

氏 名	河 崎 立 樹
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 503 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 22 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 <i>SIX1</i> の役割についての研究
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 西 野 宏 (委 員) 教 授 小 坂 仁 准教授 富 永 薫 講 師 小笠原 徹

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

歯科領域には歯髄幹細胞、歯根膜幹細胞、乳歯髄幹細胞、歯小囊幹細胞および根尖部幹細胞などの豊富な幹細胞ソースがあるが、なかでも歯根膜幹細胞は歯周病で失われた歯周組織の再生材料として最も期待されている。歯根膜は歯槽骨と歯根を覆うセメント質の間に存在し、咬合圧の受容や緩衝を担う靱帯様組織である。歯根膜は、線維芽細胞に加え、セメント芽細胞、骨芽細胞、血管構成細胞、神経細胞、組織幹細胞など、多様な細胞により構成されている。歯根膜幹細胞は、線維芽細胞様形態と多分化能を持ち、間葉系幹細胞様の性質を示すことが報告されている。ホメオボックス転写制御因子 *Six1* は嗅上皮や内耳および味蕾などの感覚器の発生、腎臓原基の形成、骨格筋の発生など数多くの器官形成に必須の遺伝子であり、所属する研究室も含めて国内外で様々な研究がなされてきた。*Six1* はマウス歯根膜前駆細胞である歯小囊に発現するとの報告がある。そこで、本研究は *Six1* が歯根膜発生において重要な役割をはたすとの仮説をたて、これを検証することを目的とした。具体的には、歯根膜の増殖・分化における *Six1* および *SIX1* の役割の解明を目的とした。

### 2 研究方法

最初に、出生後 0 日齢 (PN0) マウスの歯小囊から 56 日齢 (PN56) マウス歯根膜までの経時的な *SIX1* 発現を、蛍光免疫染色法にて解析した。次に、*SIX1* 発現細胞と EdU で標識される増殖性細胞の関係を歯根の伸長が盛んで歯根膜の発達も盛んな PN14、歯根および歯根膜が完成した PN28 の歯根膜で、二重蛍光免疫染色法にて解析した。*Six1* の増殖への関与を明らかにするために、胎齢 18.5 日 (E18.5) の歯小囊の増殖性細胞数の割合を *Six1* 欠損ホモマウス (*Six1*<sup>-/-</sup>) と野生型マウス (WT) について、比較した。次に、自治医科大学附属病院歯科口腔外科外来患者より入手した抜去歯から、酵素法により歯根膜細胞を単離し、初代培養を行った。得られた培養細胞のなかに歯根膜幹細胞が含まれているか否かを検証するために、間葉系幹細胞マーカーによる蛍光免疫染色と、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化誘導実験を行った。そして、*SIX1* siRNA を用いた機能阻害と EdU を用いた増殖性細胞標識を組み合わせた実験により、ヒト培養歯根膜細胞の増殖における *SIX1* の役割を解析した。

### 3 研究成果

生後マウスの歯小囊および歯根膜において、PN0, PN7, PN14 では、歯小囊または歯根膜領域全体に SIX1 の豊富な発現が見られたが、PN28 以降では SIX1 発現細胞数と SIX1 発現強度の双方が減弱していた。セメント質に分化するセメント芽細胞には、SIX1 の発現が見られなかった。次に PN14 および PN28 マウス歯根膜における EdU により標識される増殖性細胞数を比較したところ、PN28 では、PN14 に比べて SIX1 発現細胞数と増殖性細胞数の減少が見られ、両者の相関が示唆された。SIX1 が細胞増殖を担うことを検証するために、*Six1*<sup>-/-</sup>と WT の E18.5 の歯小囊の細胞増殖を比較した。その結果、増殖性細胞数の割合は *Six1*<sup>-/-</sup>において WT に比べ 21%減少していた。このことからマウス歯小囊において *Six1*が細胞増殖を担うことが示された。

抜去歯より単離したヒト培養歯根膜細胞は、ほぼ全ての細胞が SIX1 を発現していた。また、間葉系幹細胞マーカーの CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 を発現していた。さらに、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への各分化誘導を行ったところ、骨芽細胞マーカーの Osteocalcin (OCN)、軟骨細胞マーカーの Aggrecan、脂肪細胞マーカーの FABP4 の発現が各々確認された。これらの観察から、単離した培養歯根膜細胞は多分化能を有することが明らかとなり、歯根膜幹細胞を含むことが示唆された。次に、ヒト培養歯根膜細胞においても、マウス歯小囊と同様に SIX1 が細胞増殖を担うのかを検証した。SIX1 siRNA を用いた機能阻害実験を行い、増殖性細胞の増減を解析したところ、SIX1 siRNA を導入した細胞はnegative control siRNA を導入した細胞に比べ、EdU で標識される増殖性細胞数の割合が 28%減少した。このことからヒト培養歯根膜細胞においても SIX1 が細胞増殖を担うことが示された。

### 4 考察

歯の発生初期において、口腔上皮と神経堤由来外胚葉性間葉との上皮間葉相互作用により、歯胚が形成される。その相互作用には SHH, BMP-4, FGF-8 などのシグナル分子が重要な働きをする。*Six1*は内耳の発生に必須であり、*Six1*<sup>-/-</sup>では内耳の前駆構造である耳胞のパターン形成に異常が生じ、*Bmp-4*の発現が消失することが知られている。一方 BMP-4 は歯の発生に重要なシグナル分子であることから、*Six1*が *Bmp-4* 発現を制御することで、歯の初期発生における上皮間葉相互作用に関与する可能性がある。

培養歯根膜細胞における SIX1 の発現が、元来の生体歯根膜における発現を引き継いだものか、初代培養する過程であらためて発現したものかについては、評価出来なかった。マウスでは器官の成熟とともに SIX1 の発現が低下することが報告されているため、ヒトも同様に、歯根膜の成熟にともない一旦は発現が低下するものの、単離培養されたことにより、活発に増殖することで、SIX1 が再発現したと考える。

*Six1/SIX1* は発生初期や培養細胞の増殖期に細胞増殖を制御する。その作用機序として、*Six1/SIX1* が、細胞増殖期における G1→S 期を促進する *cyclin D1* や *cyclin A1* に直接作用し、細胞増殖を促進すること、および *Six1*<sup>-/-</sup>の顎下腺では、*cyclin A1* の生成が阻害され、顎下腺の低形成が起こるとの報告もある。よって、歯根膜細胞も *Six1/SIX1* が *cyclin D1* や *cyclin A1* を介して細胞周期を進行させて、細胞増殖を促進する可能性が示唆される。

培養歯根膜細胞の骨分化誘導実験において、後期骨芽細胞マーカーの OCN の発現が見られたが、硬組織の生成にまでは至らなかった。そして骨分化誘導後も誘導前と同様に SIX1 の発現が見ら

れた。OCNは石灰化の抑制に働くとの報告があるため、*SIX1*がOCNの発現を維持することで、石灰化の抑制に働く可能性がある。これについては*SIX1*の機能阻害をした上で、分化誘導実験を行い、石灰化が起きるかどうかを解析する必要がある。

*Six1/Six4*欠損ホモマウスの器官形成の欠陥は*Six1*欠損ホモマウスおよび*Six4*欠損ホモマウスの欠陥よりも重篤であることから、*Six1*欠損ホモマウスにおいては*Six4*による機能相補が行われている可能性が高い。WTと*Six1*<sup>-/-</sup>のE18.5の歯胚には、形態や大きさの明らかな差異は認められなかった。胎仔期マウス歯胚には*Six2*, *Six4*, *Six5*の発現が確認されており、これらの遺伝子による機能相補が生じていることが考えられる。一方、培養歯根膜細胞では*SIX4*の発現が見られることから、*SIX4*による機能相補の可能性が考えられる。

## 5 結論

マウス生体内での*SIX1*発現パターン解析やヒト歯根膜培養細胞での機能阻害実験により、*Six1/SIX1*はマウス歯根膜前駆細胞およびヒト培養歯根膜細胞の増殖制御を担うことを示した。ヒト培養歯根膜細胞の培養操作の際に*SIX1*の強制発現や機能阻害を行うことで、細胞の増殖や分化を制御し得ることが示された。歯周組織再生のためのツールとして*SIX1*を標的とした方法を臨床に応用できる可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

河崎氏は歯科医師としての立場より再生医療の研究を行った。研究を始めた動機の記述から始まり、歯科領域の再生医療の現状がよく記載されている。日常臨床で採取が容易な歯根膜に存在する細胞に注目したことは、着眼点が良い。この歯根膜に存在する細胞は歯のみならず腱や靭帯などに分化する可能性がある細胞であり、今後の発展性が高い。このような機能を持つ幹細胞様細胞を同定し、その増殖と分化が*Six1*（マウス）及び*SIX1*（ヒト）遺伝子及び*SIX1*（タンパク）で制御されていることを組織蛍光免疫染色、培養細胞蛍光免疫染色、組織及び培養細胞のEdU標識法、siRNA導入法、ウェスタンブロット解析の手技を用いてin vitro及びin vivoで論理的に整然と証明した。本研究より*SIX1*は分化より増殖に深く関与する可能性が示されたが、再生医療等への応用を考えれば、後者の場合も医学的な意義は深いものと考えられた。

目的、手技、結果（写真を含む）、結果の解釈と考察などの記載もわかりやすく記載されている。学位論文に値する論文と全委員が認めた。

## 最終試験の結果の要旨

日本は高齢者社会を世界に先駆けてむかえつつある。高齢者において口腔悪性疾患および歯周病の頻度は高くなり、歯を支持する歯槽骨の障害をきたす頻度も高くなる。歯槽骨の障害の結果歯を失うことは、咀嚼障害をきたし、生活の質の著しい低下を招く。河崎氏は歯科医師の立場よりこの問題点に着目し、歯科医師として再生医療の研究を開始した。歯間膜に存在する幹細胞に注目し、転写制御因子*SIX1*が歯根膜幹細胞様細胞の分化および増殖において重要な役割を担っていることを論理的に整然と証明した。本研究より*SIX1*は分化より増殖に深く関与する可能性が示されたが、再生医療等への応用を考えれば、後者の場合も医学的な意義は深いものと考えられた。

研究内容をわかりやすく説明し、今回の研究で得られた結果の解釈と今後の課題について適切に説明ができた。質疑に対する応答の態度も良く、当該分野の知識も深い印象を受けた。今回の発表を通じ、委員より将来の発展につながる多くの指摘事項が出たことは、本研究成果の重要性を示すものとする。本研究内容及び研究者としての真摯な態度を考え、学位取得に値すると全委員が認めた。