歯胚はエナメル器、歯乳頭、および歯小囊から構成され、歯根膜は歯小囊より発生する。ヒト歯胚の発生は、胎齢 6 週頃に口腔粘膜上皮が増殖し、肥厚することで、神経堤由来の外胚葉性間葉領域へ侵入することから開始される（蕾状期、**bud stage**）（図 1 黄色で示した領域）。肥厚した上皮はエナメル器となり、将来のエナメル質となる（帽状期、**cap stage**）。エナメル器の内側に取り込まれた外胚葉性間葉は、将来、歯髄と象牙質を生み出す歯乳頭になる。一方、エナメル器の外側の外胚葉性間葉は、将来の歯周組織となる歯小囊になる（鐘状期、**bell stage**）（Chai et al., 2000; Rothova et al., 2012）。



図 1. 初期歯胚の発生過程を示した模式図

肥厚した口腔粘膜上皮組織（黄色）の領域は、エナメル器を経て歯冠の外殻であるエナメル質となる。図中の青点は凝集した外胚葉性間葉を示す。凝集した外胚葉性間葉は **bell stage** までに歯乳頭（緑点）と歯小囊（赤点）となる。エナメル器の内側は歯髄、象牙質となる歯乳頭（緑点）が存在する。将来の歯周組織となる歯小囊（赤点）は、エナメル器の外側を取り囲む様に存在する。

歯小囊からは、歯周組織の構成要素であるセメント質・歯根膜・歯槽骨が分化する（図 2 左）。歯根膜は、歯根表面のセメント質と歯槽骨の間に介在し、歯をつなぎ止

める役割を担う靱帯様の線維性結合組織である。歯根膜は、歯の支持の他にも、咀嚼の際の咬合圧の緩衝作用、歯周組織の恒常性維持、そして歯周組織の再生に重要な役割を果たしている。歯根膜は、線維芽細胞に加え、セメント芽細胞、骨芽細胞、毛細血管、神経、組織再生に関わる未分化な組織幹細胞など、多様な要素により構成されている（図2右）。

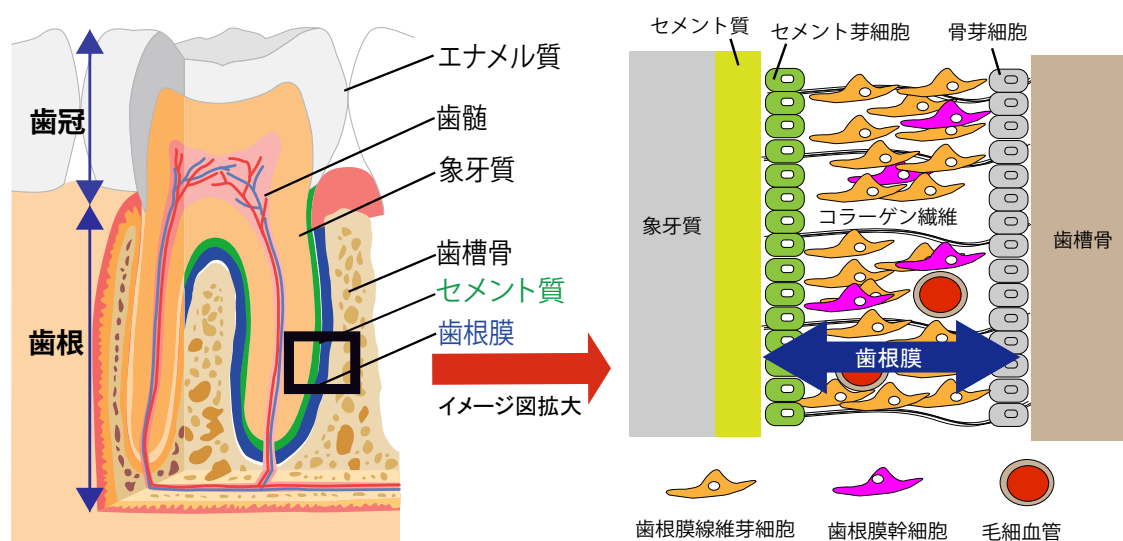


図2. 歯と歯周組織の構造を示した模式図

左図：歯は上部構造である歯冠と下部構造である歯根に区分される。歯冠の象牙質の外殻はエナメル質で覆われており、口腔内に露出している。歯根の象牙質は歯槽骨に埋まっている。象牙質の内部に、歯の神経と呼ばれる歯髄がある（左図は、医学図形データ 1000+Powerpoint による学会パーフェクトマニュアル, 2011 を改変した）。

右図：左図中の黒枠で示した歯根部を拡大したイメージ図。歯根象牙質表面はセメント質に覆われている。歯根膜は、歯根のセメント質と歯槽骨の間に存在するコラーゲン線維束であり、硬組織どうしを結合する靱帯様組織である。歯根膜には歯根膜線維芽細胞以外にも多様な細胞が存在する。

1-3: 歯根膜線維芽細胞の特徴

歯根膜が主として歯根膜線維芽細胞により構成されることと一致して、培養した歯

根膜由来細胞は、線維芽細胞様の紡錘形を示す。また、歯根膜は歯周靱帯とも呼ばれるが、それを反映するように、腱・靱帯関連の遺伝子である塩基性 helix-loop-helix (bHLH) 転写制御因子 Scleraxis (SCX) (Schweitzer et al., 2001) や細胞表面膜タンパク質 Tenomodulin (TNMD) を発現する (Shukunami et al., 2001)。Scx 欠損マウスは腱分化に著しい異常を示し (Murchison et al., 2007)、Tnmd 欠損マウスでは、腱細胞とそれらの前駆細胞が減少 (Docheva et al., 2005; Alberton et al., 2015) するのみならず、細胞外マトリクスのコラーゲン I やフィブロネクチンへの歯根膜線維芽細胞の接着性も減少する (Komiyama et al., 2013)。歯根膜由来細胞では、これらの腱関連遺伝子以外にも、骨関連の遺伝子である Runt-related transcription factor-2 (RUNX2) の発現や Osteocalcin (OCN) の発現を認めることから、歯根膜由来細胞は線維芽細胞様でありながら、骨形成細胞の性質を持つといえる。(Basdra et al., 1997; Saito et al., 2002)。しかしながら、歯小嚢や歯根膜を含む歯周組織においては、細胞増殖と分化に関わる転写制御因子とそれらの発現制御ネットワークは、ほとんど未解明である。

1-4: 転写制御因子 *Six1* と *Six* ファミリー遺伝子

Six ファミリー遺伝子は、転写制御因子をコードするホメオボックス遺伝子群の一つであり、哺乳類では 6 つのサブタイプが同定されている。*Six1* は、感覚器プラコードや耳胞、嗅上皮、味蕾および脳神経節 (Zheng et al., 2003; Li et al., 2003; Ozaki et al., 2004; Konishi et al., 2006; Ikeda et al., 2007; Sato et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Ikeda et al., 2010; Suzuki et al., 2011)、腎臓原基 (Laclef et al., 2003b; Self et al., 2006; Kobayashi et al., 2007) および、筋芽細胞・筋衛星細胞に発現し (Laclef et al., 2003a; Yajima et al., 2010; Le Grand et al., 2012)、細胞増殖や分化を制御する

ことが知られている (Kawakami et al., 2000; Wu et al., 2015 らの総説を参照)。 *Six1* 欠損ホモマウスは生後すぐに死亡するが、内耳、嗅上皮、味蕾などの感覚器、腎臓および骨格筋の形成が障害されることから、 *Six1* は発生段階における器官形成に重要な役割を担っている。出生後のマウス歯小嚢不死化細胞に *Six1* の発現が認められており (Yokoi et al., 2007)、所属する研究室の高橋も胎仔期マウスにおける歯小嚢での *Six1* の発現を報告した (Nonomura et al., 2010)。このように *Six1* は様々な器官形成に重要な働きを担い、胎仔期の歯根膜前駆細胞である歯小嚢での発現が認められながら、歯根膜形成における *Six1* の機能解析は今まで行われていない。さらに、近年報告された、バイオインフォマティクス的手法を用いて、ゲノム全体での転写開始点周辺の 10kb の範囲での DNaseI footprint 解析をもとに、既知の 475 種類の転写制御因子につき結合部位を決定した解析によると、解析対象の 41 種類の細胞のうち、ヒト培養歯根膜線維芽細胞において *SIX1* が細胞特異的である事に加え、分化制御において中心的役割をはたす遺伝子であると予想された (Neph et al., 2012)。しかし、この研究は調べられた転写制御因子の中で *SIX1* は歯根膜線維芽細胞においては相対的に重要である可能性が高い、と述べるにとどまるため、実際に *SIX1* が歯周組織での細胞増殖の制御や分化に関与しているかどうかは不明である。

その他の *Six* ファミリー遺伝子として *Six2*、*Six3*、*Six4*、*Six5*、および *Six6* がある。 *Six2* は発生過程の肢の腱前駆細胞で強く発現する (Yamamoto-Shiraishi and Kuroiwa, 2013)。 *Six2* は *Six1* とともに胎仔期歯小嚢に発現する (Nonomura et al., 2010)。 *Six3* および *Six6* は *Pax6* と協働し、レンズ形成に関わる (Oliver et al., 1995; Jean et al., 1999)。 *Six3* および *Six6* は胎仔期歯胚での発現は認められない。(Nonomura et al., 2010)。 *Six4* は *Six1* と胚における発現様式が類似しており、その役割も互いに重複している (Kawakami et al., 2000; Giordani et al., 2007; Grifone

et al., 2005; Konishi et al., 2006; Kobayashi et al., 2007; Fujimoto et al., 2013)。マウス胎仔期歯胚における *Six* ファミリー遺伝子の発現解析でも、マウス切歯と臼歯の内エナメル上皮で *Six1* と *Six4* は共通に発現する (Nonomura et al., 2010)。*Six4* 欠損ホモマウスは形態的な欠陥を生じないが、これは他の *Six* ファミリー遺伝子の機能相補による可能性が示唆されている (Ozaki et al., 2004)。*Six5* は成体骨格筋から単離した筋衛星細胞の増殖や分化に関与することが知られているが (Yajima et al., 2010)、胎仔期の器官形成における機能は不明な点が多い。胎仔期歯胚においては *Six5* の広範な発現を認める (Nonomura et al., 2010)。

※ 本文中の SIX 表記方法

Six (イタリック、先頭のみ大文字) : マウス遺伝子 *Six*

SIX (イタリック、全て大文字) : ヒト遺伝子 *SIX*

SIX (通常書体、全て大文字) : ヒトおよびマウスタンパク質 SIX

1-5: 研究目的

本研究は、*Six1* が歯根膜の発生において重要な役割を果たす遺伝子であるとの仮説をたて、この仮説を検証することを目的とした。そのために 1) 出生後マウスの歯小囊および歯根膜における経時的な SIX1 の発現解析を行った。2) 歯根の成長が盛んな 14 日齢 (PN14) と歯根完成期の 28 日齢 (PN28) マウスの歯根膜における SIX1 発現解析と 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を用いた増殖性細胞標識実験を行った。3) *Six1* 欠損ホモマウスと野生型マウスの胎齢 18.5 日 (E18.5) の歯小囊における増殖性細胞数の比較解析を、EdU を用いて行った。4) ヒト培養歯根膜細胞において *SIX1* siRNA を用いたノックダウン実験を行い、増殖性細胞数の変化を解析した。

2. 材料と方法

2-1: 実験動物

本研究における動物実験は自治医科大学動物実験委員会の承認のもと、研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針（文部科学省）に従って行った。C57BL / 6 マウスは日本クレア（Tokyo, Japan）より購入した。*Six1* 欠損ヘテロマウス (*Six1*^{+/-})（Ozaki et al., 2004）は、C57BL / 6 マウスに戻し交配して維持した。*Six1* 欠損ホモマウス (*Six1*^{-/-}) は *Six1*^{+/-} 同士を交配させることで得た。得られた胎仔や子孫の遺伝子型の確認は Ozaki et al. (2004) らの方法に従って PCR で行った。マウスの飼育は温度や明暗サイクルが管理された研究室内の飼育室で飼育した。

2-2: 凍結切片の免疫染色

マウス歯周組織の蛍光免疫染色法による観察を行うために、胎齢 18.5 日 (E18.5)、生後 0 日 (PN0)、7 日 (PN7)、14 日 (PN14)、28 日 (PN28)、56 日 (PN56) マウスに対しペントバルビタールによる深麻酔下にて、4% パラホルムアルデヒド (PFA) / リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH7.4) による心灌流固定を行った。サンプルとして用いたマウス頭部は、2 時間、4°Cにて 4% PFA / PBS に再度浸し固定した。マウス頭部を PBS にて十分に洗浄した後、4°Cにて 10%、20%、30%のショ糖溶液に順次浸し、細胞形態の保持処理を行った。E18.5 と PN0 のマウス頭部は、凍結切片用包埋剤 (OCT) compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) に包埋後、ドライアイスにて凍結し、使用まで-80°Cで保存した。クライオスタット (CM-3050, Leica, Germany) にて 10 μ m 凍結切片を作製した。PN7 以降の頭部は骨化が進み、通常の切片作製法が困難であるため、骨の脱灰が必要となる。しかしながら、脱灰に日数を要することと、抗原性の低下が危惧されることから、川本法によ

る凍結非脱灰切片作製法 (Kawamoto, 2003) を用いた。PN7、PN14、PN28、PN56 マウスの頭部は、川本法専用包埋材 (SCEM) (Section-Lab, Hiroshima, Japan) に包埋したのち、ヘキサシ・ドライアイスにて凍結した。タングステン刃 (TC-65, Leica) とクライオフィルム (Section-Lab) を使用して前頭断の 10 μm の切片を作製した。切片は 100% エタノールに短時間浸し、再固定した。スライドガラス上の切片およびフィルムで作製された切片は、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) にて 90°C で 10 分間処理し、その後室温にて冷却した。切片のブロッキングは、0.3% Triton X-100、1% ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) を含む PBS を用いて室温にて 30 分間行った。一次抗体反応は 4°C にて一晩行った。一次抗体反応の後、切片は PBS にて 3 回洗浄した。二次抗体反応は室温にて 2 時間反応させた。核染色は 50 ng/ml 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて行った。使用した抗体については後載リストに記載した (表 1)。切片は封入剤 (VECTASHILED, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入した。

Primary antibodies

Marker / Antigen	Antibody (clone name)	Types of proteins	Host, Isotype	Dilution	Source, Cat. No.
Six family	SIX1	Transcription factor	Genea pig, IgG	1:1000	Ikeda et al., 2007
Osteoblast	RUNX2	Transcription factor	Rabbit, IgG	1:1000	Abcam, ab102711
Embryonic stem cell	Nanog	Transcription factor	Goat, IgG	1: 50	R&D Systems, #963488
	Oct3/4		Goat, IgG	1: 50	R&D Systems, #962649
	SSEA4 (MC-813-70)	Cell surface glycosphingolipids	Mouse, IgG3	1: 50	R&D Systems, #962648
Mesenchymal stem cell	CD44 (Hermes-1)	Cell surface membrane protein	Rat, IgG2a	1:20	DSHB
	CD73 (EPR6114)	GPI-anchored cell surface protein	Rabbit, IgG	1:100	Abcam, ab133582
	CD90/Thy1 (EPR3133)		Rabbit, IgG	1:200	Abcam, ab133350
	CD105/Endoglin	Cell surface membrane protein	Rabbit, IgG	1:500	Abcam, ab107595
Endothelial cell & Mesenchymal stem cell	CD146 (EPR3208)	Cell surface membrane protein	Rabbit, IgG	1:500	Abcam, ab75769
Hematopoietic stem cell	CD45 (H5A5)	Cell surface membrane protein	Mouse, IgG1	1:20	DSHB
Osteogenic Differentiation	Osteocalcin	bone-related proteins	Mouse, IgG	1:100	R&D Systems
Chondrogenic Differentiation	Aggrecan	Extracellular Matrix Proteins	Goat, IgG	1:100	R&D Systems
Adipogenic Differentiation	FABP4	Lipid transport protein	Goat, IgG	1:100	R&D Systems

Secondary antibodies

Antigen	Color	Host, Isotype	Dilution	Source, Cat. No.
Anti-mouse IgG	Alexa488	Donkey, IgG	1:2000	Invitrogen
Anti-mouse IgG	Alexa546	Donkey, IgG	1:2000	Invitrogen
Anti-rat IgG	Dylight550	Donkey, IgG	1:2000	Invitrogen
Anti-rabbit IgG	Alexa555	Donkey, IgG	1:2000	Invitrogen
Anti-goat IgG	Alexa488	Donkey, IgG	1:2000	Invitrogen
Anti-guinea pig IgG	Cy3	Donkey, IgG	1:2000	Invitrogen

表 1 本研究で使用した一次抗体および二次抗体のリスト

2-3: ヒト培養歯根膜細胞の初代培養

患者からの抜去歯の入手はヘルシンキ宣言に基づいて行った。全ての実験プロトコールは自治医科大学の臨床研究倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 No. A14-066）。抜去歯の提供を受けた全ての患者に書面による説明を行い、使用目的について同意を得た。歯根膜細胞の初代培養は酵素法 (Seo et al., 2004) により行った。自治医科大学附属病院歯科口腔外科にて 3 人の成人患者から抜去された第三大臼歯を用いた（男性 1 人、女性 2 人：平均年齢 26 歳）。抜去歯の歯根中央部の歯根膜組織を外科用メス刃にて削ぎ、その組織片を 10% FBS と 1% の抗菌薬 / 抗真菌薬（100 U/ml ペニシリン, 0.1 mg/ml ストレプトマイシン, および 0.25 µg/ml アムホテリシ

ン B, Sigma) を含む 5 ml の α -MEM (product No. M0894, Sigma-Aldrich) 溶液中に 2 mg/ml コラゲナーゼ II (Cat. No. 4176, Worthington Biochem, Lakewood, NJ) および、1.5 mg/ml ディスパーゼ I (Cat. No. 17105-041, Invitrogen) を入れて 37°C、1 時間振盪した。歯根膜組織から得た浮遊細胞を 70 μ m ナイロンメッシュ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) に通過させ 10% FBS と 1% の抗菌薬 / 抗真菌薬を含む α -MEM に播種し、37°C、95% air、5% CO₂ 条件下の恒温培養器にて培養を開始した。培養開始後約 4~7 日で、細胞培養皿のプラスチック表面に接着するコロニーを数個から数十個確認出来るが、これを継代数 0 (passage 0, P0) とした。細胞培養皿上で増殖する歯根膜由来細胞が培養皿表面を 30% から 50% 覆う程度に増殖した時点で、0.25% トリプシン / EDTA を用いて培養皿から剥離し継代を行い、継代数 1 (P1) とした。以降は培養皿を 80%~90% 覆う程度まで増殖させて、同様に継代を行い、十分な細胞数が得られた P3 あるいは P4 の細胞を実験に使用した。

2-4: 培養細胞の免疫染色

観察用のカバーガラス (No. 1 thickness, outer diameter 13 mm, MATSUNAMI, Kishiwada, Japan) をあらかじめ 24 穴培養皿上に静置し、その上に観察に使用する細胞を 3.0×10^4 個ずつ播種した。培養開始して約 2~3 日後に培養皿の 80% を細胞が覆った時点で培養液を捨て、4% PFA / PBS にて室温で 20 分間固定を行った。固定後、PBS にて 3 回洗浄を行った。免疫染色は培養皿ごとに行い、凍結切片の免疫染色法と同様の方法で行った。使用した抗体については表 1 のリストに記載した。

2-5: 組織および培養細胞の EdU 標識方法

マウス組織の EdU 標識は Chehrehasa et al. (2009) に従った。EdU (Invitrogen,

Carlsbad, CA)は 0.9% 生理食塩水に溶解し 2.5 mg/ml の濃度となるよう調製した。これを PN13 および PN27 マウスの腹腔内に体重あたり 50 mg/kg になるように、灌流固定する 24 時間前から 8 時間おきに計 3 回投与した。E18.5 マウスへの標識は妊娠母マウスの腹腔内に体重あたり 50 mg/kg となるように、灌流固定する 2 時間前に 1 度だけを行った。培養ヒト歯根膜細胞の EdU 標識は Invitrogen のプロトコールに従った。細胞は 24 穴培養皿に播種後、46 時間培養し、続いて、EdU の培養液中の濃度が 20 μ M となるように調製した培養液中でさらに 2 時間培養した。培養開始から 48 時間後 4% PFA / PBS にて室温で 20 分間固定を行った。細胞に取り込まれた EdU の検出は Invitrogen のプロトコールに従った。切片又は細胞の透過処理は、0.3% Triton X-100 を含む PBS により室温で 20 分間行った。透過処理中に、Alexa Fluor 555 azide を含む Click-iT reaction 混合液 (Cat. No. C10338, Invitrogen) を用時調製し、切片又は細胞と 30 分間室温にて反応させた。SIX1 の蛍光免疫染色と DAPI による核染色は先述の方法で行った。

2-6: ヒト培養歯根膜細胞の分化誘導実験

軟骨細胞、骨芽細胞および脂肪細胞への各分化誘導は、Human Mesenchymal stem Cell Functional Identification kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) に含まれた各分化誘導サプリメントを含む基礎培地を用いて以下のように行った。

軟骨細胞分化誘導: 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを含む D-MEM (product No.31600-034, Invitrogen) / F-12 (product No.21700-075, Invitrogen) 培地中にインスリン、トランスフェリン、亜セレン酸を含む付属サプリメントを添加して基礎培地とした後、デキサメタゾン、アスコルビン酸、TGF- β 3 含有サプリメントを追加して軟骨細胞分化誘導培地とした。15 ml ポリプロピレンチューブに 500 μ l の軟骨細胞

分化誘導培地を入れ、続けて P4 の 2.5×10^5 個の培養歯根膜細胞を懸濁させた後、 $200 \times g$ 、室温にて 5 分間遠心分離し、ペレットを作製した。ペレットは 15 ml ポリプロピレンチューブの中で 37°C 、95% air / 5% CO_2 環境下において静置培養した。その後 3 日間毎に軟骨細胞分化誘導培地を交換し、21 日間培養した。

骨芽細胞分化誘導: 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを含む 10% FBS 含有 α -MEM を基礎培地として、デキサメタゾン、アスコルビン酸、 β グリセロリン酸含有サプリメントを追加して骨芽細胞分化誘導培地とした。24 穴培養皿に観察用カバーガラスをあらかじめ静置し、免疫染色観察時と同様の方法にて培養皿を 50%~70% 覆う程度になるまで約 2 日培養した。その後、用意した骨芽細胞分化誘導培地に交換し 37°C 、95% air / 5% CO_2 環境下において培養した。その後 3 日間ごとに骨芽細胞誘導培地を交換し 21 日間培養した。

脂肪細胞分化誘導: 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを含む 10% FBS 含有 α -MEM を基礎培地として、ハイドロコルチゾン、イソブチルメチルキサンチン、インドメタシン含有サプリメントを追加して、脂肪細胞分化誘導培地とした。培養皿を 100% 覆う程度に達した後、骨分化誘導と同様の方法にて静置培養した。

2-7: ヒト培養歯根膜細胞への siRNA 導入

2 種類の *SIX1* siRNA (Cat. No. S12874 and S12876, *Silencer*® Select) を等量混合したものと、コントロールとして、それと同量の negative control siRNA (Cat. No. 4390843, *Silencer*® Select Negative Control No.1 siRNA) を実験に用いた。用いた siRNA の塩基配列は企業秘密下にあるためここでは記載しない。細胞への導入は、推奨されたリバーストランスフェクションのプロトコールに従い行った。2 種類の *SIX1* siRNA はそれぞれ 15 pmol ずつ計 30 pmol、negative control siRNA も同量の 30

pmol を 50 μ l の Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) に溶解した。次に導入試薬 Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen) 1.5 μ l を 50 μ l の Opti-MEM®で希釈し、5 分間室温にて静置した。その後、24 穴培養皿に siRNA 溶液 50 μ l を加え、続いて希釈した導入試薬溶液 50 μ l を添加し、20 分間室温で静置し複合体を形成させた。続いて P4 の培養歯根膜細胞 3.0×10^4 個を 400 μ l の 10% FBS を含む α -MEM に懸濁させた溶液を複合体の入った培養皿へ播種した (各培養皿の *SIX1* siRNA と negative control siRNA の最終濃度は 60 nM となる)。siRNA が導入された培養歯根膜細胞は、48 時間後に固定して免疫染色に用いるか、ウェスタンブロット解析に用いるための細胞溶解液作製に供した。

2-8: ウェスタンブロット解析

ヒト培養歯根膜細胞を PBS で 3 回洗浄した後、培養皿からセルスクレイパーを用いて回収し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete Protease Inhibitor cocktail, Roche, Basel, Switzerland) を含むタンパク質可溶化液 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 0.1% SDS, and 0.1% NP-40) の中で溶解した。細胞溶解液を氷上にて 15 分間静置後、17,360 \times g、4°Cにて 20 分間遠心分離し、溶液の上澄みをタンパク質抽出液として回収し、-80°Cで保存した。タンパク質抽出液を、各レーン 2 または 5 μ g タンパク質ずつ 12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、タンク式ブロッティング装置を用いて PVDF メンブランに転写した。転写後、PVDF メンブランは TBST (0.1% Tween-20 を含む Tris-HCl 緩衝液: 組成 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.14 M NaCl, and 2.7 mM KCl) により洗浄し、5% スキムミルク / TBST にて 60 分間ブロッキングを行った。次にメ

ンブランは一次抗体として抗 SIX1 モルモット抗体 (Ikeda et al., 2007, 3000 倍希釈)、抗 γ -tubulin ウサギ抗体 (Abcam, ab16504, 6000 倍希釈) と一晩室温にて反応させた。メンブランを TBST にて洗浄後、二次抗体として、抗モルモット IgG HRP 標識抗体と抗ウサギ IgG HRP 標識抗体 (Jackson Immuno, West Grove, PA, USA) を室温にて 2 時間反応させた。タンパク質の検出は Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 6000 倍希釈による化学発光反応を、冷却 CCD カメラ ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) を用いて解析した。検出されたバンドの強さを Image J にて定量し、 γ -tubulin 量を用いて補正した。

2-9: 画像撮影と細胞数計測

免疫染色後のマウス組織切片およびヒト培養歯根膜細胞の蛍光写真の撮影は、CCD カメラ (DP71, Olympus)、イメージングソフトウェア (cell Sens, Olympus) を搭載した蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan)、または共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) にて行った。マウス歯小囊細胞数の計測は、撮影画像を Photoshop CS6 (adobe) のカウントツール機能により手動計測した。ヒト培養細胞数の計測用画像の収集は、自動計測機能付き蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) にて行い、計測は付属ソフトウェアのハイブリッドセルカウントを使用した。

3. 結果

3-1: 生後マウスの歯小囊および歯根膜における SIX1 の発現

Six1 の歯根膜形成への関与を明らかにするためには、歯根膜前駆細胞に SIX1 タンパク質が発現しているかどうか、どのような細胞種に局在するかを知る必要がある。歯根膜前駆細胞は歯周組織構成要素への分化能を有する細胞集団であり、生体においては歯小囊とよばれる。そこで、出生後の異なるステージでの歯小囊（DF）と歯根膜における SIX1 タンパク質の発現を、蛍光免疫染色法を用いて解析した（図 3）。観察対象として下顎第一大臼歯を選択した。生後 0 日齢（PN0）では歯小囊細胞の核に SIX1 の強い発現を認め、その分布は歯小囊の全体に広がっていた（図 3A1-4）。歯根が成長を始める出生後 7 日齢（PN7）では PN0 と類似した発現パターンを認めた（図 3B1-4）。出生後 14 日齢（PN14）は歯根の伸長が最も盛んな時期である。下顎歯根は下方向へ伸長するため、歯根上方（歯頸部～中央）と歯根下方（根尖部）における SIX1 陽性細胞の分布を比較した。SIX1 陽性細胞は歯根膜の上方と下方のどちらにも観察された（図 3C1, 2）。歯根表面を覆うセメント質は歯小囊に由来するセメント芽細胞から分化するが、歯根表面に存在するセメント芽細胞（CB: アスタリスク*）に SIX1 の発現は認められなかった（図 3C3, 4）。

歯根がほぼ完成する生後 28 日齢（PN28）では、歯根膜細胞のほとんどは歯根膜の主たる構成要素である線維芽細胞へと分化している。SIX1 タンパク質の発現は歯根膜全域で続いており、その局在も歯根膜線維芽細胞の核に認められた（図 3D1-4）。しかしながら、その発現レベルは PN14 と比較して減少していた。生後 56 日齢（PN56）の成体では SIX1 陽性細胞は存在していたが、SIX1 の発現レベルはさらに減少していた（図 3E1-4）。SIX1 は、PN0 から PN28 までは核に局在していたが（図

3A-D3, 4)、PN56 では核に局在するものと細胞質に局在するものの、2 種類の細胞を認めた (図 3E3, 4)。これらの解析からマウスの歯と歯周組織が成熟する間に SIX1 発現細胞数は大幅に減少し、成体ではごく少数の細胞にのみ、その発現が認められることが明らかになった (図 3A-E、図 4)。

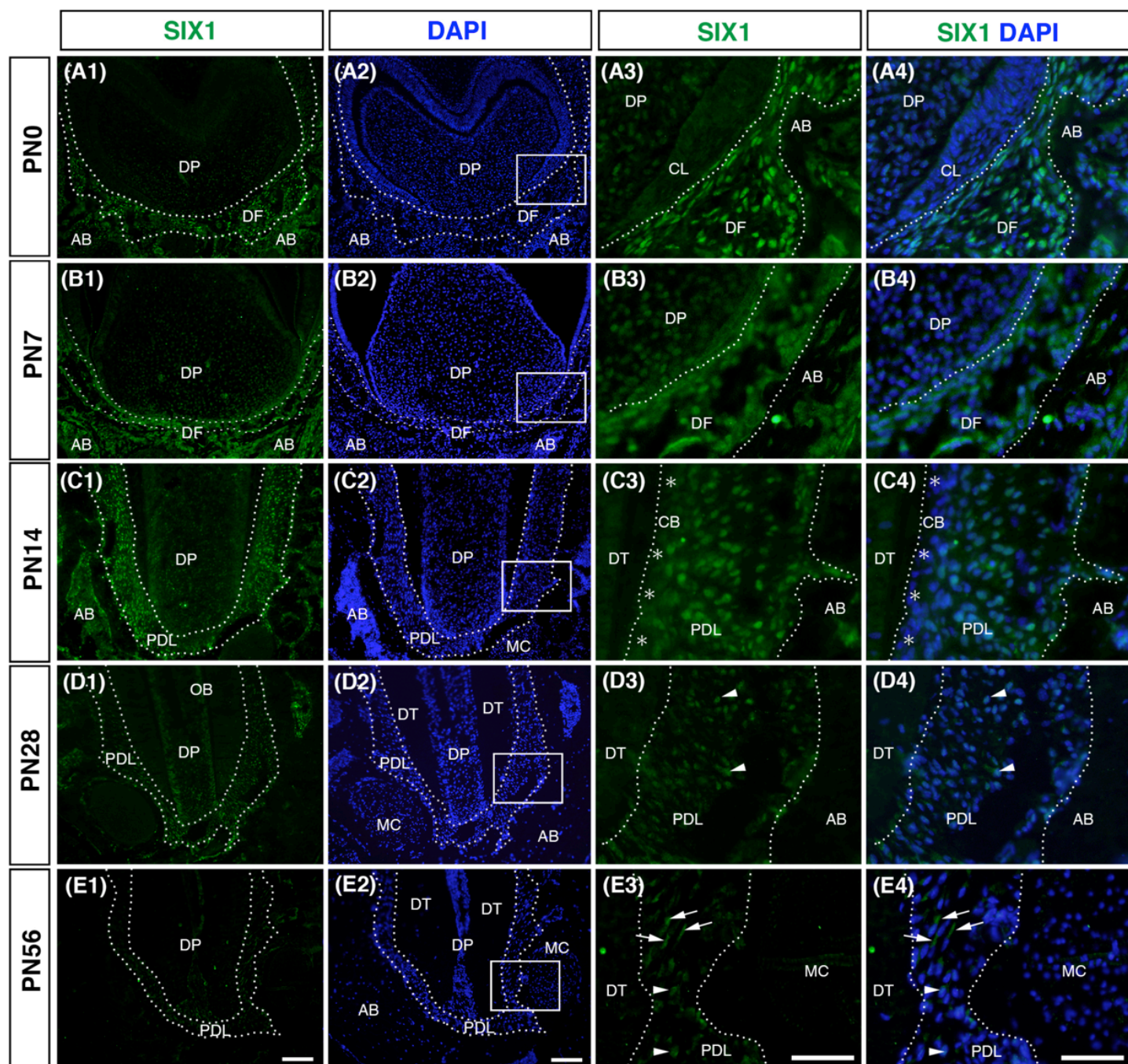


図 3. 生後マウスにおける歯と歯周組織における SIX1 発現

生後 0 日齢 (PN0)、7 日齢 (PN7)、14 日齢 (PN14)、28 日齢 (PN28)、56 日齢 (PN56) のマウス下顎第一大臼歯の前頭断を表す。SIX1 抗体を用いて蛍光免疫染色した (図 3A-E1, 3, 4)。核染色は DAPI を使用した (図 3A-E2, 4)。各パネルの破線で囲まれた部位は歯と歯槽骨の間に存在する歯小囊、あるいは、歯根膜の領域を表す。各日齢の染色パネル中の小さい四角で囲まれた部位の拡大パネルを、各日齢右 2 列に示した。

(A1-A4). PN0: 歯根形成が始まる直前であり、歯小囊 (DF) と歯槽骨 (AB) に SIX1 の強い発現が観察されるが (A1, A3)、歯髄 (DP) や歯根端を形成するサービカルループ (CL) では発現が弱い。SIX1 は歯小囊細胞および歯槽骨の核に局在する。

(B1-B4). PN7: 歯根形成が開始し、個体の成長に伴い歯小囊は歯根膜へ分化を始める。SIX1 の局在は核に見られる (B1, B3)。

(C1-C4). PN14: 歯根の成長が最も盛んな時期である。歯根の伸長とともに歯小囊より分化した線維芽細胞が、歯根表面のセメント芽細胞 (CB) と歯槽骨を強く固につなぎ、靱帯様組織が形成されていく。SIX1 は歯根膜全域に発現が観察されるが、歯根表面にあるセメント芽細胞には発現が見られない (C3, C4 の*)。

(D1-D4). PN28: 歯根はほぼ完成する。個体は摂食を開始している。歯根膜細胞の SIX1 の発現は PN14 と比較して減少している (D3, D4 の矢頭)。歯の内部で歯髄に近接する象牙芽細胞 (OB) に SIX1 の発現が観察される (D1)。

(E1-E4). PN56: 歯と歯周組織はどちらも完成し、歯根膜細胞の盛んな増殖期は既に終わっている。SIX1 の発現はさらに低下しており (E3, E4 の矢頭)、歯根膜線維芽細胞の核および細胞質への局在が観察される (E3, E4 の矢印)。

縮尺: 100 μm (A1-A2, B1-B2, C1-C2, D1-D2, および E1-E2)、25 μm (A3-A4, B3-4, C3-D4, および E3-E4)

略語表記:

AB, alveolar bone; 歯槽骨

CB, cementoblasts; セメント芽細胞

CL, cervical loop; サービカルループ (歯頸湾曲部)

DF, dental follicle; 歯小囊

DP, dental pulp; 歯髄

DT, dentin; 象牙質

MC, mandibular canal; 下顎管

OB, odontoblasts; 象牙芽細胞

PDL, periodontal ligament; 歯根膜

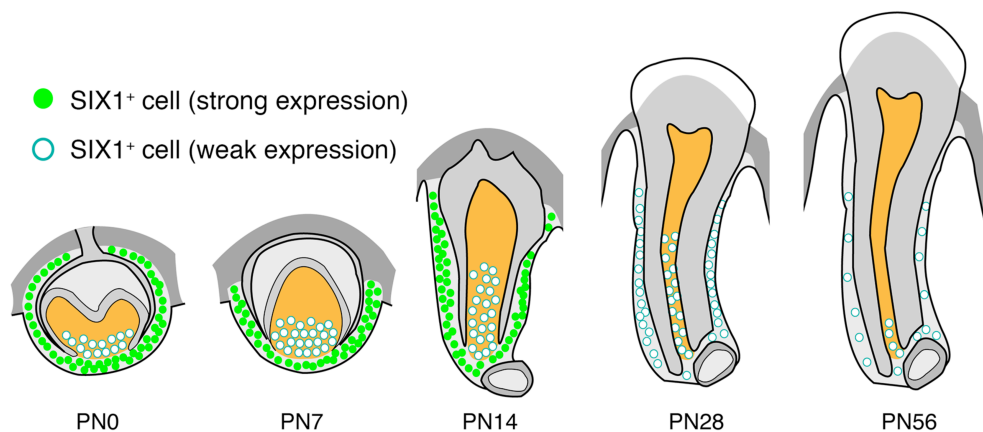


図 4. 歯小囊および歯根膜における SIX1 陽性細胞の分布の模式図

3-2: 生後マウス歯根膜における増殖性細胞数の変化

SIX1 タンパク質はマウス歯根膜前駆細胞である歯小囊に強く発現していたが、歯小囊から歯根膜への分化過程の中で発現レベルが徐々に低下したことは、増殖や分化を司る前駆細胞と SIX1 の発現に何かしら関係がある可能性を惹起した。そこで次に、歯根膜における SIX1 陽性細胞と増殖性細胞の分布を、歯根形成と歯根膜への分化が盛んである PN14 と歯根完成期で、歯根膜への分化が終了しつつある PN28 において比較した。増殖性細胞を効率よく標識するために、EdU の腹腔内注射を 8 時間おきに 1 日に 3 回行った (図 5A)。歯根膜における SIX1 の発現パターンは EdU 非投与のマウスと同様であった (図 5C)。多くの EdU 陽性細胞が PN14 マウスの歯根膜において認められた (図 5B)。EdU は DNA 合成期の細胞に取り込まれることで増殖性細胞を標識する。歯根の成長に伴い歯根膜が活発に形成されている PN14 マウスでは、主として、歯根が盛んに伸長している根尖周囲の下方の領域に、EdU 陽性細胞が多く分布していた (図 5B, E, I)。また、SIX1 陽性細胞は増殖性細胞と非増殖性細胞のいずれにも認められた (図 5G, K)。これに対し、歯根完成期に相当する PN28 では、

EdU 陽性細胞数は歯根膜の上方、下方いずれの領域でも PN14 に比べて減少した (図 5M, P, T)。また、歯根膜における SIX1 陽性細胞数は PN14 マウスに比べて減少した (図 5N, Q, U)。PN28 マウスでは EdU と SIX1 が共陽性を示す細胞の数は減少していた (図 5R, V)。SIX1 発現分布と発現レベルの変化が、歯根膜の分化過程において、歯根膜前駆細胞の増殖の制御に関与することが示唆された。

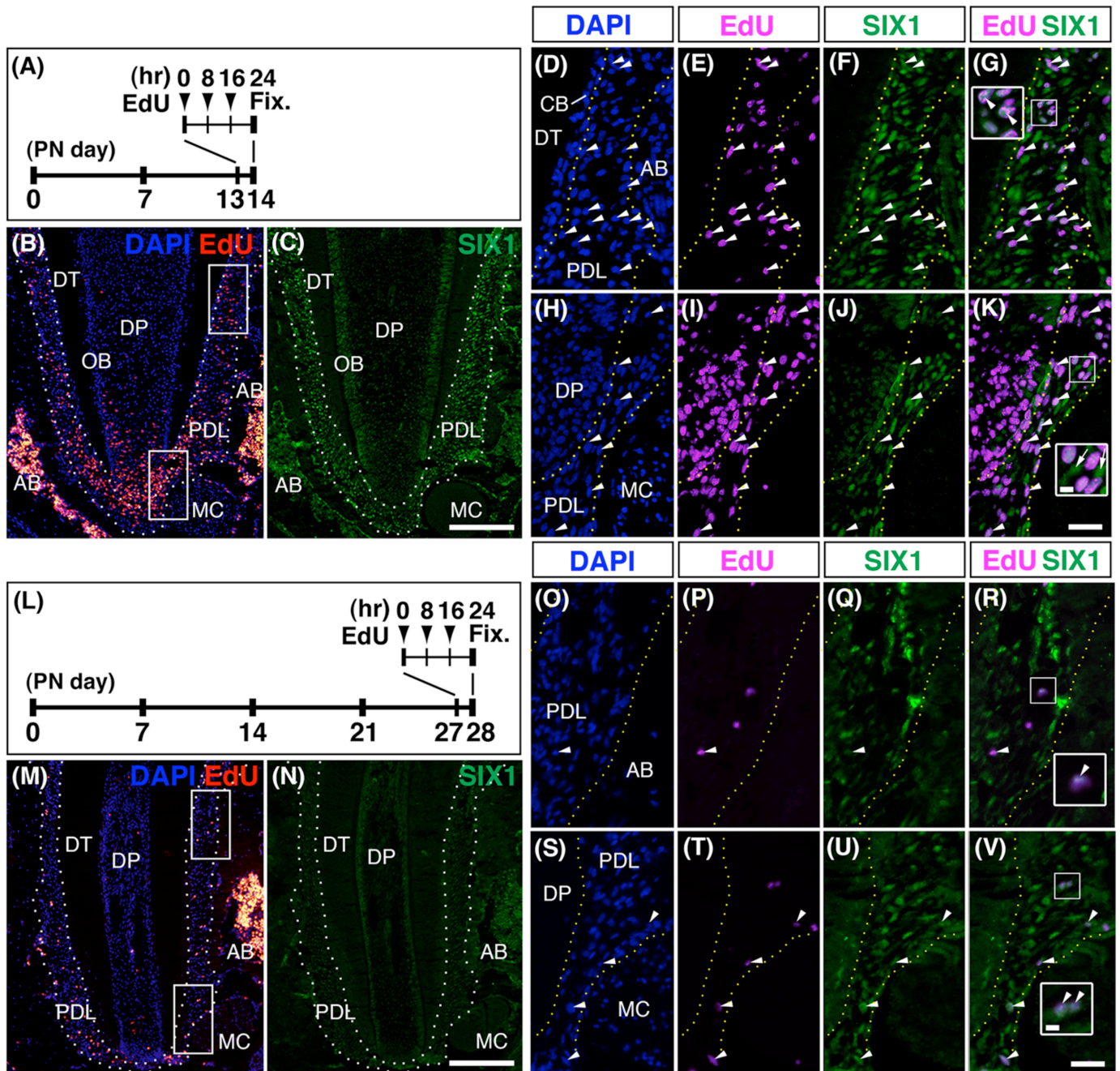


図 5. 生後 14 日齢 (PN14) および生後 28 日齢 (PN28) における SIX1 陽性細胞と EdU 陽性細胞の歯根膜における局在様式

(A). PN13 マウスへの EdU 投与スケジュール。固定 24 時間前から 8 時間おきに 3 回、腹腔内投与した。

(B, C). PN14 マウス歯根膜の SIX1 および EdU の蛍光免疫染色。

(B). EdU の検出は共役反応で検出した Alexa Fluor555 azide による。

(C). SIX1 陽性細胞は歯根膜および歯槽骨に分布する。

(D-G). パネル B 内の 2 つの白枠の囲みのうち上方の部位の拡大パネル。
(H-K). パネル B 内の 2 つの白枠の囲みのうち下方の部位の拡大パネル。
G および K のパネル内の小さい白枠は、G, K 内の拡大パネルの部位を示す。
(L). PN27 マウスへの EdU 投与スケジュール。PN14 同様に固定 24 時間前から 8 時間おきに 3 回、腹腔内投与した。
(M, N). PN28 マウス歯根膜の SIX1 および EdU の蛍光免疫染色。
(O-R). パネル M 内の 2 つの白枠の囲みのうち上方の部位の拡大パネル。
(S-V). パネル M 内の 2 つの白枠の囲みのうち下方の部位の拡大パネル。
D-K および O-V 内の矢頭は、SIX1 陽性かつ EdU 陽性細胞を示している。K パネル内の拡大パネルの矢印は、SIX1 陽性ながら EdU 陰性の細胞を示している。

縮尺:100 μm (B, C, M, N)、25 μm (D-K, O-V)、10 μm (白枠囲み G, K, R, V)

略語表記：

AB, alveolar bone; 歯槽骨
DP, dental pulp; 歯髄
DT, dentin; 象牙質
MC, mandibular canal; 下顎管
OB, odontoblasts; 象牙芽細胞
PDL, periodontal ligament; 歯根膜

3-3: 野生型および *Six1*^{-/-} マウス歯小囊における増殖性細胞比率の比較

歯根膜が成熟する間の細胞増殖の制御に *Six1* が関与するかどうか明らかにするために、*Six1* 欠損ホモマウス (*Six1*^{-/-}) (Ozaki et al., 2004) を用いた。*Six1*^{-/-} は出生と同時に死亡するため、出生直前の胎齢 18.5 日 (E18.5) マウスを使用した。E18.5 マウスの歯は成長途中の、歯胚の段階であり、注目する歯根膜はその前駆細胞集団である歯小囊の段階である。胎仔期の歯小囊における *Six1* mRNA の発現はすでに報告されているが (Nonomura et al., 2010)、そのタンパク質の局在様式はまだ明らかではない。そこで、E18.5 マウス歯小囊における SIX1 タンパク質の発現を解析した。外

エナメル上皮 (OEE) の外側に存在する CD146 陽性の血管内皮細胞の周辺において、SIX1 陽性細胞を確認できた (図 6A-I)。また、SIX1 陽性細胞は CD146 の発現を示さなかった (図 6D-I 矢印および矢頭)。これらの結果から、歯小囊における SIX1 陽性細胞のほとんどは、神経堤に由来する細胞であることが示唆された。

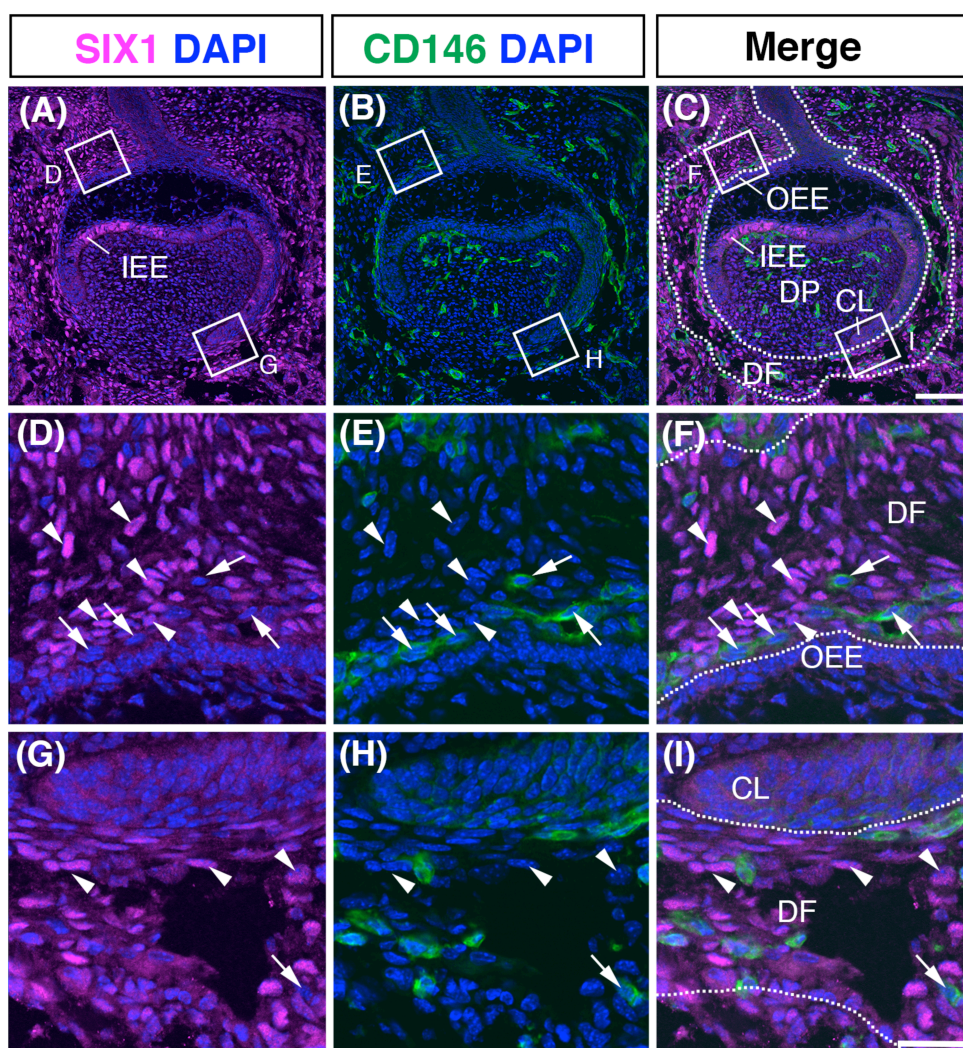


図 6. マウス歯小囊における SIX1 の発現

(A-I). 野生型 E18.5 マウスの下顎第一大臼歯の前頭断切片における蛍光免疫染色。SIX1 (A, D, G) および CD146 (B, E, H)、SIX1, CD146 の結合画像 (C, F, I) を示す。

(D-F). パネル A, B, C の白枠のうち上方部分の拡大パネル。外エナメル上皮 (OEE) を取り囲む様に歯小囊が存在し、OEE に SIX1, CD146 の発現は見られない。

(G-I). パネル A, B, C の白枠のうち下方部分の拡大パネル。根尖形成の先端部であるサービカルループ (CL) は歯胚の内側を裏打ちする内エナメル上皮 (IEE) と OEE の合流点である。CL には SIX1 と CD146 の発現は見られない。

(B, E, H). 歯小嚢と歯髄内の毛細血管に CD146 の発現が観察される。

縮尺: 100 μm (J, K)、30 μm (L-O)

略語表記:

CL, cervical loop; サービカルループ (歯頸彎曲)

DP, dental pulp; 歯髄

DF, dental follicle; 歯小嚢

IEE, internal enamel epithelium; 内エナメル上皮

OEE, outer enamel epithelium; 外エナメル上皮

歯小嚢における SIX1 陽性細胞と増殖性細胞との関連を解析するため、妊娠中の母マウスに EdU の腹腔内投与を行った (図 7G)。投与は E18.5 マウスを採取固定する 2 時間前に行い、その 2 時間に EdU で増殖性細胞を標識し、野生型と *Six1*^{-/-} の歯小嚢における増殖性細胞数の比率を比較した。前頭断のマウス下顎第一大臼歯胚を含む前頭断切片において歯小嚢を観察すると、歯小嚢の幅はサンプルの切断面や個体毎の違いから、約 30 μm から 100 μm 程度とばらつきが見られた。また歯小嚢内であっても外エナメル上皮に近い血管周囲は歯根膜となるが、外エナメル上皮から遠い外側は固有歯槽骨となることが知られている。(Avery, 2002)。そこで、将来の歯根膜前駆細胞群に注目して解析するために、外エナメル上皮の外側から 30 μm の範囲の血管層に近い部分に含まれる細胞群を、解析の対象とした (図 7C-F, H)。この範囲にある細胞の EdU 陽性細胞の比率を野生型マウス (WT) および *Six1*^{-/-} の間で比較したところ、EdU で標識された増殖性細胞の割合は、WT が $22.7 \pm 0.5\%$ 、*Six1*^{-/-} は $18.0 \pm 0.9\%$ であり、両者の間に統計的有意差が認められた (図 7I)。これらの結果から、

Six1 が歯小囊において細胞増殖を担うことが示唆された。

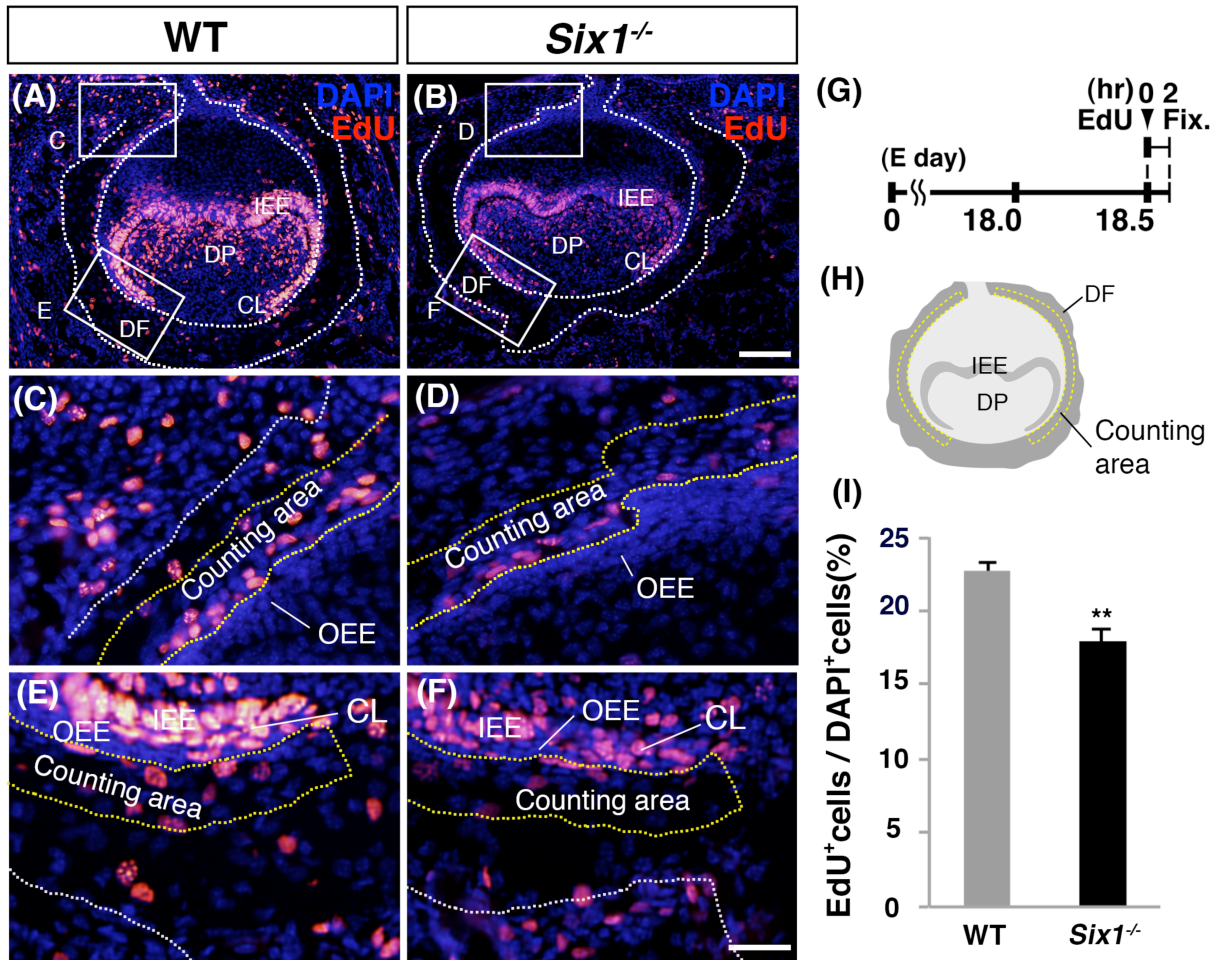


図 7. E18.5 歯小囊における WT と *Six1*^{-/-} の増殖性細胞比率の比較

(A, C, E). WT E18.5 マウス第一大臼歯胚の前頭断。

(B, D, F). *Six1*^{-/-} E18.5 マウス第一大臼歯胚の前頭断。

パネル C, E およびパネル D, F はパネル A, B 内白枠の拡大パネル。パネル内の白破線は歯小囊の境界を示す。黄色破線は OEE から 30 μ m の範囲の計測領域の境界を示している。

(G). 妊娠マウスへの EdU 投与スケジュール。E18.5 マウスを採取固定する 2 時間前に腹腔内投与した。

(H). 計測領域の模式図

(I). 計測領域内の細胞の EdU 陽性細胞の比率 (n=3, WT および *Six1*^{-/-} 各 3 匹ずつ、Student's *t*-test, ** *P*<0.01)

縮尺:100 μm (A, B)、30 μm (C-F)

略語表記:

CL, cervical loop; サービカルループ (歯頸彎曲)

DP, dental pulp; 歯髄

DF, dental follicle; 歯小嚢

IEE, internal enamel epithelium; 内エナメル上皮

OEE, outer enamel epithelium; 外エナメル上皮

3-4: ヒト培養歯根膜細胞の性質

緒言で既に述べたように、他の組織同様に歯と歯周組織には少数の組織幹細胞が存在し、恒常性の維持や組織が損傷を受けた際に再生を行うことが知られている (Howard et al., 1998; Shimono et al., 2003)。今回注目している歯根膜に存在する歯根膜幹細胞、および歯髄中にある歯髄幹細胞は、旺盛な増殖性と多分化能を有すること、また廃棄される智歯から容易に採取可能であることから、歯・歯周組織の再生治療への活用に期待が寄せられている (Seo et al., 2004; Huang et al., 2009)。しかしながら、増殖や分化における転写制御因子の働きや幹細胞の維持機構などはほとんど未解明である。マウス歯小嚢及び歯根膜において、**SIX1** 陽性細胞が歯根膜の成熟とともに減少し、マウス歯小嚢における細胞増殖を *Six1* が担うことが分かったため、次に、ヒト培養歯根膜細胞の増殖に注目した。

3 人の患者から得られた歯根膜を酵素法により単一の細胞に分離させた後に、初代培養した。単離した細胞はコロニーを形成した。プラスチック培養皿に接着性を有し、線維芽細胞様の紡錘形をしていた。実験に使用するための十分量の細胞を得るために細胞数を増加させ、3 継代目 (P3) または 4 継代目 (P4) の細胞を実験に使用した

(図 8A)。得られた細胞は骨芽細胞マーカーである RUNX2 を発現するとともに、歯根膜マーカーの 1 つである Tenomodulin (TNMD) を発現していた (図 8A)。SIX1 についても、ほぼ全ての細胞の核に発現が観察された (SIX1:753 個、DAPI:765 個) (図 8B1-3)。

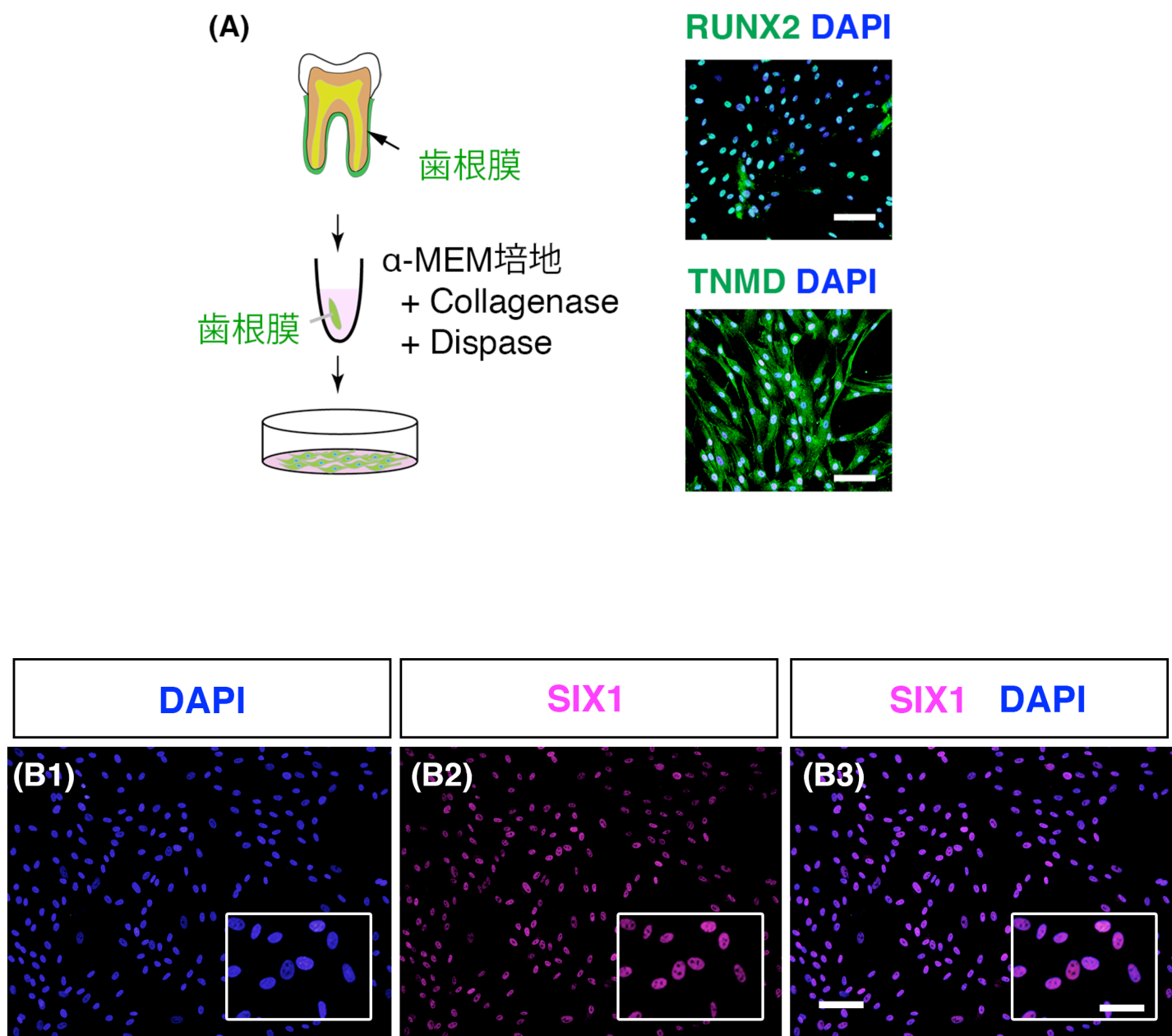


図 8. 本研究で用いたヒト培養歯根膜細胞の性質

(A). ヒト培養歯根膜細胞の初代培養方法と継代の方法を示した模式図。

これらの細胞では **RUNX2** の発現、および **TNMD** の発現が見られる。

(B). **SIX1** 抗体による蛍光免疫染色。核染色には **DAPI** を用いた。**SIX1** は核に局在している。

縮尺: 200 μm (A, B)、50 μm (白枠の拡大パネル B)

次に 3 人の患者から得られた歯根膜由来細胞が、幹細胞の性質を持つか否かを確かめるために、ES 細胞マーカータンパク質および間葉系幹細胞マーカータンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行った。現在のところ、歯根膜幹細胞に特異的な幹細胞マーカーは報告されていないため、歯根膜幹細胞研究で多用されているマーカータンパク質を幹細胞の性質を判断する抗原とした (Chamila Prageeth Pandula, P. K. et al., 2014)。まず、未分化性マーカータンパク質として、ES 細胞マーカータンパク質を認識する **NANOG**、**OCT3/4**、**SSEA-4** 抗体を用いて染色を行った (図 9A-C)。

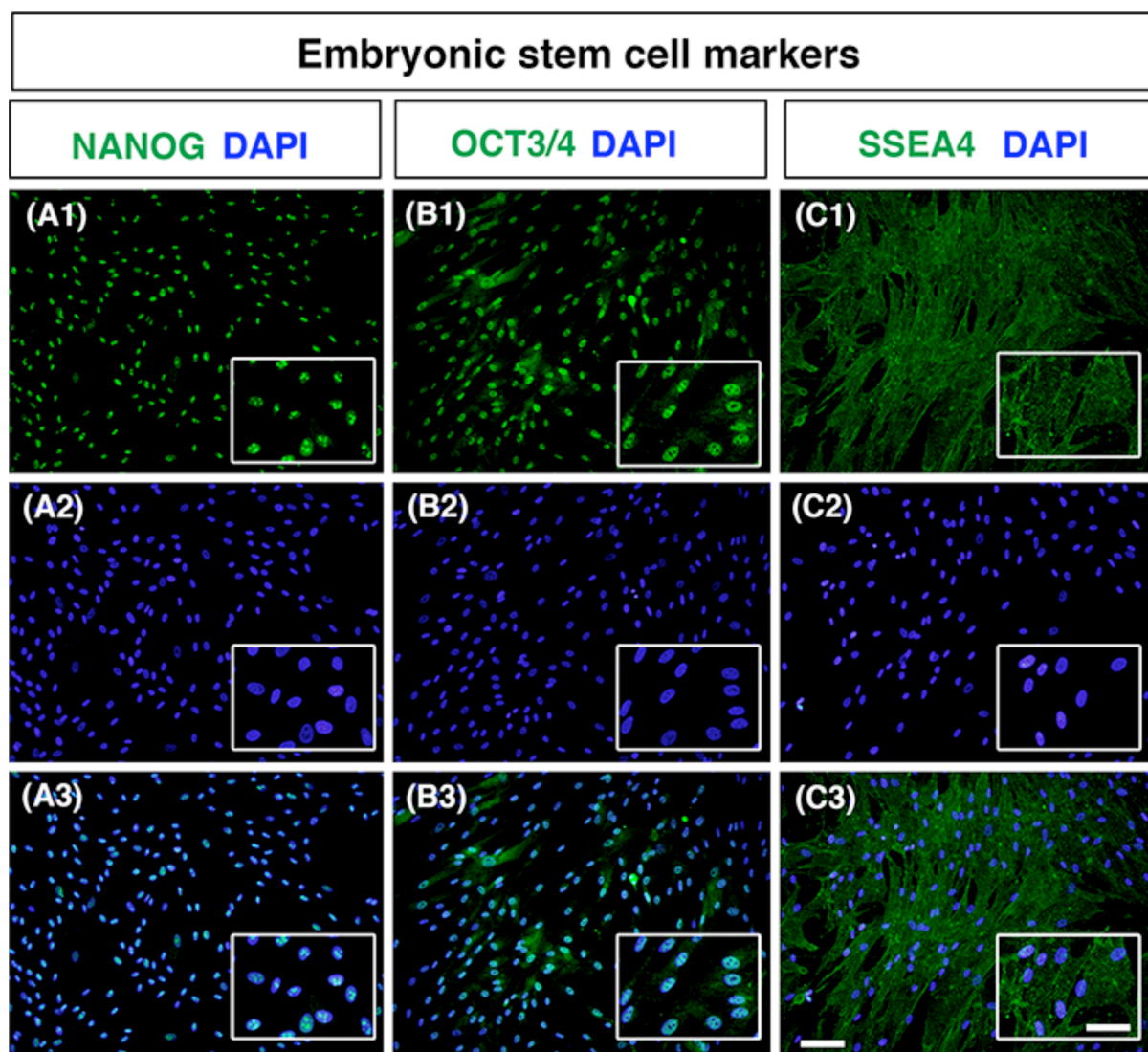


図 9. 本研究で用いたヒト培養歯根膜細胞の未分化性の確認

(A-C). ES 細胞マーカーによる蛍光免疫染色

NANOG (A1, A3), OCT3/4 (B1, B3), SSEA4 (C1, C3)、核染色には DAPI を用いた。

縮尺: 200 μm (A-C)、50 μm (白枠の拡大パネル A-C)

間葉系幹細胞マーカータンパク質として CD73、CD105、CD90、CD44、CD146 についてそれぞれ免疫染色を行ったところ、3 人の患者から得られた各培養歯根膜細胞において、上記マーカータンパク質を発現する細胞が観察された。一方、造血幹細胞マーカータンパク質の 1 つである CD45 の発現は見られなかった (図 10A-F)。

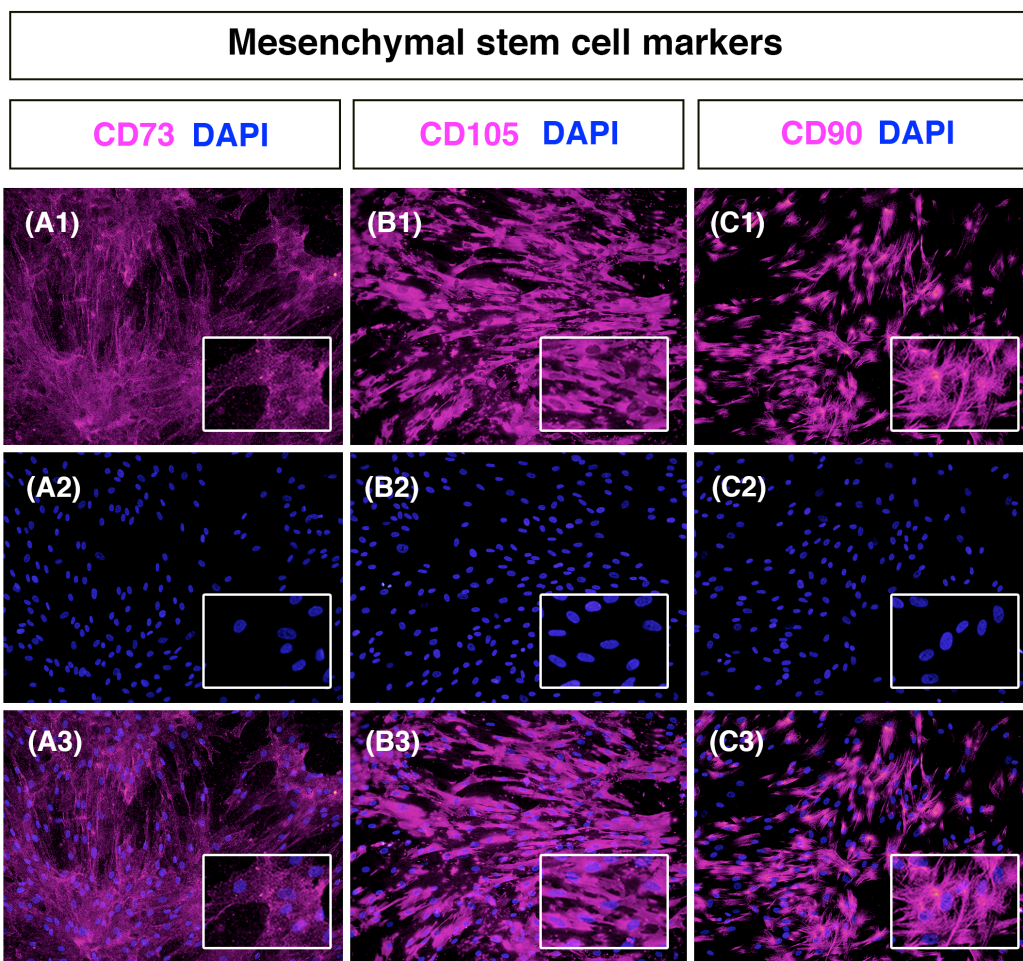


図 10-1.

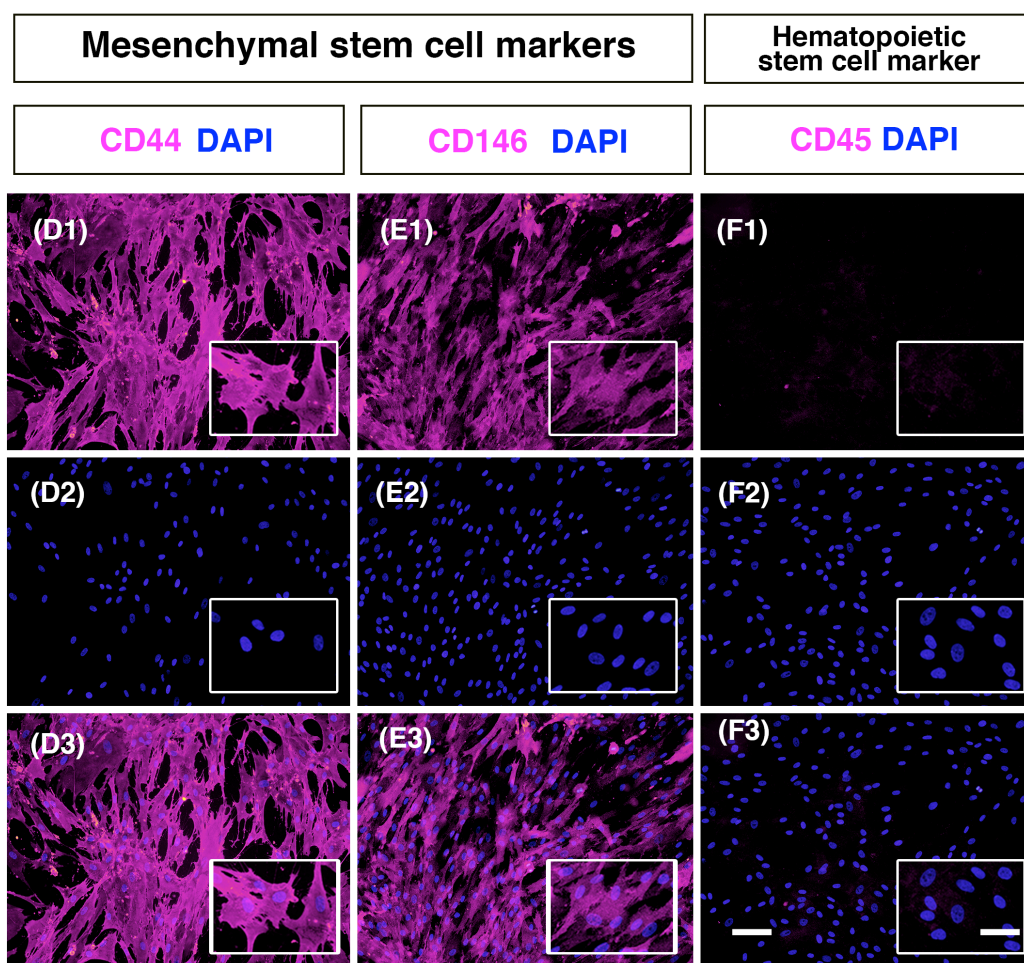


図 10-2

図 10-1, 2. 間葉系幹細胞マーカータンパク質抗体による蛍光免疫染色

(A-E). 各種陽性マーカーによる染色

CD73 (A1, A3)、CD105 (B1, B3)、CD90 (C1, C3)、CD44 (D1, D3)、CD146 (E1, E3)、核染色には DAPI を用いた。

(F). 陰性マーカー（造血幹細胞マーカー）CD45 による染色。核染色には DAPI を用いた。

縮尺: 200 μm (A-F)、50 μm (白枠の拡大パネル A-F)

間葉系幹細胞は、重要な性質として多分化能をもつ。そこで、ヒト培養歯根膜細胞の脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞への分化能を確認するために、各分化誘導培地にて

21 日間培養したところ、脂肪細胞への分化を示す Fatty acid binding protein (FABP4)、骨芽細胞への分化を示す Osteocalcin、軟骨細胞への分化を示す AggreCAN の発現が観察された (図 11A-C)。間葉系幹細胞であることを示すには、1) プラスチックへの接着性があること、2) 表面マーカータンパク質の CD73, CD90, CD105 陽性であり、CD14 または CD11b が陰性、CD19 または CD79 α が陰性、さらに CD34, CD45, HLA-D それぞれが陰性であること 3) 軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞に分化できることの3つが最低条件とされている (Dominici et al., 2006)。患者由来の歯根膜細胞において CD73, CD90, CD105 はそれぞれ発現が見られ、CD45 は発現していなかった (図 10A-F)。陰性マーカーの全てについては確認していないが、これらの結果から実験に使用した歯根膜由来の培養細胞は、歯根膜幹細胞あるいは歯根膜前駆細胞を含む細胞集団であることが示唆された。

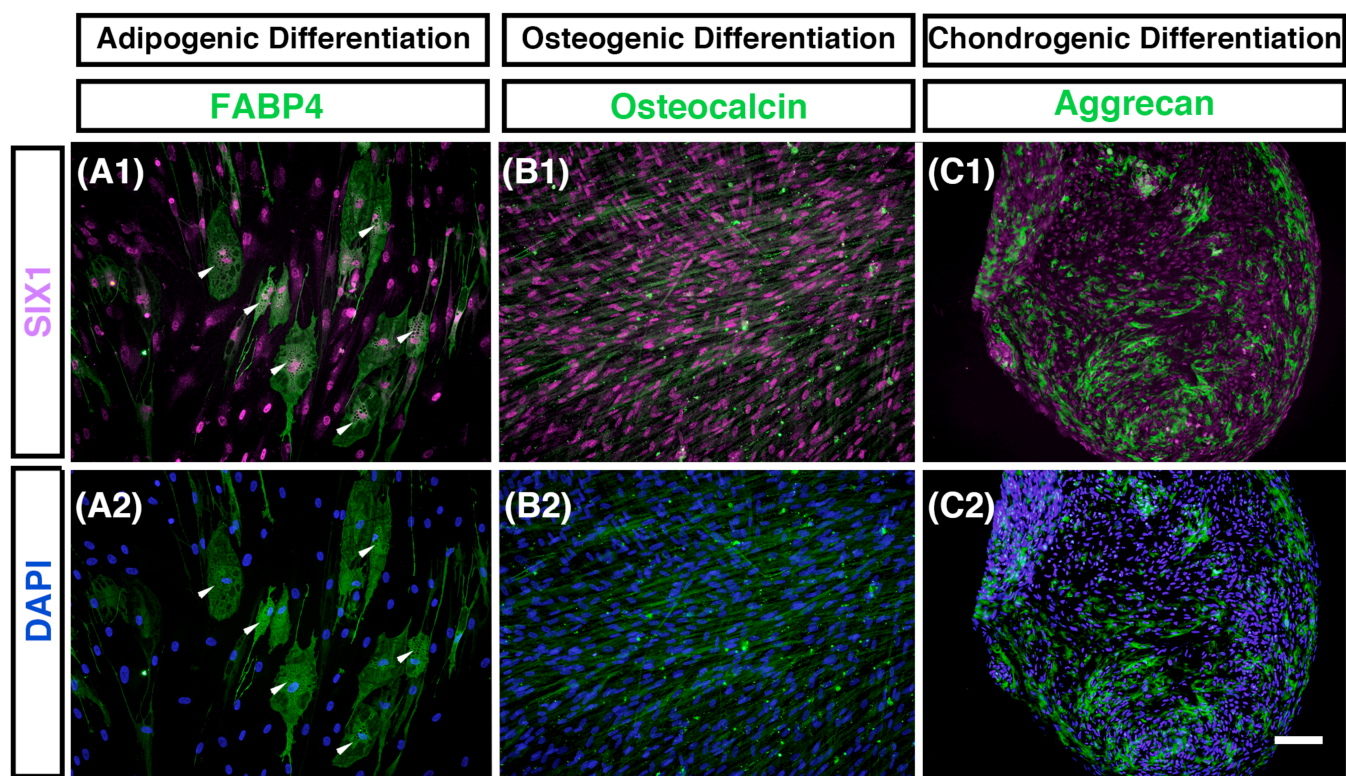


図 11. ヒト培養歯根膜細胞の分化誘導実験

(A). 成熟した脂肪細胞に存在することが知られる脂肪滴が、細胞内に観察される (矢

頭)。

(B). 分化誘導中も細胞が増殖を続けており、細胞が多層になっている。骨様組織や石灰化物の生成などの形態的变化は観察されない。

(C). ペレット状の細胞塊が丸みと光沢を帯びて、弾力を有する軟骨ペレットへと分化する。その内部には軟骨細胞が観察される。

縮尺: 200 μm (A-C)

3-5: siRNA を用いた *SIX1* の細胞増殖制御解析

Six1^{-/-}は野生型マウスに比べて、歯小囊での増殖性細胞数の割合が減少したこと(図 7I) から、ヒト培養歯根膜細胞の増殖についても *SIX1* が担うとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、siRNA を用いた *SIX1* ノックダウンにより、EdU で標識される増殖性細胞数の割合が減少するか否かを解析した。まず、siRNA 導入効率を評価するため、Alexa555 蛍光標識された RNA オリゴヌクレオチドを用いた。導入を行って 48 時間後、全細胞の 99%が蛍光標識されていることを確認し、(Alexa555: 230 個、DAPI: 232 個) 遺伝子導入効率が十分に高いことを確認した(図 12A, B, C)。ノックダウン効率を高めるために、異なる塩基配列を標的とする 2 種類の *SIX1* siRNA を同量混合して使用した。導入の方法は、細胞の播種と同時に遺伝子導入を行うリバーストランスフェクション法を用いた。

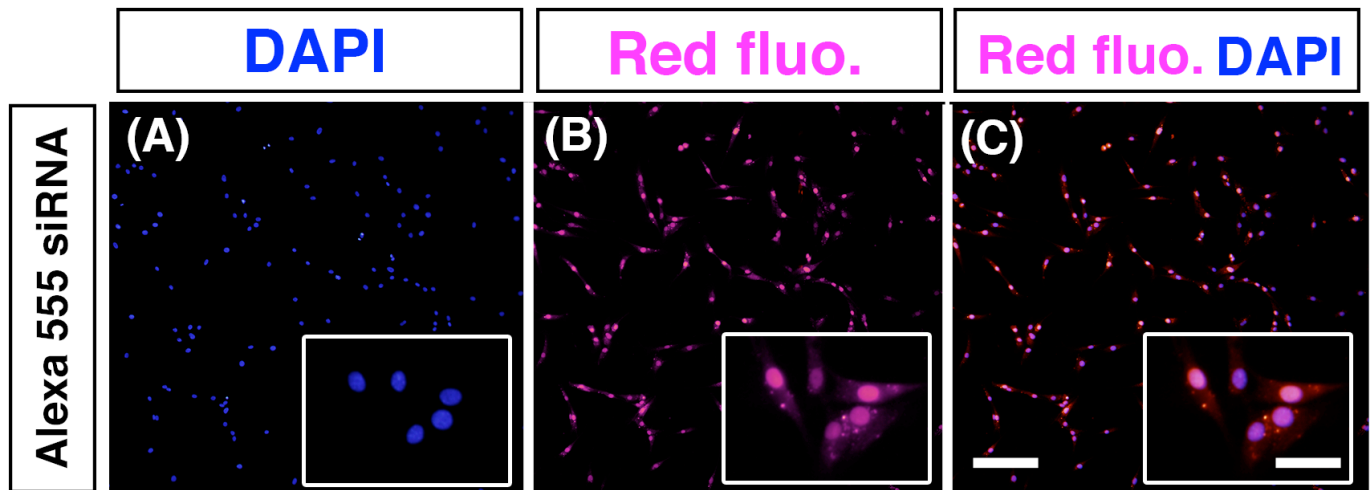


図 12. siRNA のヒト培養歯根膜細胞へ導入効率の評価

(A-C). P4 ヒト培養歯根膜細胞に対する siRNA 導入効率の評価。

(A). 核染色は DAPI で行った。

(B). 遺伝子導入された細胞は Alexa Fluor555 に標識された siRNA を取り込む。

(C). DAPI 染色で同定されたほぼすべての細胞に、siRNA の取り込みが認められる。

縮尺: 200 μm (A-C)、25 μm (パネル内の白枠 A-C)

SIX1 タンパク質の発現量を調べるために、siRNA 導入の 48 時間後のヒト培養歯根膜細胞から、タンパク質抽出液を調製し、それらをウエスタンブロッティング法によって解析した。一次抗体に SIX1 抗体を使用し解析したところ、siRNA の導入を行わないヒト培養歯根膜細胞のタンパク抽出液では 32kDa と 35kDa の 2 カ所の位置に SIX1 のバンドを検出した (図 13A)。SIX1 siRNA によるノックダウン効率を検定するために、検出される 2 本のバンドを定量し、平均値を negative control siRNA を導入した細胞と比較したところ、79%の減少を認めた (図 13B)。これらの結果より、遺伝子導入後 48 時間経過した時点での siRNA による SIX1 ノックダウン効率が、十分に高いことが確認できた。

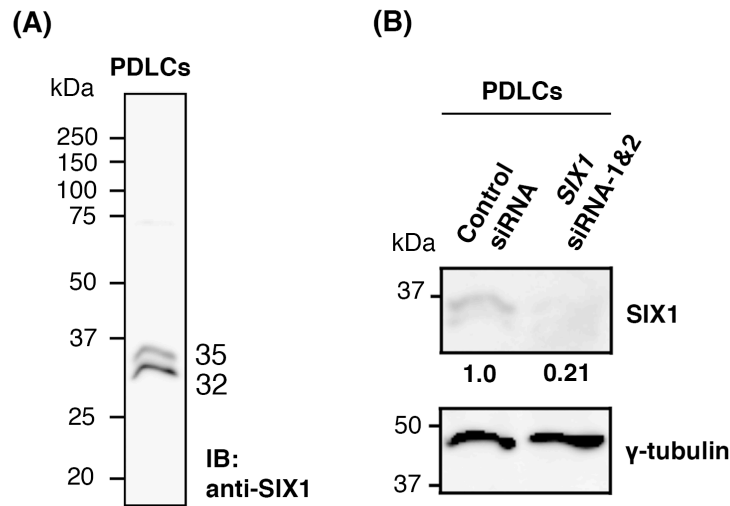


図 13. ウェスタンブロッティングによる、*SIX1* siRNA のノックダウン効率の確認

(A). *SIX1* 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析により、培養歯根膜細胞のタンパク質抽出液では、32 kDa と 35 kDa にバンドが検出された。

(B). 培養歯根膜細胞に *SIX1* siRNA と negative control siRNA 導入後、培養歯根膜細胞のタンパク質抽出液を調製し、ウェスタンブロッティング解析により、*SIX1* タンパク質の定量を行った。上のパネルの下部の数字はコントロールとの比較による相対値で、*SIX1* タンパク質の発現が約 79%減少したことを示す。下のパネルは γ -tubulin によるローディングコントロール。*SIX1* タンパク質発現量の相対値は γ -tubulin の発現量で補正した。

次に、negative control siRNA と *SIX1* siRNA を導入した細胞を用意し、EdU を固定の 2 時間前に添加することで、増殖性細胞を標識した (図 14)。negative control siRNA を導入した培養細胞における *SIX1* は、導入をしない通常の培養細胞と同様に核に局在していた (図 15A, B)。*SIX1* siRNA を導入した細胞では、核に *SIX1* の発現が見られるものの、その発現が低下していた (図 15E, F)。EdU で標識される増殖性細胞は control および *SIX1* siRNA を導入した細胞の両方で観察された (図 15C, D, G, H)。

ヒト培養歯根膜細胞

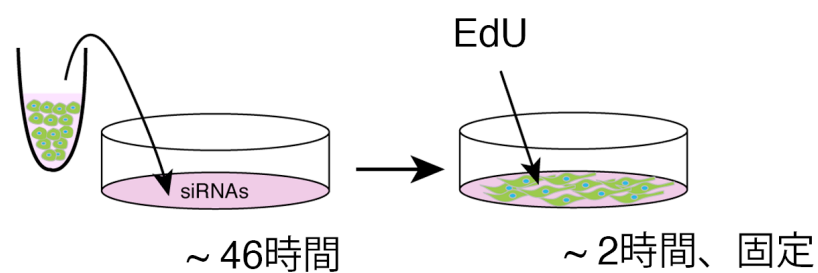


図 14. ヒト培養歯根膜細胞における siRNA 導入と EdU 標識の模式図

siRNA 導入は細胞播種と同時に行い（リバーストランスフェクション法）、48 時間後に固定した。固定の 2 時間前に培養培地に EdU を添加した。

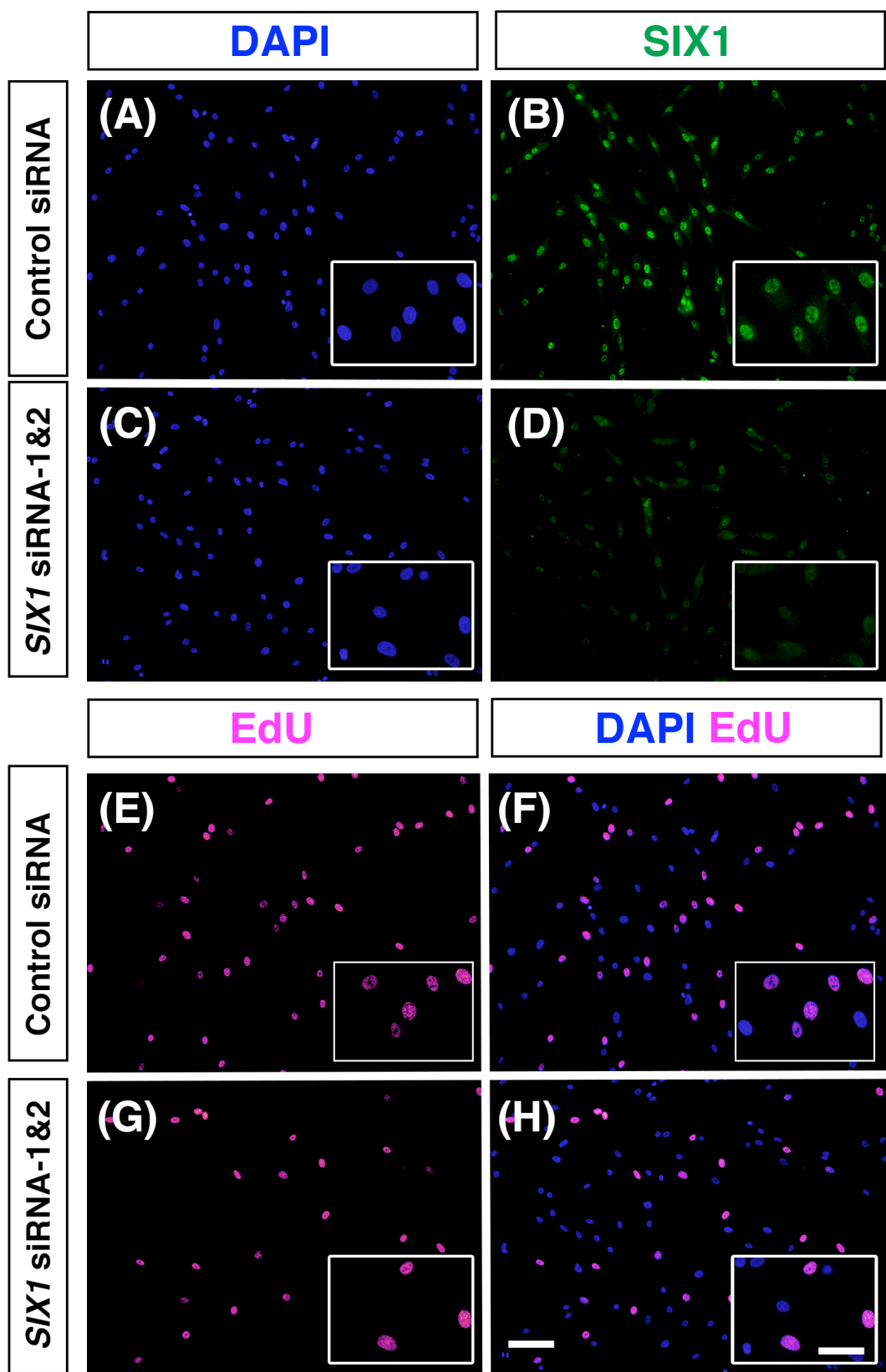


図 15. 歯根膜細胞 siRNA 導入後における、SIX1 の発現と EdU 標識増殖性細胞の解析

(A-H). siRNA 導入後の *SIX1* 発現と EdU の検出

(A, B, E, F). negative control siRNA

(C, D, G, H). *SIX1* siRNA

negative control と比較すると *SIX1* 発現レベルの低下 (B, D) および EdU 標識細胞数の低下 (E, G) を認めた。

縮尺: 100 μm (A-H)、25 μm (白枠の拡大パネル A-H)

次に、増殖性細胞数の比率を *SIX1* siRNA と negative control siRNA 導入 48 時間後で比較したところ、独立に採取した 3 つの細胞のそれぞれの比較において、*SIX1* siRNA を導入した細胞の増殖性細胞数の割合は統計的に有意な減少を認めた *SIX1* siRNA: $21.4 \pm 1.4\%$ (PDLCS-1), $15.4 \pm 0.5\%$ (PDLCS-2), $16.6 \pm 0.7\%$ (PDLCS-3)、negative control siRNA: $28.6 \pm 0.8\%$ (PDLCS-1), $23.1 \pm 0.5\%$ (PDLCS-2), $22.1 \pm 0.7\%$ (PDLCS-3) (図 16)。3 つの細胞を合わせた増殖性細胞数の割合の平均でも、negative control siRNA が $24.6 \pm 1.1\%$ であるのに対して *SIX1* siRNA は $17.8 \pm 1.0\%$ と統計的に有意な減少を認めた。その相対値は negative control siRNA : *SIX1* siRNA = 1 : 0.72 であり、28%の減少であった。これらの結果は、*Six1* がマウスの歯小囊での細胞増殖を担うのと同様に、*SIX1* がヒト培養歯根膜細胞においても細胞増殖を担うことを示唆している。

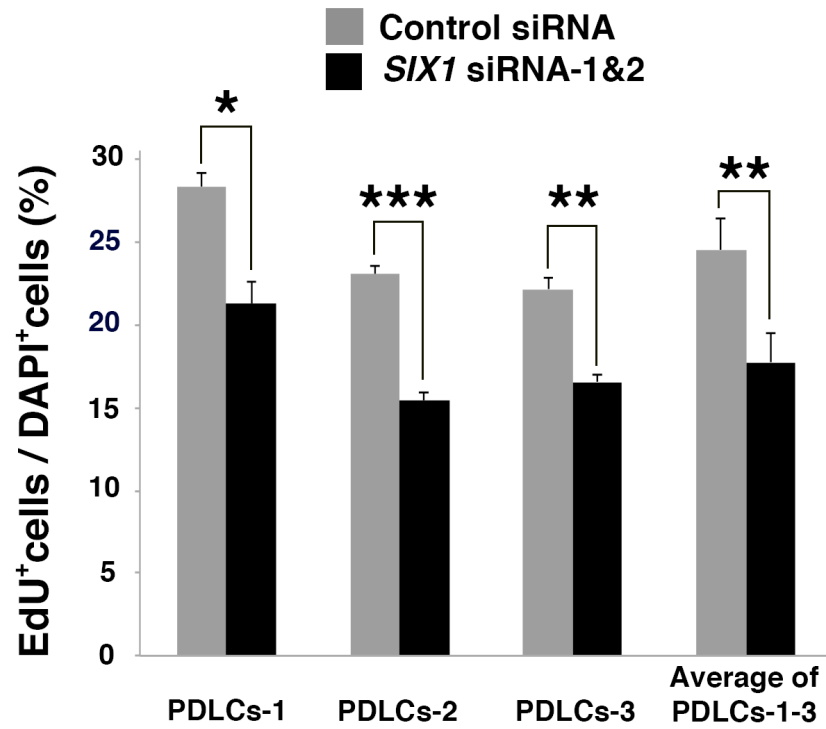


図 16. *SIX1* ノックダウンによる増殖性への影響

ヒト培養歯根膜幹細胞（PDLCs-1, 2, 3）の増殖性細胞数の割合を *SIX1* siRNA と negative control siRNA で比較した。（Student's *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ）