

# 博士学位論文

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

### 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名 野々山 駿  
博士の専攻分野 博士(歯学)  
学位記番号 甲第516号  
学位授与年月日 令和4年3月14日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科  
(博士課程) 歯学専攻  
学位論文題目 Development and Characterization of Alkaline Phosphatase-Positive Human Umbilical Cord Perivascular Cells  
(高アルカリホスファターゼ活性を有するヒト臍帯血管周囲細胞の開発と特性評価)  
Cells 2021, 10(11), 3011; doi: 10.3390/cells10113011  
論文審査委員 主査 教授 奥村 敏  
副査 教授 二藤 彰 副査 教授 五味 一博

### 内容の要旨

#### 【緒言】

ヒト臍帯血管周囲細胞(HUCPVC)は、医療廃棄物である臍帯から採取されるため倫理的制約がないことや、収穫した時のコロニー形成ユニット線維芽細胞が骨髄由来の未分化間葉系幹細胞(MSC)より遥かに高いことから再生医療のためのMSCの代替細胞として注目されている。本研究は、未分化胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、骨芽細胞や象牙芽細胞などの硬組織形成細胞にアルカリホスファターゼ(ALP)が高発現していることに注目し、ALP陽性HUCPVC(ALP(+)-HUCPVC)を作成して、その特性を評価した。

#### 【材料と方法】

HUCPVCに活性型ビタミンD3(VD)、トランスフォーミング成長因子ベータ1(TGF- $\beta$ 1)、骨形成タンパク質2(BMP2)、BMPシグナル伝達阻害剤であるLDN-193189(LDN)、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤であるSB431542(SB)を様々な組み合わせで添加し培養7日目にALP活性測定を行ってALP(+)-HUCPVCに誘導するための至適条件を決定した。至適条件下でHUCPVCを培養し、ALP染色、定量PCR(qPCR)によるALP遺伝子発現の測定、エラスチンとフィブリリン1抗体を用いた免疫染色を行って、ALP(+)-HUCPVCが作成出来ていることを確認した。次いで、MTS AssayによるALP(+)-HUCPVCの増殖能の測定、各種細胞分化マーカーに対するqPCR測定、ローダミンファロイジン染色を用いたアクチン染色、オステオポンチン(OPN)および $\alpha$ -平滑筋アクチン( $\alpha$ -SMA)抗体を用いた蛍光免疫染色によってALP(+)-HUCPVCの特性を明らかにした。ALP(+)-HUCPVCの石灰化誘導能については、石灰化培地中で形成した沈着物をAlizarin red S染色によって観察した。さらにHUCPVC、ALP(+)-HUCPVCとブタ歯髄由来不死化細胞株(PPU7)を用いて、それぞれの基質小胞を分画して、小胞内のALP活性とCa量の測定、リン酸トランスポーターであるPiT1をタンパク質と遺伝子レベルで比較した。また、PPU7とHUCPVCの培養上清から20%および50%になるように調製されたconditioned medium(CM-PPU7とCM-HUCPVC)をそれぞれ石灰化誘導培地上のPPU7に添加し、培養7日後の石灰化物をAlizarin red S染色、ALP活性およびCa量の測定を行って比較した。

#### 【結果】

HUCPVCはVDとLDNの組み合わせおよびVDとLDNとTGF- $\beta$ 1の組み合わせにおいて培養3日目にALP活性の増加傾向を示し、7日目においてVDとLDNとTGF- $\beta$ 1の組み合わせはALP活性が大きく上昇した。この結果からVD存

在下で培養された HUCPVC に焦点を絞り VD のみ添加されたものを V-HUCPVC, VD と LDN の組み合わせで添加されたものを VL-HUCPVC, VD と LDN と TGF- $\beta$ 1 が添加されたものを ALP(+)-HUCPVC とした。

ALP(+)-HUCPVC は qPCR 分析において ALP 遺伝子の発現上昇が確認され, ALP 染色においても活性が確認された。またエラスチンとフィブリリン 1 抗体を用いた蛍光免疫染色では, V-HUCPVC, VL-HUCPVC, ALP(+)-HUCPVC 共に線維芽細胞様形態を有し, いずれの群においても細胞形態の変化は見られなかった。細胞増殖能の測定においては, ALP(+)-HUCPVC だけが細胞増殖の著しい抑制が見られた。次に, qPCR 分析で ALP(+)-HUCPVC の分化の方向性を調べた結果, 骨組織および筋線維芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現は上昇したが, 歯根膜細胞および筋芽細胞の分化マーカー遺伝子は発現が低下した。さらに ALP(+)-HUCPVC の特性を明らかにするためにローダミンファロイジンをを用いたアクチン染色と OPN および  $\alpha$ -SMA 抗体を用いた免疫染色を行った結果, VL-HUCPVC と ALP(+)-HUCPVC でアクチンフィラメントの増加が見られ, ALP(+)-HUCPVC ではさらに OPN および  $\alpha$ -SMA 抗体陽性の紡錘状の細胞形態が観察された。

ALP(+)-HUCPVC の石灰化誘導能実験では, PPU7 と比較していずれの群においても石灰化を引き起こすことはなかった。また, CM-PPU7 と CM-HUCPVC を用いて PPU7 から形成された石灰化物の観察を行った結果, CM-HUCPVC で培養した PPU7 では石灰化誘導が抑制される結果となった。この原因を調べた結果, ALP(+)-HUCPVC と PPU7 の基質小胞中の PiT1 の遺伝子発現とタンパク質量が ALP(+)-HUCPVC では PPU7 に比べて有意に低かった。

### 【考 察】

HUCPVC から高 ALP 活性を有する ALP(+)-HUCPVC となるためには, 活性型ビタミン D3, LDN そして TGF- $\beta$ 1 が必要であることが明らかとなった。また HUCPVC は線維芽細胞様の細胞形態を示しており ALP(+)-HUCPVC においても形態学的には類似していた。しかしながら, ALP 活性の上昇, 細胞増殖能の抑制, および qPCR の結果を踏まえると ALP(+)-HUCPVC は HUCPVC と形態は類似しているが異なる性質をもった細胞に分化している可能性が示唆された。さらに ALP(+)-HUCPVC は Col I, OPN, CD73, CD90 および  $\alpha$ -SMA の遺伝子発現が上昇していたこと, 免疫染色において OPN および  $\alpha$ -SMA の存在が確認されたことより筋線維芽細胞への分化の可能性が示唆された。また, HUCPVC に比べて ALP(+)-HUCPVC は基質小胞内に豊富な ALP 活性と Ca 量を含んでいたにも関わらず石灰化を引き起こすことがなかった。この理由として PiT1 によるリン酸イオンの基質小胞への取り込みが制限されている可能性が示唆された。さらに, CM-HUCPVC で培養した PPU7 では石灰化が抑制されたことから, HUCPVC には石灰化誘導を阻害する物質を分泌している可能性も示唆された。この物質の同定は, 口腔内における硬組織疾患だけではなく, 全身の異所性石灰化の原因を解明するのに役立つ可能性がある。

本研究により作成した ALP(+)-HUCPVC は結合組織治癒や線維症の研究や治療に役立つ可能性があり, 歯科領域においては, 歯周外科手術後にみられる歯肉退縮が元の位置に戻るクリーピングアタッチメントは歯肉組織中の筋線維芽細胞が主役となっているため, 歯肉退縮の治療に有用である可能性が示唆された。

### 【結 論】

HUCPVC から作成した筋線維芽細胞様 ALP(+)-HUCPVC は結合組織治癒, 線維症の治療, および異所性石灰化の原因を解明するための研究ツールとして有用である。

### 審査の結果の要旨

野々山駿氏は, 未分化胚性幹細胞や人工多能性幹細胞にアルカリフォスファターゼ (ALP) が高発現していることに着目し, ヒト臍帯血管周囲細胞 (HUCPVCs) に ALP が高発現する細胞 (ALP(+)-HUCPVCs) を作成して, ALP(+)-HUCPVCs は筋線維芽細胞に近似した細胞に分化することを以下に示す実験結果より明らかにした。

1) 活性型ビタミン D3 (VD), トランスフォーミング成長因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), 骨形成タンパク質シグナル伝達阻害剤である LDN-193189 を添加した培地 ( $\alpha$ MEM) で7日間培養を行うと ALP 活性とタンパク発現が顕著に増加した (この細胞を ALP(+)-HUCPVCs とよぶ)。

2) q-PCR より ALP(+)-HUCPVCs では筋線維芽細胞のマーカーである CD90,  $\alpha$ -smooth muscle actin の mRNA 発現量が, コントロール群に比較して約 2 倍有意に増加した。

3) 蛍光免疫染色を行い, ALP(+)-HUCPVCs では弾性線維 (エラスチン, フィブリリン 1) が発現していた。

4) ローダミン・ファロイジン染色を行い, ALP(+)-HUCPVCs 内のアクチンの発現がコントロール群に比較して顕著に増加した。

## 博士學位論文

5) 石灰化培地で培養した HUCPVCs のアリザリン染色の結果, ALP(+)-HUCPVCs では石灰化は誘導されないことを確認した.

6) ALP(+)-HUCPVCs で石灰化が誘導されないメカニズムの1つとしてリン酸トランスポーターである Pit1 の発現量がコントロール群に比較して減少していることを明らかにした.

本研究は, HUCPVCs は各種臓器の線維化のメカニズムの解明に役立つ可能性が期待される研究である. よって, 本論文は博士(歯学)の学位論文として十分な価値を有するものと判断した.