

## Studies on Stem Cells from Human Apical Papilla-Based Root Dentin Formation

田中, 陽介

<https://doi.org/10.15017/2534397>

---

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (歯学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

ヒト根尖乳頭組織由来幹細胞を応用した  
歯根象牙質形成に関する研究  
Studies on Stem Cells from Human Apical Papilla-  
Based Root Dentin Formation

2019年9月

田中 陽介

九州大学大学院歯学府

口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野

九州大学大学院歯学研究院  
口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野

指導教員 教授 久木田 敏夫 先生

九州大学大学院歯学研究院  
口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野

研究指導者 准教授 山座 孝義 先生

本研究の一部は下記の論文にて報告した。

Tanaka, Y., Sonoda, S., Yamaza, H., Murata, S., Nishida, K., Hama, S., Kyumoto-Nakamura, Y., Uehara, N., Nonaka, K., Kukita, T., Yamaza T. Suppression of AKT-mTOR signal pathway enhances osteogenic/dentinogenic capacity of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Research & Therapy* 9, 334. (2018)

Tanaka, Y., Sonoda, S., Yamaza, H., Murata, S., Nishida, K., Kyumoto-Nakamura, Y., Uehara, N., Nonaka, K., Kukita, T., Yamaza T. Acetylsalicylic acid treatment and suppressive regulation of AKT accelerate odontogenic differentiation of stem cells from apical papilla. *Journal of Endodontics In press.*

本研究の一部は、下記学術大会にて報告した。

“Effect of aspirin on dentinogenesis of stem cells from apical papilla.” The 58th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology. Sapporo. 2016. 8.

また、以下の研究に参画した。

Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells., Sonoda, S., Yamaza, H., Ma, L., Tanaka, Y., Tomoda, E., Aijima, R., Nonaka, K., Kukita, T., Shi, S., Nishimura, F., Yamaza, T., *Scientific reports*, 6: 19286, 2016

Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates secondary osteoporosis through interleukin-17-impaired functions of recipient bone marrow mesenchymal stem cells in MRL/lpr mice., Ma, L., Aijima, R., Hoshino, Y., Yamaza, H., Tomoda, E., Tanaka, Y., Sonoda, S., Song, G., Zhao, W., Nonaka, K., Shi, S., Yamaza, T., *Stem cell research & therapy*, 6: 104, 2015

## 目 次

§ 1. 要旨	1
§ 2. 緒言	5
§ 3. 研究 I:	11
3-1. 目的	12
3-2. 材料と方法	14
3-3. 結果	36
3-4. 小括	69
§ 4. 研究 II:	71
4-1. 目的	72
4-2. 材料と方法	74
4-3. 結果	80
4-4. 小括	104
§ 5. 考察	105
§ 6. 総括	116
§ 7. 謝辞	119
§ 8. 引用文献	120
付. 略語集	132

## §1. 要旨

根尖乳頭組織由来の幹細胞 stem cells from human apical papilla (SCAP) は、歯根形成中のヒト永久歯の歯根端に存在する根尖乳頭組織から単離・同定された間葉系幹細胞 mesenchymal stem cells (MSCs) の亜集団である。SCAP は、象牙芽細胞へ分化し、象牙質を形成する能力を備えている。そのため歯根再生の有望な細胞ソースと考えられている。しかしながら、SCAP の象牙芽細胞分化の詳細な分子メカニズムについては殆ど解明されていない。

研究 I では、SCAP の象牙芽細胞分化における分子メカニズムの解明、ならびに歯根再生を見据えた SCAP を用いたスキャフォールドを使用しない (scaffold-free) 立体石灰化構造体の作製に挑戦した。phosphoinositide 3-kinase (PI3K) - AKT - mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル経路が MSCs の細胞分化調節に関与していることに着目し、SCAP の象牙芽細胞分化における PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の役割を検討した。AKT に対する small interface RNA (AKT-siRNA)、PI3K 阻害剤 LY294002、および mTOR 阻害剤 rapamycin を用いて前処

理し、SCAP を象牙芽細胞分化条件下で培養し、*in vitro* での石灰化組織形成について評価するとともに、AKT-siRNA、LY294002、rapamycin で前処理した未分化 SCAP を hydroxyapatite/tri-calcium phosphate (HA/TCP) キャリアーとともに免疫不全マウスの皮下に移植し、*in vivo* 石灰化組織形成についても検討を加えた。さらに、SCAP 単体のスフェロイドを作製し、LY294002 および rapamycin で前処理し、象牙芽細胞分化条件下で培養し、その立体構造体の石灰化を解析した。

AKT-siRNA、LY294002、および rapamycin による前処理は、SCAP の *in vitro* および *in vivo* での石灰化組織形成を促進した。scaffold-free SCAP スフェロイドを LY294002 および rapamycin で前処理した場合、scaffold-free 石灰化構造体の石灰化密度が著しく向上した。これら SCAP をベースとした scaffold-free 石灰化構造体を顎骨の骨欠損部に移植すると、その欠損部に骨再生が誘導された。以上の所見より、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路が、SCAP の象牙芽細胞への分化過程において負の調節シグナルとして作用していることを示唆するとともに、この経路を予め抑制することで、SCAP による象牙質形成を促進させることができることが解明された。さらに、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路を抑制することにより、SCAP をベースとした scaffold-free の高密度石灰化構造体の開発に成功した。ま

たこの SCAP ベースの scaffold-free 石灰化構造体は、象牙質・骨の再生における有望な医療材料となりうることが示唆された。

研究 II では、SCAP へのアセチルサリチル酸 acetylsalicylic acid (ASA) の応用について検討した。ASA は様々な MSCs の分化や機能の促進に関与している。そこで、ASA 処理による SCAP の *in vitro* および *in vivo* での象牙芽細胞分化への影響を検討した。SCAP を、ASA を添加した象牙芽細胞分化条件下で培養した。更に ASA 処理未分化 SCAP を HA/TCP キャリアーとともに免疫不全マウスに皮下移植した。ASA 処理は、象牙芽細胞分化条件下で培養した SCAP の runt-related transcription factor 2 (RUNX2) の発現を下降させ、SP7 transcription factor (SP7)、nuclear factor 1C (NF1C)、および dentin sialophosphoprotein (DSPP) の発現を上昇させた。加えて、SCAP の *in vitro* および *in vivo* での象牙芽細胞分化を促進した。一方、ASA 処理は SCAP の象牙芽細胞分化過程における AKT のリン酸化を促進させた。興味深いことに、LY294002 および AKT-siRNA での前処理が、ASA によって促進誘導された *in vitro* および *in vivo* での SCAP の象牙芽細胞分化をさらに促進させたとともに、ASA によって誘導された SCAP の

RUNX2 の発現抑制ならびに SP7、NFIC および DSPP の発現促進をさらに増強させた。以上の所見は、ASA 処理が SCAP の象牙芽細胞の分化を有意に促進することを明らかにした。また、ASA 処理と PI3K-AKT シグナル経路の抑制制御を組み合わせることにより、SCAP を用いた歯根象牙質再生のための新たなアプローチが可能であることが示唆された。

以上の研究成果より、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路が SCAP の象牙芽細胞分化過程において重要な制御を行っていることを解明した。また、SCAP ベースの scaffold-free 石灰化構造体の開発に成功した。更に、ASA ならびに PI3K-AKT シグナル経路の抑制制御を応用することで、SCAP の象牙芽細胞分化を促進し、SCAP による石灰化組織形成を顕著に増大させることが可能となった。今後、これら研究成果により、SCAP を用いた象牙質および骨の再生医療への応用が期待される。



## §2. 緒言

埋伏第3大臼歯のような、歯根未完成歯のヒト永久歯の歯根端には、根尖乳頭組織が存在している。この根尖乳頭組織より単離された組織幹細胞は **SCAP** と名付けられた [引用文献 1, 2]。SCAP は、自己複製能と、象牙芽細胞、脂肪細胞、神経細胞などへの分化能、すなわち多分化能を有する、成体組織に由来する MSCs の亜集団として同定されている [1]。また SCAP は、免疫不全マウスの皮下に HA/TCP キャリアーとともに移植すると、象牙質/歯髄複合体を新生することができる [1]。歯根形状にした HA/TCP に SCAP を充填し、歯根膜幹細胞と共にブタ顎骨に移植すると、歯根膜を伴う歯根が形成され、歯冠補綴処置によりその移植体が歯根として機能することが明らかとなっている [1]。従って、SCAP が歯根形成幹細胞として重要な役割を有し、歯根象牙質再生の有望なソースであることを示唆している [1, 3]。

頭蓋神経堤細胞 cranial neural crest cells (CNCCs) が、歯根象牙質ならびにセメント質、歯根膜、および固有歯槽骨を含む歯周組織の発生と形成に非常に重要

な役割を果たしている。しかしながら、CNCCs を出生後の成体組織から単離することは非常に困難である。形成途中の歯根端に存在する根尖乳頭組織は、その発生学的見地より CNCCs を含むことは明らか故、その組織より単離し、象牙質形成能力を有する幹細胞である SCAP は、成体組織から単離できる CNCCs 由来の細胞であると考えられる [1, 2]。しかし、現在、SCAP の象牙芽細胞分化に関与する分子メカニズムについてその詳細の多くが解明されておらず、不明のままである。実際、SCAP は CNCCs に類似した細胞学的特徴を示すことが報告されている [4]。歯根形成のための CNCCs の機能的統合は、p38、extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) および PI3K-AKT などの transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) /TGF  $\beta$  receptors (TBRs) 下流の非古典的シグナル経路により、厳密に制御されている [5]。この TGF  $\beta$ /TBRs 下流の非古典的シグナル経路の 1 つである AKT は、PI3K 依存性セリン/スレオニンキナーゼとして機能し、mTOR の活性化を誘導する [6]。種々の細胞において、PI3K、AKT および mTOR が細胞代謝および細胞分化の制御に非常に重要な役割を果たすことが知られている [7]。例えば、ヒト脱落乳歯幹細胞 stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) では、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路が幹細胞の性質である

stemness を維持し [8]、象牙芽細胞ならびに骨芽細胞への分化能力を制御している [9,10]。従って、CNCCs に由来する SCAP の性質を考慮すると [4]、TGF  $\beta$ /TBRs に関連する下流シグナル経路が、SCAP の stemness の維持および象牙質形成能力の制御に関与することが考えられている [2]。TGF  $\beta$ /TBRs 下流非古典的シグナル経路はまた、歯髄幹細胞 dental pulp stem cells (DPSCs) および SHED を含む歯髄組織由来幹細胞の維持および象牙質形成過程に関与すると報告されている [9,11,12]。実際、epiregulin の刺激下において、SCAP の細胞増殖が p38、ERK1/2 および AKT を含む非古典的シグナル経路により調節されている [13]。しかしながら、SCAP の象牙芽細胞分化における PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の関与については未だ報告されていない。

骨移植は、顎骨欠損に対する標準治療である [14]。しかし、骨移植は、その侵襲的な外科的採取とドナー不足による理由で、全ての顎骨欠損の患者が治療的ベネフィットを受け取るには至っていない [15,16]。ヒドロキシアパタイトや  $\beta$ -リン酸三カルシウムなどの生体材料を用いた骨欠損の治療が臨床で行われている。最近、DPSCs と生体吸収性材料またはアパタイトが一体となった移植

材料が骨再生治療のために開発された [17,18]。しかし、生体材料が生体内で分解される過程における細菌感染や免疫反応が、治療効果を減じさせるということが重大な要因として捉えられている [19,20]。本来、生体材料は異物であるということに加え、これらの移植後の問題を解決するために、スキャフォールドを使用しない (scaffold-free) 様々な三次元 (3D) 細胞培養システムが現在積極的に開発されている [21-23]。その中でも scaffold-free 3D 培養の一つである細胞凝集塊 (スフェロイド) の応用は、骨再生の有望なツールと考えられている [24-26]。しかし、SCAP を用いた scaffold-free スフェロイドは開発されておらず、ましてやその石灰化構造体としての性質や再生医療への応用の可能性については全く研究されていない。

ASA は最も広く使用されている非ステロイド性抗炎症薬の 1 つであり、シクロオキシゲナーゼ活性を阻害し、およびプロスタグランジンの生合成を抑制する [27]。最近、組織工学および細胞治療において、MSCs に対する ASA の効果が示されている [28]。骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスや自然治癒不全の骨欠損モデルマウスにおいて、ASA は骨髄 MSCs bone marrow MSCs (BMMSCs)

による骨再生能力を促進する [29, 30]。キャリアーとして HA/TCP を用いた免疫不全マウスの皮下移植モデルにおいて、*ex vivo* にて ASA 処理を施した SHED および DPSCs は、*in vivo* での象牙質形成が有意に増加した [31, 32]。これは、ASA 処理が、SHED および DPSCs におけるテロメラーゼ逆転写酵素 telomerase reverse transcriptase (TERT) および Wnt シグナル経路を促進することによって、象牙芽細胞への分化能力が上昇する事に作用していた。さらに、ASA は歯根膜幹細胞 periodontal ligament stem cells (PDLSCs) における分化および再生能に関連する成長因子関連遺伝子の発現を促進し、セメント質形成能力を高めることも報告されている [33, 34]。また、最近の研究にて、ASA が SHED の免疫調節機能を促進し、自己免疫疾患への細胞治療効果を高めることも示された [31]。SCAP を用いた歯根象牙質の再生において、その象牙芽細胞への分化能力を向上させ、象牙質形成を促進させるための有効な条件を検討することは非常に重要である。DPSCs および SHED での ASA による象牙質再生能力を考慮すると [35-38]、ASA は SCAP の象牙質形成における再生能力促進に適したツールである可能性がある。しかしこれまでの研究では、ASA が SCAP の象牙芽細胞分化な

らびに象牙質形成に及ぼす効果と、その分子メカニズムについて報告されていない。

そこで本研究の研究 I では、AKT に対する AKT-siRNA、PI3K および mTOR に対する特異的阻害剤である LY204002 および rapamycin を用いて、SCAP の象牙芽細胞分化における PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の役割を理解することを目的とした。さらに、SCAP を用いて、scaffold-free 石灰化構造物を作製すること、および PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の抑制下で SCAP ベースの scaffold-free 石灰化構造物の石灰化度を解析すること、さらに、その石灰化構造体の骨再生医療への応用を検討することを目的とした。研究 II では、ASA が SCAP の象牙芽細胞分化ならびに象牙質形成に及ぼす効果について検討し、その分化過程における TGF  $\beta$ /TBRs 下流の非古典的なシグナル経路である p38、ERK1/2 および PI3K-AKT シグナル経路に着目し、ASA が SCAP の象牙芽細胞分化に影響を及ぼすシグナル経路について明らかにすることを目的とした。さらにそのシグナル経路を利用した SCAP による象牙質形成の増生にチャレンジした。

### §3. 研究 I

AKT-mTOR シグナル経路の抑制が根尖乳頭組織由来の幹細胞の象牙質・骨再生能を増強する

Suppression of AKT-mTOR signal pathway  
enhances osteogenic/dentinogenic capacity of stem  
cells from apical papilla

### §3-1. 目的

最近の研究により、SCAP が歯根形成幹細胞としての重要な役割を有し、歯根象牙質再生の有望なソースであることが考えられている [1, 3]。しかしながら、SCAP の象牙芽細胞分化に関与する分子メカニズムについて詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

現在、組織再生を目的とした生体材料移植における細菌感染や免疫反応の問題を解決するために、scaffold-free での様々な三次元細胞培養システムが開発されている [21-23]。しかし、SCAP を用いた scaffold-free スフェロイドの作製ならびにその三次元石灰化構造体の開発は行われていない。

研究 I での目的は、SCAP の象牙芽細胞分化に関与する分子メカニズムを解明すること、そして、SCAP を用いた scaffold-free での三次元石灰化構造体を作製し、その性質を解析することである。具体的には、SCAP の象牙芽細胞分化に関与すると考えられる PI3K-AKT-mTOR シグナル経路を阻害し、SCAP の象牙芽細胞分化についての PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の関与を検討した。さらに、



SCAP を用いた scaffold-free スフェロイド作製条件を検討し、三次元石灰化構造体を開発した。また、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の抑制下でそれらの石灰化を解析し、より高密度の scaffold-free 三次元石灰化構造体の開発にチャレンジした。さらに、SCAP ベースの scaffold-free 三次元石灰化構造体の再生医療における有用性を検討する目的で、マウス顎骨における骨欠損モデルで、この SCAP ベースの scaffold-free 三次元石灰化構造体を移植し、骨欠損部での骨再生力を検討した。

## §3-2. 材料と方法

### 3-2-1. ヒト永久歯サンプル

ヒト永久歯サンプル（埋伏下顎第三大臼歯）は、九州大学病院小児歯科において、健康なドナー（20～23 歳）から抜歯されたサンプルを用いた。ヒトサンプルの取り扱いは、九州大学ヒトゲノム/遺伝子研究機関審査委員会（プロトコル番号：393-01）の承認を得た。また、サンプルの供与を受ける前に、ドナーに十分説明し、同意を得たのち、書面によるインフォームドコンセントを得た。

### 3-2-2. マウス

BALB/cAJcl-nu/nu マウス（雄性、8 週齢）、C57BL/6 マウス（雄性、4 週齢）は日本 SLC（日本、静岡）から購入し、九州大学動物実験委員会にて承認された動物実験プロトコール（承認番号：A21-044-1）に従って実験に供した。

### 3-2-3. SCAP の単離と培養

SCAP の単離および培養は、以前の研究 [1] に従った。まず、歯根が未完成のヒト下顎第三大臼歯の根端より根尖乳頭組織を採取し、細かく刻んだ。その細

断した組織を 37°C、60 分間酵素処理を行った。酵素処理液として、滅菌  $\text{Ca}^{2+}$ -free &  $\text{Mg}^{2+}$ -free phosphate buffered saline (PBS、pH 7.2) を溶媒とし、0.3% collagenase type I (Worthington Biochemicals、Lakewood、NJ) および 0.4% dispase II (Sanko Junyaku、Tokyo、Japan) の混合溶液を用いた。その後、その酵素処理液を 70  $\mu\text{m}$  cell strainer に通し、single cell suspension を得た。T-75 培養フラスコまたは 100 mm 当り有核細胞を  $0.1 \times 10^6$  個播種し、colony forming unit-fibroblasts (CFU-F) 法 [Friedenstein、1974] に従って細胞を単離培養した。播種の 3 時間後、フラスコ (またはディッシュ) を滅菌 PBS で洗浄し、浮遊細胞を除去した。その後、プラスチック製培養フラスコ (またはディッシュ) 上に付着した細胞を増殖培地中で培養した。増殖用培地は、Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification ( $\alpha\text{MEM}$ 、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) の基礎培地に、15% fetal bovine serum (FBS、Equitech-Bio、Kerrville、TX)、100  $\mu\text{M}$  L-ascorbic acid 2-phosphate (Wako Junyaku、Osaka、Japan)、2 mM L-glutamine (Nacalai Tesque、Kyoto、Japan) およびプレミックス抗生物質 (100 U/mL penicillin/100  $\mu\text{g}$ /mL streptomycin; Nacalai Tesque) を混合したものを使用した。細胞播種の 14 日~16 日後、顕微鏡下で付着した細胞コロニーが確認され、コロニー形成細胞を継代培養した。増殖

培地は週 2 回交換した。継代数 3 (P3) の培養細胞を用いて、以前の報告 [1,39] に従って MSCs および SCAP としての細胞特性を解析した。また、この P3 細胞を研究 I の実験に供した。

#### 3-2-4. CFU-F 解析

上記酵素処理にて永久歯の根尖乳頭組織から得た細胞を 100 mm ディッシュ当たり  $0.1 \times 10^6$  個播種し、16 日間培養した。付着したコロニーを 2% paraformaldehyde と 2% toluidine blue を含む PBS (PH7.2) を用いて室温で一晩処理した。その後、PBS で十分に洗浄した。その後、デジタルカラーカメラ AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) を装着した倒立顕微鏡 Primo Vert (Carl Zeiss Microscopy) を用いて、コロニーを観察した。1 コロニー当たり 50 個以上の細胞からなる細胞集団を CFU-F コロニーと見なし、それらの画像を撮影した。

#### 3-2-5. フローサイトメトリー解析

P3 培養細胞をフローサイトメトリー用緩衝液に  $1.0 \times 10^6/100$  mL の濃度で懸

濁し、4 °Cで維持した。R-phycoerythrin (R-PE) 標識の表面抗原特異的抗体 (1 μg) を 4 °Cで 45 分間反応させた。フローサイトメトリー用緩衝液として、2% 熱不活化 FBS (Equitech-Bio) を含有する Hanks's balanced salt solution (HBSS) を調整し、使用した。コントロールとして、抗原特異的抗体の代わりに特異抗体に対応する R-PE 標識アイソタイプ適合抗体 (1 μg) を使用した。染色したサンプルをフローサイトメトリー用緩衝液で洗浄し、フローサイトメーター FACSVerse (BD Bioscience, Franklin Lake, NJ) で計測し、FACSuite software (BD Bioscience) を用いて解析した。その陽性細胞の数 (百分率) は、対応するアイソタイプ適合抗体で染色されたコントロール細胞の 1%未満の偽陽性率を閾値として決定した [7]。本フローサイトメトリー解析に使用した標的抗原特異的抗体は、表 3-1 に記載した。

表 3-1 : フローサイトメトリーに使用した抗体のリスト

(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

抗体名	アイソタイプ	クローン	標識	供給源
anti-CD14	mouse IgG <sub>1</sub> , κ	61D3	R-PE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, WA)
anti-CD24	mouse IgG <sub>1</sub> , κ	SN3	R-PE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, WA)
anti-CD34	mouse IgG <sub>1</sub> , κ	4H11	R-PE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, WA)
anti-CD45	mouse IgG <sub>1</sub> , κ	2D1	R-PE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, WA)
anti-CD73	mouse IgG <sub>1</sub> , κ	AD2	R-PE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, WA)
anti-CD90	mouse IgG <sub>1</sub> , κ	5E10	R-PE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, WA)
anti-CD105	mouse IgG <sub>1</sub> , κ	SN6	R-PE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, WA)
anti-CD146	mouse IgG <sub>1</sub> , κ	PIH12	R-PE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, WA)

R-PE: R-phycoerythrin

### 3-2-6. ポピュレーションダブリング解析

細胞を T-75 フラスコに増殖培地で播種した。各継代の細胞の増殖がサブコンフルエントの状態に達した時点で、通法に従って継代に伏し、培養した。これらの継代・培養の手順は、細胞の分裂能が失われるまで繰り返した。各継代でポピュレーションダブリングスコアを以下の計算式を用いて計算した：数式 =  $\log_2$  [培養後に得られた細胞数/播種した細胞数] [7]。その総計を PD スコアとした。PD スコアは、各サンプルにつき 3 つの独立した解析で算出した。

### 3-2-7. 多分化能試験

以前の研究に従って、SCAP を象牙芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞の各分化誘導条件で培養した [1,40]。

#### 3-2-7-1. *In vitro* 象牙芽細胞分化誘導解析

SCAP (P3、 $100 \times 10^3$ ) を 60mm ディッシュ上でフルコンフルエントになるまで増殖させた。その後、象牙芽細胞分化誘導培地でインキュベートした。象牙芽細胞分化誘導培地は、増殖培地に 1.8 mM potassium dihydrogen phosphate (Merck、Kenilworth, NJ) および 10 nM dexamethasone (Merck) を追加したものである [1]。

象牙芽細胞分化誘導培地は週 2 回交換した。SCAP を増殖培地中で培養した群をコントロールとした。象牙芽細胞特異的タンパク質および遺伝子、そして細胞内シグナル分子の発現を分析するために、象牙芽細胞分化誘導 1 週間後に培養細胞を回収し、ウェスタンブロット法および逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応 reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) 法にて解析した。象牙芽細胞分化誘導 4 週間後、石灰化結節形成を解析するために、培養サンプルをアリザリンレッド-S 染色に供した。石灰化結節中の含有カルシウムを解析するために、以前の方法 [41] に従って、アリザリンレッド-S 染色を施した培養サンプルよりアリザリンレッド-S 色素を 100 mM 塩化セチルピリジニウム (Merck) にて抽出し、分光光度計 Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) を用いて波長 570 nm にて可溶化したアリザリンレッド-S 色素を測定した。

### 3-2-7-2. *In vitro* 軟骨細胞分化誘導解析

SCAP (P3、 $0.1 \times 10^6$  /well) を低接着性 96 ウェルマルチウェルプレート PrimeSurface 96U multiwell plates (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) の well に播種し、各 well 中で増殖培地を用いてスフェロイドを作製した。その後、軟骨形成培地で培養した。軟骨細胞分化誘導培地として、Dulbecco's modified Eagle's



medium (Thermo Fisher Scientific) に 15% FBS (Equitech-Bio)、100 mM L-ascorbic acid 2-phosphate (Wako)、2 mM L-glutamine (Nacalai Tesque)、2 mM sodium pyruvate (Nacalai Tesque)、1% insulin-transferring-selenium mixture (Thermo Fisher Scientific)、100nM dexamethasone (Merck)、10 ng/mL TGFβ1 (PeproTech、Rocky Hill、NJ)、プレミックス抗生物質 (100 U/mL penicillin/100 μg/mL streptomycin ; Nacalai Tesque) を混合した培地を使用した。軟骨細胞分化誘導培地は週 2 回交換した。誘導の 6 週間後、軟骨細胞分化培養サンプルを用いて軟骨細胞特異的遺伝子を RT-qPCR 法にて解析した。増殖培地で 6 週間培養した SCAP スフェロイドをコントロールとした。

### 3-2-7-3. *In vitro* 脂肪細胞分化誘導解析

SCAP (P3、 $5 \times 10^3$ /dish) を 60mm ディッシュに播種し、増殖培地でコンフルエントになるまで培養した。その後、増殖培地に 500 μM isobutyl-methylxanthine (Merck)、60 μM indomethacin (Merck)、0.5 μM hydrocortisone (Merck)、10 μM insulin (Merck) を添加した脂肪細胞分化誘導培地で培養した。脂肪細胞分化誘導培地は週 2 回交換した。脂肪細胞分化誘導 4 週間後、脂肪細胞分化培養サンプルを用いて脂肪細胞特異的遺伝子を RT-qPCR 法により解析した。コントロール

ルとして、SCAP を増殖培地で 4 週間培養した。

象牙芽細胞分化の特異的遺伝子として *runt related transcription factor 2* (*RUNX2*)、*bone gamma-carboxyglutamate protein* (*BGLAP*) および *dentin sialophosphoprotein* (*DSPP*) を、軟骨細胞の分化特異的遺伝子として *SRY-box 9* (*SOX9*) および *collagen type X alpha 1 chain* (*COL10A1*)、脂肪細胞の分化特異的遺伝子として *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (*PPARG*) および *lipoprotein lipase* (*LPL*) をターゲットとして解析を行った。

### 3-2-8. AKT-siRNA、LY294002 および rapamycin による前処理

AKT-siRNA (20nM ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) は、Lipofectamine RNA iMax (Thermo Fisher Scientific) とともに抗生物質を含まない $\alpha$ MEM (Thermo Fisher Scientific) に溶解させた。この AKT-siRNA 溶液で SCAP を 3 日間前培養し、AKT の機能的ノックダウンを施した。また、dimethyl sulfoxide (DMSO ; Wako) で希釈した LY294002 (50  $\mu$ M ; Wako) および rapamycin (100 nM ; LKT Laboratories, St. Paul, MN) を添加した増殖培地で、SCAP を 3 日間前培養した。コントロールとして、AKT-siRNA の代わりに control scrambled siRNA (Santa Cruz

Biotechnology) を、LY294002 および rapamycin の代わりに DMSO (Wako) のみで細胞を処理した。この前処理した SCAP をその後の *in vitro* および *in vivo* 実験に使用した。

### 3-2-9. *In vivo* 石灰化組織形成解析

以前の研究 [1,41] に従って、*in vivo* での SCAP による石灰化組織形成に関する解析を行った。増殖条件下で培養した SCAP (P3、 $4 \times 10^6$ ) と HA/TCP 顆粒 (40 mg ; Zimmer Inc., Warsaw, IN) とを 37°C、90 分間、増殖培地中で混合した。免疫不全マウス Balb/cAJcl-nu/nu (雄性、8 週齢 ; SLC Japan, Shizuoka, Japan) の背部皮下にポケットを作製し、その混合物を一塊としてポケット内に移植した。コントロールとして、SCAP を含まない HA/TCP (40mg ; Zimmer Inc.) を同様に移植した。移植から 8 週間後、移植片を組織学的解析ならびに RT-qPCR 解析に供した。

### 3-2-10. *In vitro* における SCAP ベースの Scaffold-free 石灰化構造体の作製

Scaffold-free 石灰化構造体に適したスフェロイドの形成の条件検討を行った。

つまり、低接着性 96 ウェルマルチウェルプレート PrimeSurface 96U multiwell plates (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に播種する SCAP の初期細胞密度ならびにスフェロイド形成培養期間について予備試験を行なった。播種する SCAP の初期細胞密度として、1 well 当り  $1 \times 10^4$  個、 $5 \times 10^4$  個、 $1 \times 10^5$  個、 $2 \times 10^5$  個、 $3 \times 10^5$  個、 $4 \times 10^5$  個、 $5 \times 10^5$  個、 $1 \times 10^6$  個、スフェロイド形成培養期間として、1 日、2 日、3 日、7 日、14 日、21 日および 28 日とした。培養液は通常の増殖培地を用いた。上記培養期間において継時的にデジタルカラーカメラ AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss Microscopy) を装着した倒立型顕微鏡 Primo Vert (Carl Zeiss Microscopy) にて、スフェロイド形成状態を観察するとともに、培養状態を画像として記録した。スフェロイドに当たる凝集した領域の面積のみ、画像解析ソフト Image-J (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MA) で解析した。凝集していない領域は、測定から除外した。この予備実験の結果より、初期細胞密度は 1 well 当り  $1 \times 10^5$ 、スフェロイド形成培養期間は 7 日、これらを SCAP のスフェロイド形成のための最適条件として決定した。

この最適条件下で作製された SCAP ベースの scaffold-free スフェロイドを象牙

質形成培地で 4 週間培養した。象牙質形成培地は、**3-2-7-1** で用いた象牙芽細胞分化培地と同一組成の培地を使用し、週 2 回、培地交換を行なった。コントロールとして、いくつかのスフェロイドを増殖培地で培養した。各期間において、培養したスフェロイドを顕微鏡で画像化した。作製した石灰化構造体は、デジタルカラーカメラ AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss Microscopy) を装着した倒立顕微鏡 Primo Vert (Carl Zeiss Microscopy) および実体顕微鏡 SteREO Discovery.V12 (Carl Zeiss Microscopy) でこれら球状石灰化構造体を観察し、画像を撮影した。さらに、マイクロコンピュータ断層撮影 micro-computed tomography (マイクロ CT) 解析および蛍光 X 線分析 (X-ray fluorescence 分析 ; XRF 分析) にもこれら石灰化構造体を供した。

### 3-2-11. マイクロ CT 解析

石灰化構造体サンプルは、マイクロ CT 走査システム Skyscan 1076 (Skyscan、Kontich、Belgium) で画像化し、CT-Analyzer (Skyscan) を用いて骨ミネラル密度 (bone mineral density ; BMD) および骨パラメータを解析した [42]。BMD 値は、 $0.25 \text{ g/cm}^3$  および  $0.75 \text{ g/cm}^3$  の BMD 値を有するヒドロキシアパタイトファント

ム (Skyscan) を用いて標準化した。

### 3-2-12. XRF 分析

SCAP ベースの球状構造物を蒸留水中に浸漬し、分析用エタノールで注意深く洗淨した。スフェロイド中のカルシウム含量は、JSX-1000S X-ray fluorescence spectrometer (JEOL、東京、日本) でファンダメンタルパラメータ法により分析した。コントロールとして、ヒト脱落歯サンプルを用いた。

### 3-2-13. RT-qPCR 解析

TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を用いて、培養サンプルから RNA を抽出し、DNase I (Promega、Madison、WI) で酵素処理した。抽出物中のゲノム DNA のコンタミネーションをチェックした。つまり、抽出 RNA とヒト glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプライマーペア、Quick Taq HS DeyMix (TOYOBO、Osaka、Japan) を混合し、サーマルサイクラー T-100 (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA) にて PCR 反応を行った。PCR 反応条件は、まず 95°C、120 秒反応させ、95°C、30 秒間、60°C、30 秒間、68°C、60 秒間の 3 ステップ増

幅を 30 サイクル行なった。各 PCR 増幅産物 5  $\mu$ l を 2% agarose gel にアプライし、Mupid-2plus (Mupid, Tokyo, Japan) にて電気泳動を行なった。その後、ゲルを 2% ethidium bromide で染色し、ゲル撮影装置 Gel Doc System (Bio-Rad Laboratories) にて画像化した。抽出 RNA のゲノム DNA のコンタミネーションは含まれていないことを確認した。ゲノム DNA のコンタミネーションが検出された場合、再度 DNase I (Promega) を用いて抽出試料を処理し、上記の方法で確認した。ゲノム DNA のコンタミネーションチェック済みの抽出 RNA サンプルは、RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて、トータル RNA として精製した。トータル RNA を用いて、ReverTra Ace qPCR kit (TOYOBO) を使用して cDNA を作製した。

Eagle Taq Universal Master Mix (Roche, Basel, Switzerland) および TaqMan プローブ (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA (10ng) をリアルタイム PCR 装置 LightCycler 96 system (Roche) 上で増幅して、qPCR に適用した。PCR 条件は以下のように設定した。プレインキュベーション 1 (50°C、120 秒間)、プレインキュベーション 2 (95°C、600 秒間) および 2 ステップ増幅 (95°C、15 秒間およ

び 60°C、60 秒間 45 サイクル) として反応を行った。各標的遺伝子の発現は、18S ribosomal RNA にて標準化した。今回、研究に用いた全てのプローブは Applied Biosystems より購入した。標的 TaqMan プローブは表 3-1 に列挙した。



### 表 3-2 : RT-qPCR に用いたプローブのリスト

(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

<b>Name</b>	<b>Gene assay ID Number</b>
<i>BGLAP</i>	Hs01587814_g1
<i>COL10A1</i>	Hs00166657_m1
<i>DSPP</i>	Hs00171962_m1
<i>LPL</i>	Hs00173425_m1
<i>PPARG</i>	Hs0115513_m1
<i>RUNX2</i>	Hs00231692_m1
<i>SOX9</i>	Hs01001343_g1
<i>TBR1</i>	Hs00232429_m1
<i>TBR2</i>	Hs00234253_m1
<i>TBR3</i>	Hs00234257_m1
<u>Ribosomal RNA, 18S</u>	<u>Hs99999901_s1</u>

*BGLAP*: bone gamma-carboxyglutamate protein

*COL10A1*: collagen type X alpha 1 chain

*DSPP*: dentin sialophosphoprotein

*LPL*: lipoprotein lipase

*PPARG*: peroxisome proliferator-activated receptor gamma

*RUNX2*: runt related transcription factor 2

*SOX9*: SPY-box 9

*TBR1*: transforming growth factor receptor type I

*TBR2*: transforming growth factor receptor type II

*TBR3*: transforming growth factor receptor type II

### 3-2-14. ウェスタンブロット解析

培養 SCAP サンプルからトータルタンパク質を抽出した。抽出には、M-PER mammalian protein reagent (Thermo Fisher Scientific) にプロテアーゼインヒビターカクテル (Nacalai Tesque) とホスファターゼインヒビターPhoSTOP (Roche) を添加した抽出液を使用した。Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) を用いて、トータルタンパク質の濃度を計測した。測定には、分光光度計 Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) を使用し、波長 595 nm で測定を行った。トータルタンパク質サンプルは、NuPAGE LDS Sample Buffer (4×)を用いて、70°C、7 分間処理し、その後、室温放置した。

作製したトータルタンパク質サンプルは、10% TGX FastCast acrylamide gels (Bio-Rad Laboratories) を用いて電気泳動にて分離し、Trans-Blot Turbo Transfer System RTA Transfer Kit (Bio-Rad Laboratories) と Trans-Blot Turbo blotting system (Bio-Rad Laboratories) を用いて、polyvinylidene difluoride メンブレン (Bio-Rad Laboratories) に転写した。5% skim milk を含有した Tris-buffered saline (150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.2) にて、転写メンブレンを 1 時間、室温でブロッ

キング処理した。その後、一次抗体にて 4°C で一晩インキュベートした。その後、horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体 (1 : 1000、Santa Cruz Biotechnology) にて室温で 1 時間インキュベートした。メンブレンは、SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) を使用して化学発光を行い、イメージャー ImageQuant LAS 4010 (GE Healthcare Life Sciences、Pittsburgh、PA) にて画像化した。内部コントロール評価のために、各メンブレンを WB Stripping Solution Strong (Nacalai Tesque) で処理し、再処理メンブレンを抗 $\beta$ -アクチン (actin beta ; ACTB) 抗体 (Merck) で再プローブし、続いて HRP 標識二次抗体 (1 : 1,000、Santa Cruz Biotechnology) にてインキュベートした。本ウェスタンブロット解析で使用した特異的抗体を表 3-2 に列挙した。各バンドの強度は、Image-J (NIH) を用いて測定し、対応する ACTB バンドの強度を用いて標準化した。

表 3-2 : ウェスタンブロット及び免疫蛍光解析用抗体リスト

(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

<b>Name</b>	<b>Host/Isotype</b>	<b>Supplier</b>
anti-ACTB	mouse IgG <sub>1</sub>	Merck (Kenilworth, NJ)
anti-AKT	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-AKT, phosphorylated	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-BGLAP	rabbit IgG	LifeSapn BioScience (Seattle, WA)
anti-DSPP	mouse IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)
anti-ERK1/2	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-ERK1/2, phosphorylated	mouse IgG <sub>1</sub>	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-mitochondria, human	mouse IgG <sub>1</sub>	Merck (Kenilworth, NJ)
anti-mTOR	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-mTOR, phosphorylated	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-p38	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-p38, phosphorylated	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-RUNX2	rabbit IgG	Abcam (Cambridge, England)

ACTB: actin,  $\beta$

BGLAP: bone gamma-carboxyglutamate acid protein

DSPP: dentin sialophosphoprotein

ERK: extracellular signal-regulated kinases

mTOR: mammalian target of rapamycin

RUNX2: runt-related transcription factor 2

### 3-2-15. 組織学的解析

組織サンプルは、PBS に 4% paraformaldehyde を溶解した固定液 (pH 7.2) で 4°C、一晩浸漬固定した。その後、10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液 (pH8.0) で脱灰した。脱灰サンプルは通法に従って、上昇エタノール系列で脱水し、パラフィンに包埋した。厚さ 6 µm のパラフィン切片を作製し、脱パラフィン処理後、通法に従って、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin ; H&E) 染色を施し、Malinol (Muto Pure Chemicals、Tokyo、Japan) を用いてサンプルを封入した。全ての H&E 染色切片は、デジタルカラーカメラ AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss Microscopy) を装着した正立顕微鏡 Axio LabA1 (Carl Zeiss Microscopy) で観察し、画像を撮影した。

一部のパラフィン切片は免疫蛍光染色に利用した。つまり、脱パラフィン処理後、一次抗体で 4°C、一晩処理した。その後、切片は Alexa Fluor 647 標識二次抗体 (1:100 ; Agilent、Santa Clara、CA) と共にインキュベートした。切片を最終的に 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI ; Nacalai Tasque) で核染色を施し、蛍光染色用封入剤 Fluoromout/Plus (Agilent) を用いてサンプルを封入

した。免疫蛍光コントロールとして、一次抗体の代わりにアイソタイプ適合抗体（マウス IgG<sub>1</sub>; Santa Cruz Biotechnology）で切片を染色した。全ての免疫蛍光染色切片は、デジタルモノクロカメラ AxioCam 506 mono（Carl Zeiss Microscopy）と ApoTome.2 optical section system を装着した正立顕微鏡 Axio Imager M2（Carl Zeiss Microscopy）で観察し、画像を撮影した。

形態学的解析のために、H&E 染色切片から無作為に 7 つの領域を選択した。各領域における新たに形成された石灰化組織領域を Image-J software（NIH）によって測定し、全組織領域に対する石灰化組織領域の比を計算した。

### 3-2-16. 顎骨欠損モデルにおける *in vivo* 骨再生の解析

顎骨欠損モデルにおいて *in vivo* 骨再生解析を行った [43]。顎骨欠損は、野生型 C57BL/6 マウス（4 週齢、雄性；SLC）の左側上顎第一大臼歯の近心頬側根の周囲に形成した。SCAP または SCAP ベースの scaffold-free スフェロイド（ $0.1 \times 10^6$ /well）は、LY294002（50  $\mu$ M）および rapamycin（100 nM）による前処理下で 3 日間培養した。その後、SCAP ベースの scaffold-free スフェロイドを象牙質形

成条件下で4週間培養し、石灰化構造体を作製した。未分化 SCAP (P3、 $4 \times 10^6$ ) と HA/TCP 顆粒 (40 mg ; Zimmer Inc.) とを 37°C、90 分間、増殖培地中で混合し、骨窩洞内に移植した。一方、SCAP ベースの石灰化構造体は、移植前に DNase I (Promega) で 37°C、120 分処理し、オートクレーブにて滅菌処理し、単独で骨窩洞内に移植した。HA/TCP キャリアーを骨欠損部に移植した群を SCAP 移植のコントロールとし、骨欠損部に何ら材料を移植しなかった群を SCAP ベースの石灰化構造体のコントロールとした。移植 8 週間後にサンプルを採取し、H&E 染色による組織学的解析に供した。以前、報告された評価基準 [43] に従って、骨欠損領域を形態組織学的に解析した。

### 3-2-17. 統計解析

統計的結果は、少なくとも 3 回の測定の平均±標準誤差 (SEM) として表した。2 群間の比較を、独立した両側スチューデント t 検定によって分析した。複数群の比較は、Tukey's post hoc test に続いて一方向反復測定分散分析で行った。P<0.05 の値を有意であると考えた。すべての統計分析は、PRISM 6 software program (GraphPad Software, La Jolla, CA) を用いて行った。

### §3-3. 結果

#### 3-3-1. SCAP は多能性 MSCs である

ヒト永久歯の未完成歯根の根尖乳頭組織から酵素処理により単離された細胞集団の中には、プラスチック製培養ディッシュ上に、紡錘形を呈し、付着する細胞がクラスターを形成する能力を有する細胞集団が存在していた (図 3-3-1 a、b)。その付着性細胞コロニーの大きさと細胞密度にコロニー間で差が認められた (図 3-3-1 a、b)。

フローサイトメトリーによる表面抗原の解析により、付着性コロニー形成細胞の P3 細胞 (以後、P3 細胞と記載) は、CD146、CD105、CD73 および CD90 を陽性発現するが、造血系細胞の表面抗原である CD34、CD45 および CD14 は発現していなかった (図 3-3-1 c)。興味深いことに、その P3 細胞は、熱安定性抗原であり、リンパ球に発現する CD24 も陽性を示した (図 3-3-1 c)。実は、CD24 は未分化の DPSCs ではその発現は認められないが、未分化の SCAP に発現が報告され、未分化 SCAP の特異的マーカーと考えられている [1]。



ポピュレーションダブリング解析にて、付着性コロニー形成細胞は高い細胞増殖能力を示したが、その増殖能力は無限でなく、総ポピュレーションダブリングスコア  $76.5 \pm 3.8$  を示す増殖能力に限界のある細胞集団であった。

象牙芽細胞・軟骨細胞および脂肪細胞への分化誘導条件下で、それぞれの分化誘導培養後 1 週、4 週および 6 週において培養された P3 細胞において、象牙芽細胞・軟骨細胞および脂肪細胞における特異的遺伝子の発現を RT-qPCR 法で解析した。分化誘導を受けていないコントロール P3 細胞と比較して、象牙芽細胞分化特異的遺伝子である *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP*、軟骨細胞分化特異的遺伝子である *SOX9* および *COL10A1*、脂肪細胞分化特異的遺伝子である *PPARG* および *LPL* の発現が著しく上昇していた (図 3-3-1 d)。

以上のプロファイリング結果を MSCs の最低基準および SCAP としての特性の基準 [1] と照合した結果、今回、ヒト歯の根尖乳頭から単離した付着性コロニー形成細胞は SCAP として同定された。

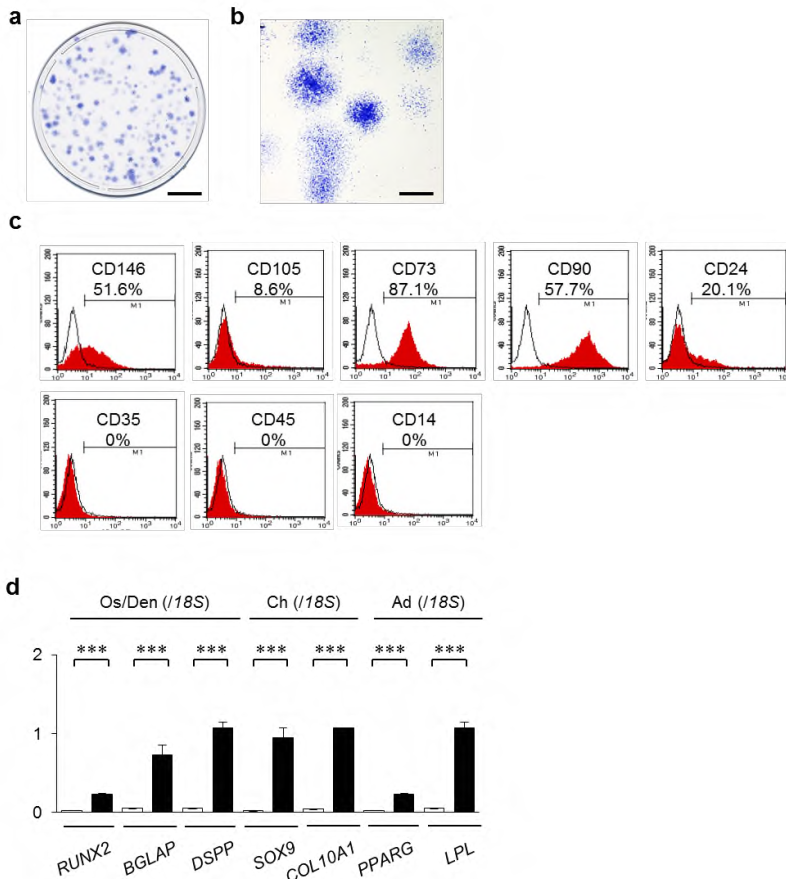


図 3-3-1. SCAP の特性解析

(a、b) 付着コロニー形成解析。トルイジンブルー染色。付着コロニー像。バー = 20 mm (a)。形成したコロニーはそのサイズおよび密度に差を有していた。バー = 5 mm (b)。(c) フローサイトメトリー解析。SCAP の免疫表現型を示す。赤色ヒストグラム領域：細胞表面マーカー特異的抗体染色群、白色ヒストグラム領域：コントロール抗体染色群。数値は、各表面抗原の陽性細胞の百分率の平均値を表示。(d) 多分化能解析。RT-qPCR 解析。SCAP における象牙芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞マーカー遺伝子の発現。結果は、18S リボソーム RNA (18S) の発現に対する割合の平均値 ± 標準誤差で表示。黒色棒グラフ：象牙芽細胞分化誘導、軟骨細胞分化誘導および脂肪細胞分化誘導 SCAP 群。白色棒グラフ：コントロール分化未誘導 SCAP 群。BGLAP、bone gamma-carboxyglutamate protein；COL10A1、collagen type X alpha 1 chain；DSPP、dentin sialophosphoprotein；LPL、lipoprotein lipase；PPARG、peroxisome proliferator-activated receptor gamma；RUNX2、runt related transcription factor 2；SOX9、SRY-box 9。n = 5。\*\*\* P < 0.005。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

### 3-3-2. PI3K-AKT-mTOR シグナル経路は、SCAP の象牙芽細胞分化過程で上昇する

SCAP の象牙芽細胞分化能力を更に追求するために、*in vitro* 石灰化組織形成能力をカルシウムと親和性の高いアリザリンレッド-S 染色法にて試験した。象牙芽細胞分化誘導 4 週間後の SCAP 培養系において、未分化コントロール SCAP と比較して、カルチャーディッシュ上に大量のカルシウム沈着が認められた (図 3-3-2 a、b)。

ウェスタンブロット解析にて、象牙芽細胞分化誘導 1 週後の SCAP 培養系において、未分化コントロール SCAP と比較して、象牙芽細胞分化特異的分子である *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* の発現レベルが顕著に増大していた (図 3-3-2 c、d)。この象牙芽細胞分化特異的タンパク質発現の結果は、RT-qPCR 法による象牙芽細胞分化特異的遺伝子 *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* の発現上昇の結果 (図 3-3-1 d) により支持される結果となった。

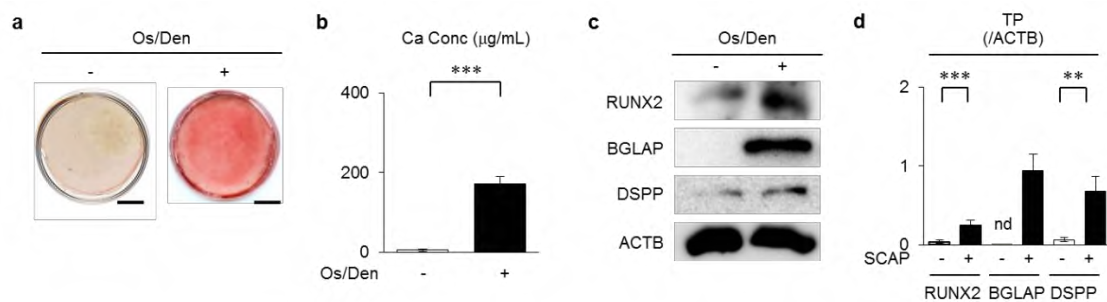


図 3-3-2. SCAP の *in vitro* 象牙芽細胞分化能力

SCAP を象牙芽細胞分化培地 (Os/Den) で培養した。(a, b) 象牙芽細胞分化 4 週後における石灰化組織形成解析。アリザリンレッド-S 染色。アリザリンレッド-S 染色像。バー= 25 mm (a)。カルシウム沈着解析 (b)。(c, d) 象牙芽細胞分化 1 週後における象牙芽細胞分化特異的タンパク質 *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* の発現解析。ウェスタンブロット解析。ウェスタンブロット像 (c)。β-アクチン (actin, beta ; *ACTB*) に対する *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* の相対的発現比較 (d)。b、d : n = 5。\*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.005。グラフは平均値 ± 標準誤差で表示。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

次に、SCAP の *in vivo* における象牙質形成能力について検討した。SCAP を、HA/TCP キャリアーとともに免疫不全マウスの背部皮下に移植した。移植後 8 週での移植体で組織学的解析を行うと、SCAP 移植組織に新たな石灰化組織の形成が確認された (図 3-3-3 a)。一方、HA/TCP 単独移植のコントロール移植体では、新生石灰化組織は全く認められなかった (図 3-3-3 a)。

免疫蛍光染色法にて、移植ドナー細胞による新生石灰化組織の形成への関与を検討した。ヒト・ミトコンドリアに陽性反応を示す細胞が、SCAP 移植組織の新生石灰化マトリックス上に配置されていた (図 3-3-3 b)。一次抗体の代わりにアイソタイプが一致した抗体で染色したサンプルでは、蛍光強度は検出されなかった (データ未提示)。

更に、移植体におけるヒト *RUNX2*、ヒト *BGLAP* およびヒト *DSPP* の発現を RT-qPCR 法で解析した。ヒト *RUNX2*、ヒト *BGLAP* およびヒト *DSPP* の発現が SCAP 移植組織において検知された (図 3-3-3 c)。一方、HA/TCP 単独移植のコントロール移植体では、ヒト *RUNX2*、ヒト *BGLAP* およびヒト *DSPP* の発現は検出

されなかった (図 3-3-3 c)。

以上の結果から、今回の *in vitro* ならびに *in vivo* の実験系で SCAP は、象牙芽細胞へ分化し、象牙質の基質を形成する能力を備えていることが証明され、SCAP が歯根再生医療における優れた細胞ソースであると考えられた。

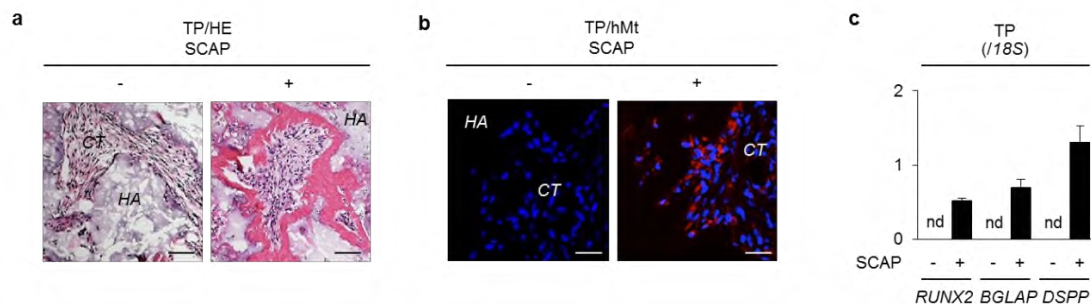


図 3-3-3. SCAP の *in vivo* 石灰化組織形成能力

(a, b) SCAP 皮下移植実験。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による移植組織 (TP) の組織像。バー = 100  $\mu$ m (a)。免疫蛍光染色によるヒト・ミトコンドリア (hMt) 抗体での染色像。バー = 50  $\mu$ m (b)。(c) SCAP 移植体におけるヒト *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* 発現解析。RT-qPCR 解析。発現結果は、18S リボソーム RNA (18S) の発現に対する相対的発現比較とし、平均値  $\pm$  標準誤差で表示。n = 5。nd、未検出。a、b : CT、結合組織 ; HA、ヒドロキシアパタイト/リン酸三カルシウム。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

予備的 RT-qPCR 解析により、SCAP において、*TBR1*、*TBR2* および *TBR3* の各遺伝子発現を解析したところ、いずれの遺伝子も SCAP において発現が確認された (図 3-3-4)。歯根発生における TGF $\beta$ /TBRs シグナルの発生学的重要性を鑑みると [5]、この RT-qPCR の結果は、TGF $\beta$ /TBRs 下流の細胞内シグナル経路が、SCAP の象牙芽細胞への分化と象牙質形成に関与している可能性を示唆する結果となった。

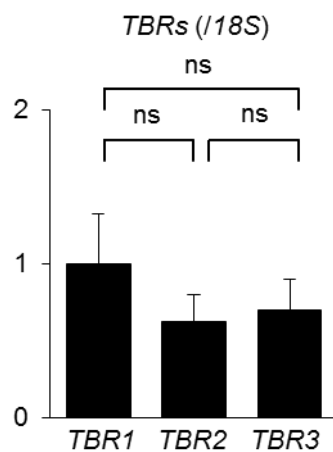


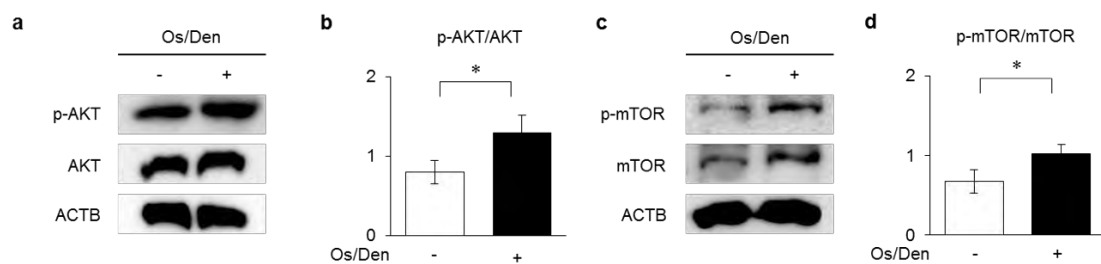
図 3-3-4. SCAP における *transforming growth factor receptors* (TBRs) 発現 RT-qPCR 解析。SCAP における *TBR type I* (*TBR1*)、*TBR2* および *TBR3* の発現。18S リボソーム RNA (18S) の発現に対する相対的発現比較とし、平均値 $\pm$ 標準誤差で表示。n = 5。 ns、有意差無し。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

TGF $\beta$ /TBRs 下流シグナルとして古典的シグナル経路と非古典的シグナル経路が知られている [5]。前者は Smad2/3 が、後者は AKT、p38 そして ERK1/2 の関与が強く考えられている。そこで、象牙芽細胞分化誘導 1 週後の SCAP 培養系（象牙芽細胞分化誘導 SCAP）とその未分化コントロール SCAP 培養系（未分化 SCAP）における、これらシグナル分子ならびにそのリン酸化のレベルをウェスタンブロット法にて検討することとした。

まずは、象牙芽細胞分化誘導 SCAP と未分化 SCAP における古典的シグナル経路分子である Smad2/3 の発現を解析した。象牙芽細胞分化誘導 SCAP と未分化 SCAP における発現は同等のレベルであった（データ未提示）。また、象牙芽細胞分化誘導 SCAP と未分化 SCAP における Smad2/3 のリン酸化のレベルも同等であった（データ未提示）。



非古典的シグナル経路分子の一つである AKT は、象牙芽細胞分化誘導 SCAP と未分化 SCAP における発現は同等のレベルであったが、そのリン酸化のレベルが、未分化 SCAP と比べて象牙芽細胞分化誘導 SCAP において著しく上昇していた (図 3-3-5 a、b)。AKT の下流シグナル分子である mTOR においても、相対的リン酸化のレベルが著しく増強していた (図 3-3-5 c、d)。



**図 3-3-5. 象牙芽細胞分化誘導 SCAP における AKT および mammalian target of rapamycin (mTOR) の発現とそのリン酸化についての解析**

(a-d) ウェスタンブロット解析。SCAP を象牙芽細胞分化培地 (Os/Den) で 1 週間培養した。AKT およびリン酸化 AKT (p-AKT) (a)、mTOR およびリン酸化 mTOR (p-mTOR) の発現 (c)。AKT (b) および mTOR (d) の相対的リン酸化の発現を表示。b、d : n = 5。\* P < 0.05、\*\*\* P < 0.005。結果は平均値 ± 標準誤差で表示。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

一方、非古典的シグナル経路分子である p38 および ERK1/2 の発現とリン酸化は、象牙芽細胞分化誘導 SCAP と未分化 SCAP との間にほとんど差が認められなかった (図 3-3-6)。

以上の所見より、SCAP の *in vitro* 象牙芽細胞分化過程において、TGF  $\beta$  /TBRs 下流シグナルの AKT-mTOR シグナル経路の関与が示唆された。

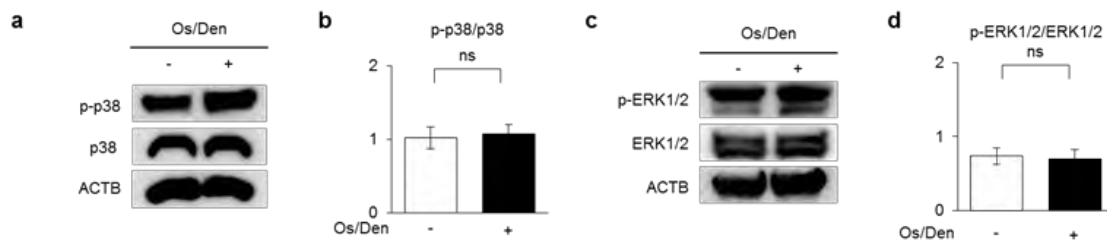


図 3-3-6. 象牙芽細胞分化誘導 SCAP における p38 および extracellular regulated kinases 1/2 (ERK1/2) の発現とそのリン酸化についての解析

(a-d) ウェスタンブロット解析。SCAP を象牙芽細胞分化培地 (Os/Den) で 1 週間培養した。p38 およびリン酸化 p38 (p-p38) (a)、ERK1/2 およびリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) の発現 (c)。p38 (b) および ERK1/2 (d) の相対的リン酸化の発現を表示。b、d : n = 5。ns : 有意差無し。結果は平均値 ± 標準誤差で表示。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

### 3-3-3. SCAP の PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の抑制は、SCAP の *in vitro* 象牙芽細胞分化を促進する

次に、SCAP の象牙芽細胞分化における PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の役割を理解するために、AKT-siRNA (20 nM)、LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) を SCAP に予め 3 日間作用させ、象牙芽細胞分化誘導を行った (図 3-3-7 a)。この前処理のコントロールとして、scrambled siRNA および DMSO を用いた。また、AKT-siRNA (20 nM)、LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) を作用させた直後、ウェスタンブロット法にて各標的シグナル経路に対する効果を確認した。象牙芽細胞分化誘導 1 週後と 4 週後のそれぞれの時点で、象牙芽細胞特異的タンパク質の発現ならびに石灰化組織の形成について、ウェスタンブロット法ならびにアリザリンレッド-S 染色法で解析した。

SCAP を 3 日間、AKT-siRNA (20 nM) で前処理した。ウェスタンブロット解析にて、AKT-siRNA 前処理 SCAP では、AKT 発現の低下とともに、リン酸化 AKT の発現の低下を示した (図 3-3-7 b-d)。

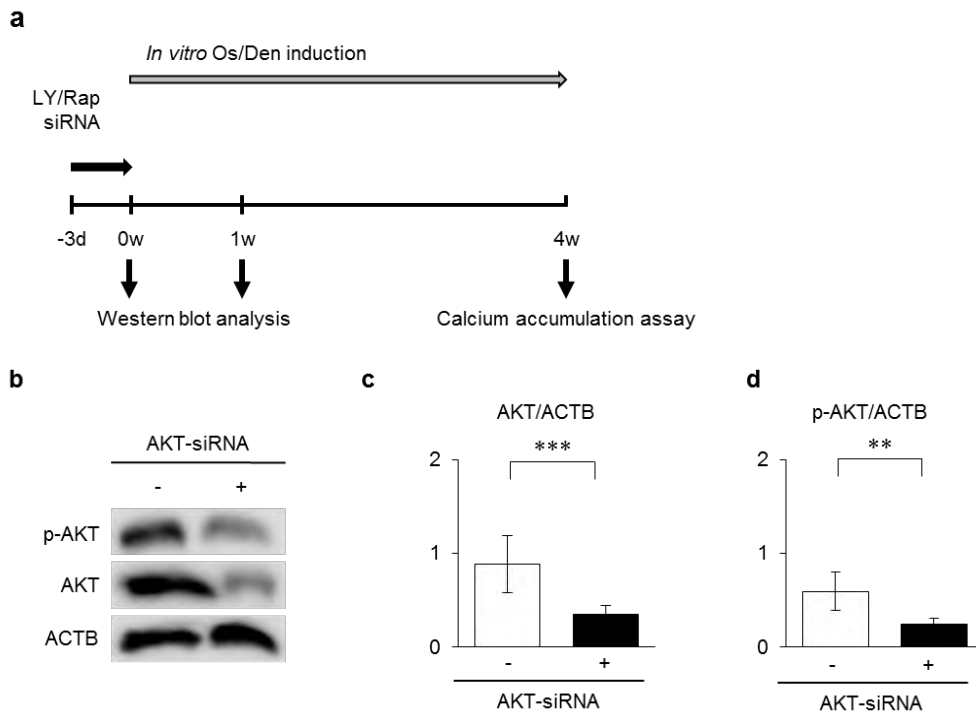


図 3-3-7. SCAP に対する AKT-siRNA 前処理 1

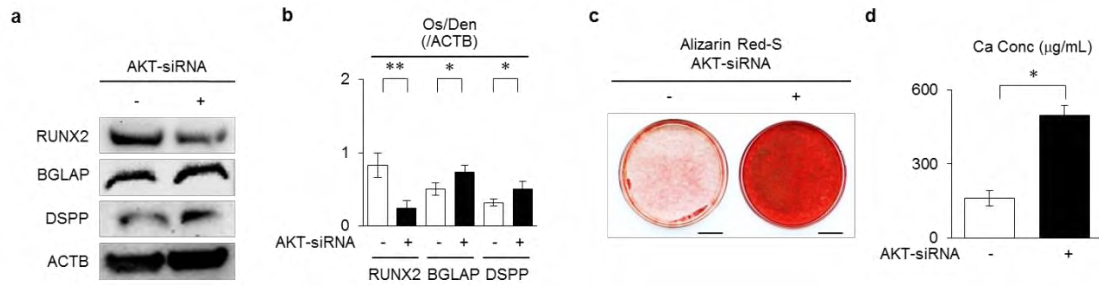
(a) AKT siRNA、LY294002 および rapamycin による前処理と象牙芽細胞分化のスキーム。SCAP を、LY294002 (50mM : LY)、rapamycin (100 nM : Rap)、および AKT siRNA (20 nM : siRNA) で 3 日間前処理し、象牙芽細胞分化培地 (Os/Den) で培養した。象牙芽細胞分化の 0、1 および 4 週後に培養サンプルを回収した。

(b-d) AKT siRNA 前処理 SCAP における AKT および p-AKT の発現。ウェスタンブロット解析。AKT および p-AKT の発現 (b)。AKT および p-AKT の相対的発現 (c、d)。c、d : n = 5。\*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.005。結果は、平均値 ± 標準誤差で表示。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

興味深いことに、象牙芽細胞分化誘導 1 週後のウェスタンブロット解析にて、コントロール siRNA 前処理 SCAP と比較して、AKT-siRNA 前処理 SCAP では *RUNX2* の発現が顕著に抑制され、*BGLAP* および *DSPP* の発現が顕著に増強されていた (図 3-3-8 a、b)。

象牙芽細胞分化誘導 4 週後のアリザリンレッド-S 染色にて、コントロール siRNA 前処理 SCAP と比較して、AKT-siRNA 前処理 SCAP ではカルシウム沈着が著しく促進していた (図 3-3-8 c、d)。

一方、AKT-siRNA 前処理は、SCAP における p38 および ERK1/2 ならびにそのリン酸化の発現に何ら影響を与えなかった (データ未提示)。



### 図 3-3-8. SCAP に対する AKT-siRNA 前処理 2

SCAP を、AKT siRNA (20 nM : siRNA) で 3 日間前処理し、象牙芽細胞分化培地 (Os/Den) で培養した。(a, b) 象牙芽細胞分化 1 週間後のウェスタンブロット解析。*RUNX2*、*BGLAP*、および *DSPP* の発現 (a)。*RUNX2*、*BGLAP*、および *DSPP* の相対的発現 (b)。(c, d) 象牙芽細胞分化 4 週間後のアリザリンレッド-S 染色。アリザリンレッド-S 染色像。バー = 25 mm (c)。カルシウム含有解析 (d)。b, d : n = 5。\* P < 0.05。結果は平均値 ± 標準誤差で表す。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

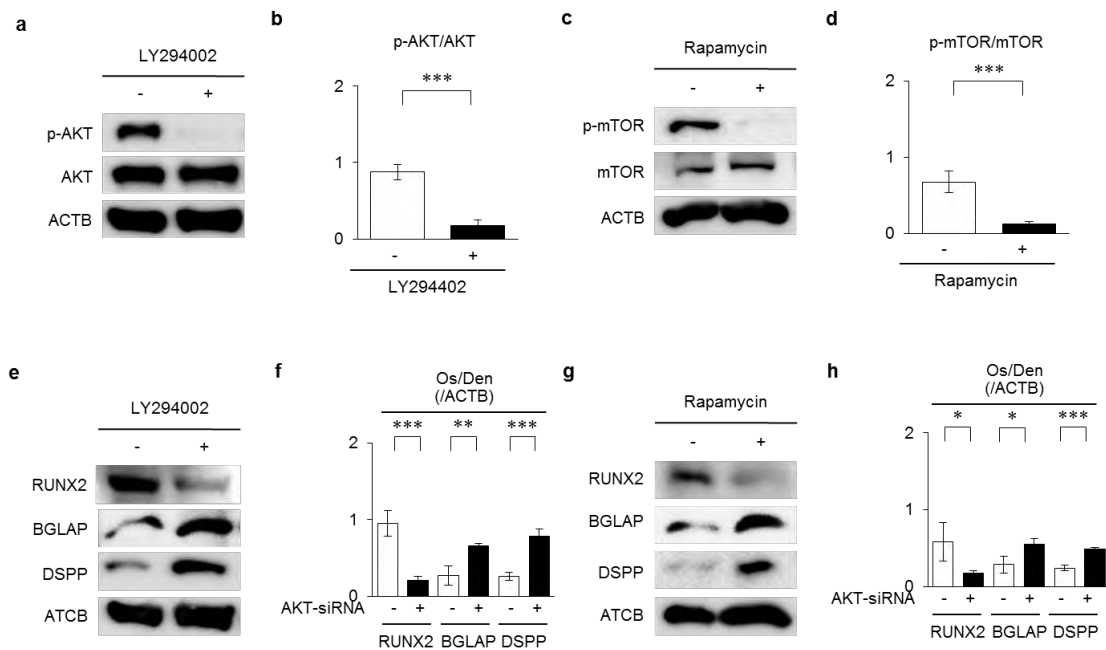
SCAP を 3 日間、LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) で前処理した。

ウェスタンブロット解析にて、LY294002 前処理 SCAP および rapamycin 前処理 SCAP では、それぞれリン酸化 AKT およびリン酸化 mTOR の発現が低下を示していた (図 3-3-9 a-d)。

象牙芽細胞分化誘導 1 週後のウェスタンブロット解析にて、DMSO 前処理コントロール SCAP と比較して、LY294002 前処理 SCAP および rapamycin 前処理 SCAP では、*RUNX2* の発現が顕著に抑制され、*BGLAP* および *DSPP* の発現が顕著に増強されていた (図 3-3-9 e-h)。

象牙芽細胞分化誘導 4 週後のアリザリンレッド-S 染色にて、コントロール siRNA 前処理 SCAP と比較して、LY294002 前処理 SCAP および rapamycin 前処理 SCAP では、カルシウム沈着が著しく促進していた (図 3-3-10)。

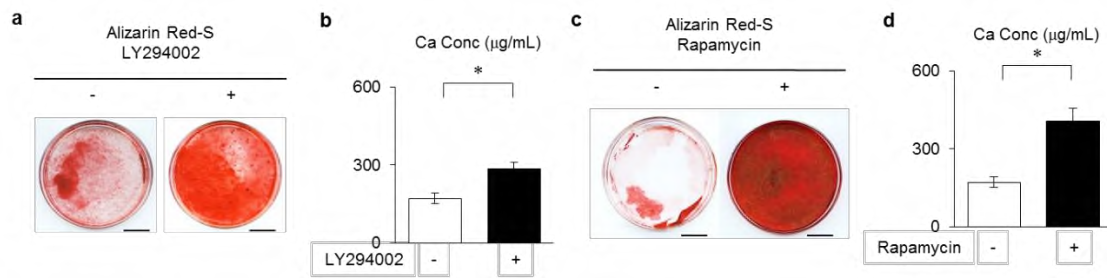
一方、LY294002 および rapamycin の前処理は、SCAP における p38 および ERK1/2 ならびにそのリン酸化の発現に何ら影響を与えなかった (データ未提示)。



### 図 3-3-9. SCAP に対する PI3K/mTOR 特異的阻害剤前処理 1

SCAP を、LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) で 3 日間前処理し、象牙芽細胞分化培地 (Os/Den) で培養した。(a-d) LY294002 前処理 SCAP および rapamycin 前処理 SCAP におけるウェスタンブロット解析。AKT および p-AKT の発現 (a)。AKT および p-AKT の相対的リン酸化 (b)。mTOR および p-mTOR の発現 (c)。mTOR および p-mTOR の相対的リン酸化 (d)。(e-h) 象牙芽細胞分化 1 週後の SCAP におけるウェスタンブロット解析。RUNX2、BGLAP、および DSPP の発現 (e、g)。RUNX2、BGLAP、および DSPP の相対的発現 (f、h)。b、d、f、h : n = 5。\* P < 0.05、\*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.005。結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表示。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)





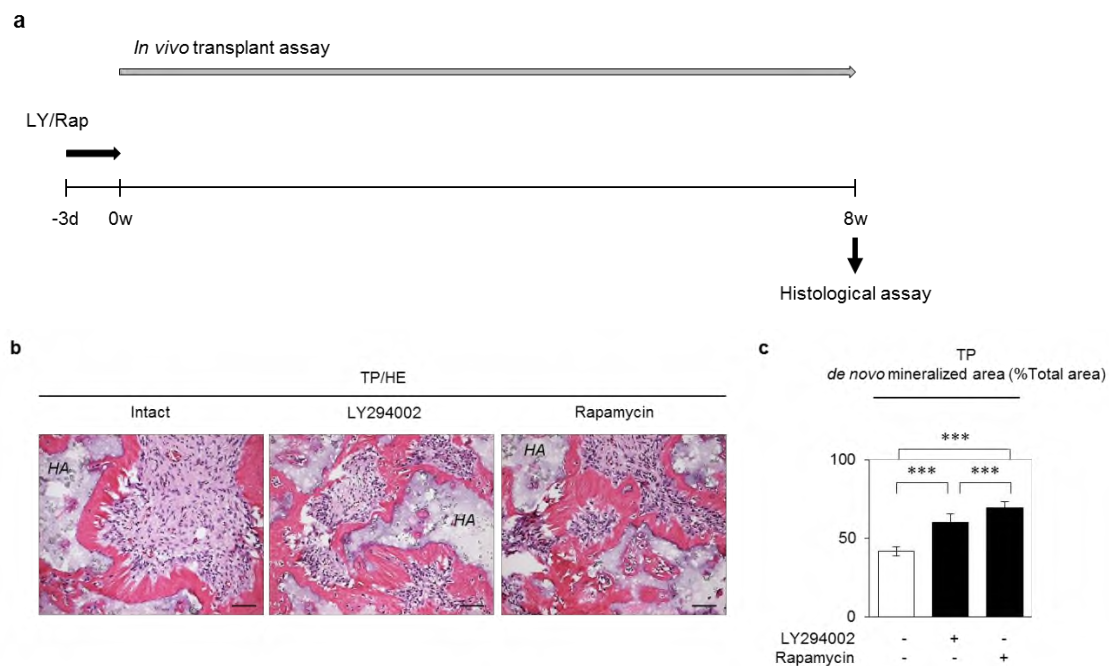
### 図 3-3-10. SCAP に対する PI3K/mTOR 特異的阻害剤前処理 2

SCAP を、LY294002 (50 μM) および rapamycin (100 nM) で 3 日間前処理し、象牙芽細胞分化培地 (Os/Den) で培養した。(a-d) 象牙芽細胞分化 4 週間後のアリザリンレッド-S 染色。アリザリンレッド-S 染色像。バー = 25 mm (a, c)。カルシウム含有解析。b, d : n = 5。\* P < 0.05。結果は平均値 ± 標準誤差で表示 (b, d)。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

### 3-3-4. PI3K-AKT-mTOR 経路の抑制は、SCAP の *in vivo* 石灰化組織形成能力を増強する

次に、LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) で3日間前処理した SCAP を、HA/TCP キャリアーとともに免疫不全マウスの背部皮下に移植する実験を行った (図 3-3-11 a)。ともに移植後8週で移植体を回収し、組織学的解析ならびに遺伝子発現解析に供した。

LY294002 前処理 SCAP および rapamycin 前処理 SCAP は、DMSO 前処理コントロール SCAP と比較して、新生石灰化組織の形成を著しく増加させた (図 3-3-11 b、c)。また、rapamycin 前処理 SCAP 移植体は、LY294002 前処理 SCAP 移植体よりも新生石灰化組織形成量が著しく多く認められた (図 3-3-11 b、c)。



**図 3-3-11. SCAP の *in vivo* 石灰化組織形成における PI3K-AKT-mTOR 経路の抑制の効果 1**

(a) SCAP 皮下移植解析のスキーム。SCAP を LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) で 3 日間前処理し、HA/TCP キャリアーとともに免疫不全マウスに皮下移植した。(b) 移植後 8 週後の組織学的解析。ヘマトキシリンおよびエオシン (HE) 染色による移植組織 (TP) の画像。HA : HA/TCP キャリアー。(c) 新生石灰化組織形成量の解析。結果は、コントロール SCAP 移植群 (intact) に対する百分率で表示。n = 5。\*\*\* P < 0.005。結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表示。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

RT-qPCR 解析にて、LY294002 および rapamycin で前処理した SCAP の移植体はともに、コントロール SCAP 移植体と比較して、ヒト *RUNX2* の発現が抑制され、一方、ヒト *BGLAP* およびヒト *DSPP* の発現が増強していた (図 3-3-12)。また、rapamycin 前処理 SCAP 移植体では、LY294002 前処理 SCAP 移植体よりもヒト *RUNX2* はより低い発現を示し、一方、ヒト *BGLAP* およびヒト *DSPP* はより高い発現を示していた (図 3-3-12)。

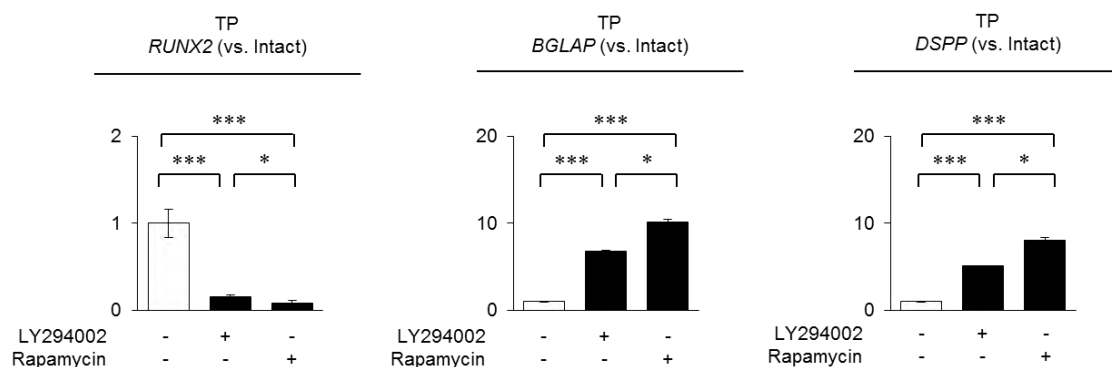


図 3-3-12. SCAP の *in vivo* 石灰化組織形成における PI3K-AKT-mTOR 経路の抑制の効果 2

SCAP を LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) で 3 日間前処理し、HA/TCP キャリアーとともに免疫不全マウスに皮下移植した。移植後 8 週後の RT-qPCR 解析。移植組織における *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* の発現。結果は、コントロール SCAP 移植群 (intact) に対する百分率で表示。intact : 前処理無し SCAP 移植群。n = 5。\* P < 0.05 および\*\*\* P < 0.005。グラフは平均値  $\pm$  標準誤差で表す。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

### 3-3-5. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体の作製

SCAP を用いた軟骨分化で培養するプロトコールで SCAP ベースの scaffold-free 石灰化構造体を作製する予備実験を行った。つまり、96 ウェルマルチウェルプレート上で SCAP ( $2 \times 10^5$ /well) を 3 日間前培養し、スフェロイドを形成させた。その後、象牙質形成条件下で 4 週間培養し、球状の石灰化構造体を作製した。各石灰化構造体のサイズ、形状、および石灰化度には違いが見られた（データ未提示）。石灰化構造体の中には、崩壊したものも観察された（データ未提示）。したがって、SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体を均質かつ安定的に作製するためには、まず、SCAP がスフェロイドを形成するための最適な条件を検討することが必要であることがわかった。

そこで、96 ウェルマルチウェルプレートの 1well 当たりの初期播種細胞数およびスフェロイドを形成するのに必要な培養期間を検討することとした。SCAP の初期播種細胞数として、1 well 当り  $1 \times 10^4$  個、 $5 \times 10^4$  個、 $1 \times 10^5$  個、 $2 \times 10^5$  個、 $3 \times 10^5$  個、 $4 \times 10^5$  個、 $5 \times 10^5$  個、 $1 \times 10^6$  個、スフェロイド形成培養期間として、1 日、2 日、3 日、7 日、14 日、21 日および 28 日とした。スフェロイドの中に

は、培養中に崩壊したものもあった。

予備試験の結果 (図 3-3-13) に基づくと、培養期間を通じてスフェロイドの大きさの変化量が少ないものの中で、最大の初期播種細胞数は、1 well 当り  $1 \times 10^5$  個であった。また、スフェロイドの大きさの変化量が少なくなる最低培養期間は、7 日間であった。したがって、SCAP ベースの scaffold-free スフェロイドを形成するための最適な初期播種細胞数およびスフェロイド形成培養期間を、1 well 当り  $1 \times 10^5$  個および 7 日間と決定した。

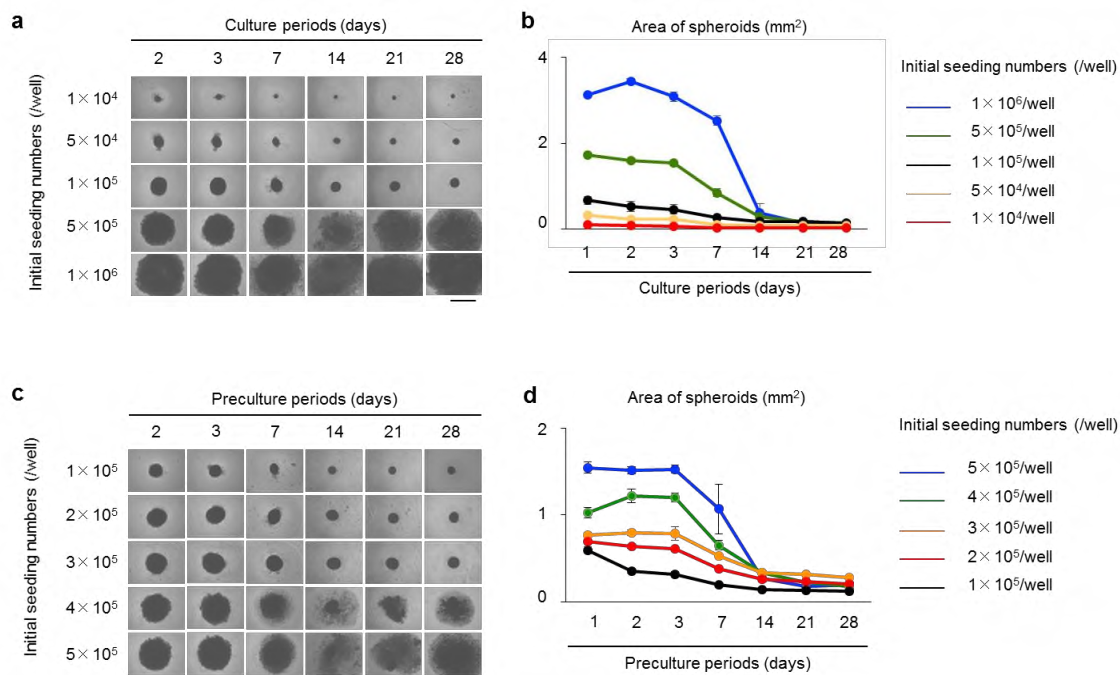


図 3-3-13. SCAP ベース scaffold-free スフェロイドの作製

SCAP の初期播種細胞数として、1well 当り  $1 \times 10^4$  個、 $5 \times 10^4$  個、 $1 \times 10^5$  個、 $2 \times 10^5$  個、 $3 \times 10^5$  個、 $4 \times 10^5$  個、 $5 \times 10^5$  個、 $1 \times 10^6$  個、スフェロイド形成培養期間として、1 日、2 日、3 日、7 日、14 日、21 日および 28 日とした。(a, c) SCAP ベース scaffold-free スフェロイドの顕微鏡画像。SCAP ベースのスフェロイドの代表的な顕微鏡画像。スフェロイドの中には、培養中に崩壊したものもあった。

(b, d) 顕微鏡画像の面積のスフェロイド領域の測定。バー = 1 mm。n = 5。グラフは平均値 ± 標準誤差で表す。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

予備実験で決定された至適条件 ( $1 \times 10^5$ /well、前培養 7 日) で SCAP ベース scaffold-free スフェロイドを作製した。その後、象牙質形成培地で 4 週間培養し、SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体を作製した。光学顕微鏡と実体顕微鏡およびマイクロ CT による観察で、SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体は、不均一な電子密度の物質を有する粗面球状構造を表した (図 3-3-14 a、b)。象牙質形成の誘導を行わなかったコントロール群では、X 線不透過物質は観察されなかった (データ未提示)。

RT-qPCR にて、SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体では、*RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* が発現していたが、コントロール群では発現していなかった (図 3-3-14 c)。

さらに、XRF 分析にて SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体でカルシウムが検出された ( $n=5$ 、平均含有量 20.8 重量%)。しかし、コントロール非誘導スフェロイドではカルシウムは検出されなかった ( $n=5$ 、平均値含有量 0 重量%)。脱落乳歯の平均カルシウム含量は 63.5 重量%であった。



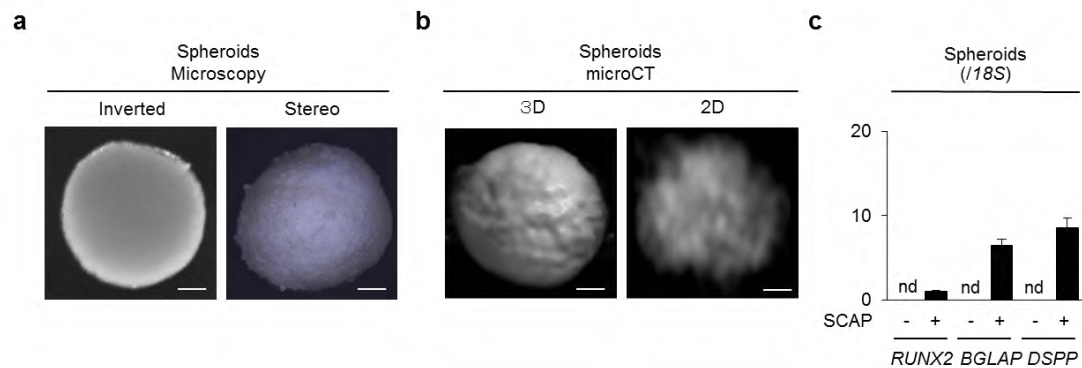


図 3-3-14. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体の特徴

初期播種細胞数 1 well 当り  $1 \times 10^5$  個、培養期間 7 日で、SCAP のスフェロイドを作製した。その後、象牙質形成培地で 4 週間培養した。(a, b) SCAP スフェロイドの倒立顕微鏡画像 (a の左パネル) および立体顕微鏡画像 (a の右パネル)。3D マイクロ CT 画像 (b の左パネル) およびマイクロ CT 断層画像 (2D、b の右パネル)。バー = 100  $\mu\text{m}$ 。(c) SCAP スフェロイドにおける *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* の発現。RT-qPCR 解析。結果は、18S リボソーム RNA (18S) の発現に対する割合の平均値  $\pm$  標準誤差で表示。黒色棒グラフ：象牙芽細胞分化誘導群。白色棒グラフ：コントロール分化未誘導群。nd、未検出。n = 5。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

### 3-3-6. LY294002 および rapamycin による前処理は、SCAP ベース scaffold-free

石灰化構造体の石灰化を促進する

SCAP ベース scaffold-free スフェロイドを LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin

(100 nM) で 3 日間前処理し、象牙質形成培地で 4 週間培養した。象牙質形成誘導後、SCAP ベース石灰化構造体を顕微鏡およびマイクロ CT で観察すると、前処理していないコントロール SCAP ベース石灰化構造体と比べて、その表面の粗さはわずかにスムーズなように観察された (図 3-3-15 a-e)。LY294002 および rapamycin で前処理した SCAP ベース石灰化構造体は、前処理していないコントロール SCAP ベース石灰化構造体よりも高い電子密度を示した (図 3-3-15 c-e)。また、rapamycin で前処理した SCAP ベース石灰化構造体は、LY294002 で前処理した SCAP ベース石灰化構造体よりも高い石灰化度を示した。

RT-qPCR 解析にて、象牙質形成誘導後、LY294002 および rapamycin で前処理した SCAP ベース石灰化構造体が、コントロール SCAP ベース石灰化構造体と比較して、*RUNX2* の発現がより低下し、*BGLAP* および *DSPP* の発現がより増加することを実証した (図 3-3-15 f)。rapamycin で前処理した SCAP ベース石灰化

構造体は、LY294002 で前処理した SCAP ベース石灰化構造体よりも、より低い *RUNX2* を発現し、より高い *BGLAP* および *DSPP* を発現した (図 3-3-15 c-f)。

XRF 解析にて、全ての SCAP ベース石灰化構造体群 (n = 5、平均値カルシウム含有量 : 非前処理 24.4、LY294002 前処理 39.3、rapamycin 前処理 51.4 重量%) においてカルシウムを示した。

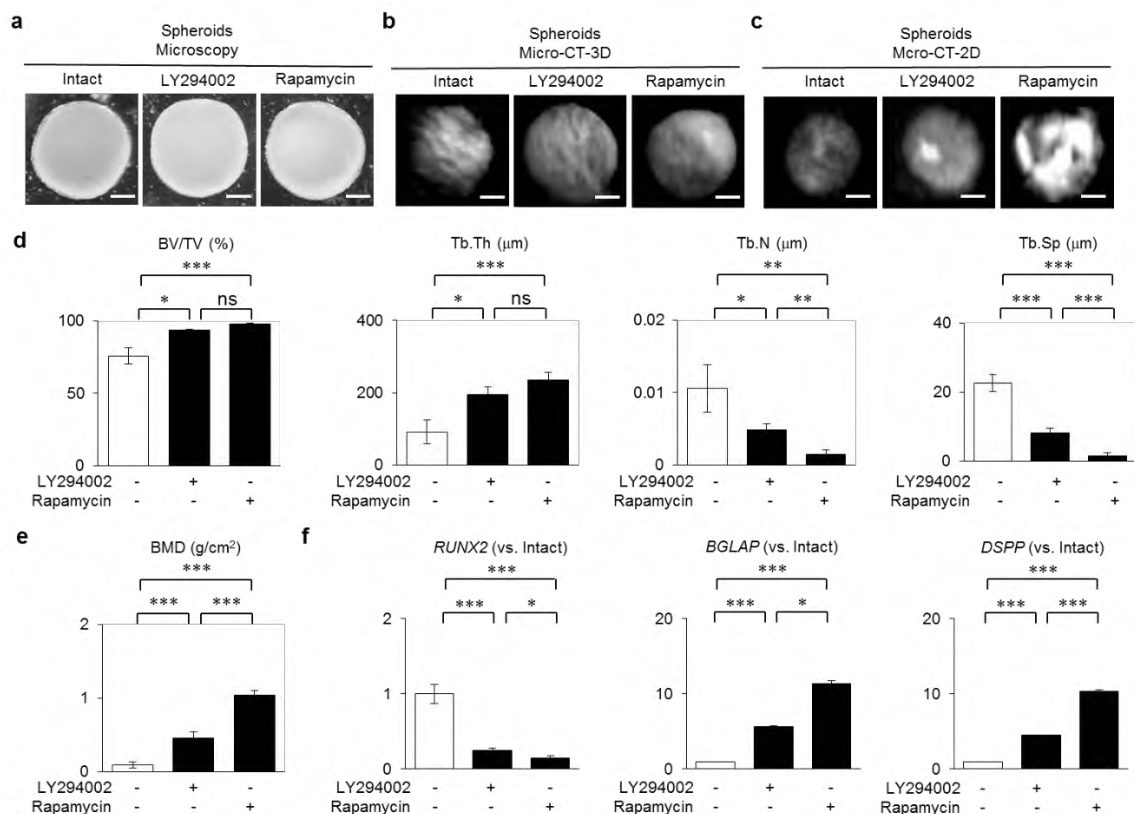


Figure 6

図 3-3-15. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体の *in vitro* 石灰化に対する LY294002 および rapamycin の影響

SCAP ベース scaffold-free スフェロイドを、LY294002 (50 $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) で 3 日間前処理し、象牙質形成培地で 4 週間培養し、石灰化構造体を作製した。(a) SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体の顕微鏡画像。(b) SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体のマイクロ CT-3D 画像。(c) SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体のマイクロ CT-2D 画像。(d, e) マイクロ CT 解析。骨のパラメータ解析。BV/TV、総体積 (TV) あたりの骨体積 (BV) の割合 ; Tb.Th、骨梁幅 ; Tb.N、骨梁数 ; Tb.Sp、骨梁間隔 (d)。骨密度 (BMD) (e)。(f) SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体における *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* の発現。RT-qPCR 解析。結果は、前処理を施していないコントロール SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体に対する百分率で表示。d-f : n = 5。\* P < 0.05、\*\* P < 0.01 および \*\*\* P < 0.005。グラフは平均値  $\pm$  標準誤差で表す。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)

### 3-3-7. LY294002 および rapamycin 前処理は、SCAP および SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体による顎骨欠損部の骨再生を促進する

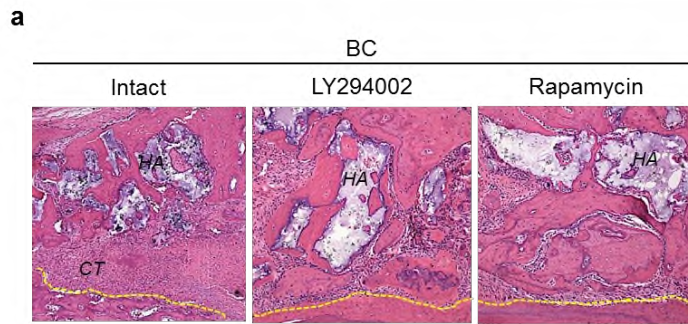
顎骨欠損モデルは、野生型 C57BL/6 マウスの左側上顎第一大臼歯の近心頬側根の周囲に形成した。SCAP および SCAP ベース scaffold-free スフェロイドを、LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) で3日間、前処理した。SCAP スフェロイドは、さらに象牙質形成誘導条件下で培養した。その後、DNase 処理し、オートクレーブ処理も行なった。SCAP は HA/TCP キャリアーとともに、SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体は単体で、マウスの顎骨欠損部に移植した。ともに移植後8週でサンプリングを行い、組織学的解析を行った。

LY294002 前処理 SCAP および rapamycin 前処理 SCAP を移植した骨欠損部は、前処理していないコントロール SCAP の移植と比較して、より多くの新生石灰化組織が形成される傾向が観察された (図 3-3-16 a、b)。rapamycin 前処理群の移植と LY294002 前処理群の移植の間では、顎骨欠損における新生石灰化組織の形成に差は認められなかった (図 3-3-16 a、b)。HA/TCP のみを移植したコントロール群では、少量の新生骨様石灰化組織が骨欠損部に形成された (データ未

提示)。ヒト・ミトコンドリア陽性細胞は、前処理の有無にかかわらず SCAP を移植した全ての骨腔内の新生骨様組織に沿って認められた（データ未提示）。多形核細胞およびマクロファージの浸潤を含む炎症性マーカーおよび線維性被包は、全ての移植部位で殆ど認められなかった（図 3-3-16 b）。

LY294002 前処理 SCAP 石灰化構造体および rapamycin 前処理 SCAP 石灰化構造体を移植した骨欠損部は、前処理していないコントロール SCAP 石灰化構造体移植よりも、新生骨様石灰化組織をより多く形成する傾向があった（図 3-3-16 c、d）。rapamycin 前処理群の移植と LY294002 前処理群の移植の間では、顎骨欠損における新生石灰化組織の形成に差は認められなかった（図 3-3-16 c、d）。

コントロール SCAP 石灰化構造体の単一移植でも、顎骨欠損における新生骨様石灰化組織の形成が認められたが（図 3-3-16 c）、何ら移植を行わなかったコントロール群では、新生骨様石灰化組織の形成は殆ど認められなかった（データ未提示）。ヒト・ミトコンドリア陽性細胞は、全ての移植組織で認められなかった（データ未提示）。多形核細胞およびマクロファージの浸潤を含む炎症性マーカーおよび線維性被包は、全ての移植部位で殆ど認められなかった（図 3-3-16 d）。

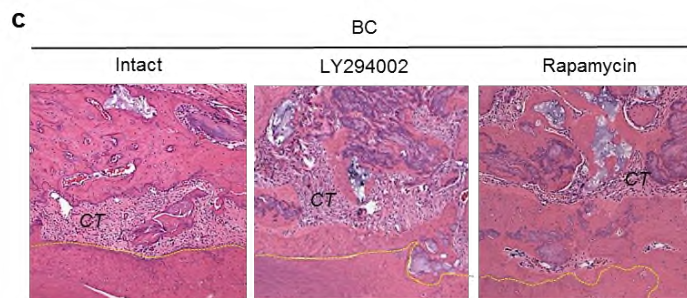


**b**

Histological findings

LY294002	-	+	-
Rapamycin	-	-	+
New Bone <sup>†</sup>	+	++	++
PMNs <sup>†</sup>	-	-	-
Macrophages <sup>†</sup>	-	-	-
Fibrous capsule <sup>§</sup>	-	-	-

†: +, moderate; ++, strong; -, none  
§: +, presence; -, absence



**d**

Histological findings

LY294002	-	+	-
Rapamycin	-	-	+
New Bone <sup>†</sup>	+	++	+++
PMNs <sup>†</sup>	-	-	-
Macrophages <sup>†</sup>	-	-	-
Fibrous capsule <sup>§</sup>	-	-	-

PMNs, polymorphonuclear leukocytes  
†: +, moderate; ++, strong; -, none  
§: +, presence; -, absence

図 3-3-16. 顎骨欠損モデルマウスにおける SCAP の *in vivo* 骨再生能力の解析  
図説は次頁に記載。

図 3-3-16. 顎骨欠損モデルマウスにおける SCAP の *in vivo* 骨再生能力の解析  
SCAP と SCAP ベース scaffold-free スフェロイドを、LY294002 (50  $\mu$ M) および rapamycin (100 nM) で前処理した。SCAP は HA/TCP キャリアー (HA) と共に、SCAP ベース scaffold-free スフェロイドは石灰化誘導を行った後、石灰化構造体単体をマウス顎骨欠損部に移植した。(a、c) 顎骨欠損部の組織学的解析。ヘマトキシリン・エオシン染色。CT：結合組織。SCAP 移植群 (a)。SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体移植群 (c)。黄色の点線：骨窩洞壁。(b、d) 顎骨欠損部の形態解析。SCAP 移植群 (b)。SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体移植群 (d)。(Tanaka et al., Stem Cell Res Ther, 2018 より改変)



### §3-4. 小括

実験 I から以下の事を明らかにした。

1. PI3K-AKT-mTOR シグナル経路が、SCAP の象牙芽細胞分化過程で負の調節機構として関与している。
2. PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の抑制により、SCAP の *in vitro* での象牙芽細胞分化が促進される。
3. PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の抑制により、SCAP による *in vivo* での象牙質形成が促進される。
4. SCAP のスフェロイドを作製するための至適初期細胞播種数および培養期間は、96 ウェルマルチウェルプレート 1well 当り、それぞれ  $1 \times 10^5$  個および 7 日間である。
5. scaffold-free で SCAP ベースの 3 次元石灰化構造体を作製できる（平均値カルシウム含有量 20.8 重量%）。
6. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体は、象牙芽細胞特異的遺伝子 *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* を発現する。
7. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体は、LY294002 および rapamycin の前

処理により、その石灰化が向上する。

8. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体は、顎骨欠損部における骨再生を誘導する。

9. SCAP または SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体による顎骨欠損部における骨再生は、LY294002 および rapamycin での前処理により促進する。

## §4. 研究Ⅱ

アセチルサリチル酸処理と AKT シグナル抑制  
が根尖乳頭組織由来の幹細胞の象牙芽細胞への  
分化を促進する

**Acetylsalicylic acid treatment and suppressive  
regulation of AKT accelerate odontogenic  
differentiation of stem cells from apical papilla**

#### §4-1. 目的

最近、MSCs の石灰化組織形成能力に対し、ASA（アセチルサリチル酸）の促進的効果が明らかとなっている [28]。しかし、これまでの研究では、SCAP の象牙質形成能力に及ぼす ASA の効果とそのメカニズムについては明らかとなっていない。

TGFβ/TBR が介在する非古典的シグナルが、DPSCs および SHED の維持ならびに象牙芽細胞分化に関与することが報告されている [9, 11, 12]。エピレグリン刺激下において、p38、ERK1/2 および AKT を含むシグナル経路が SCAP の細胞増殖を調節する事も報告されている [13]。しかしながら、SCAP の象牙芽細胞分化におけるこれらシグナル経路の役割についての研究は報告されていない。

研究Ⅱの目的は、まず、ASA が SCAP の象牙芽細胞分化と象牙質形成に及ぼす影響を調べることである。次に、ASA 刺激による SCAP の象牙芽細胞分化における p38、ERK1/2 および PI3K-AKT シグナル経路を理解することである。研究Ⅱでは、ASA を添加した象牙質形成培養液で SCAP を培養し、石灰化組織形

成レベルと象牙芽細胞分化度を *in vitro* および *in vivo* で検討を行った。さらに、p38、ERK1/2 および PI3K-AKT 等の細胞内シグナル分子について解析を行い、加えてそれらの特異的阻害剤ならびに siRNA の処理による、SCAP の象牙芽細胞分化に対する影響について検索を行った。

## §4-2. 材料と方法

### 4-2-1. ヒト永久歯サンプル

3-2-1 と同様の手続きを行い、ヒト永久歯サンプルを採取した。

### 4-2-2. マウス

3-2-2 と同様のマウス、プロトコールで実験を行った。

### 4-2-3. SCAP の単離と培養

3-2-3 と同様の手法で、SCAP の単離と培養を行った。

### 4-2-4. SCAP の特性

SCAP の特性解析は、3-2-4 の CFU-F 解析、3-2-5 のフローサイトメトリーによる表面抗原解析、そして 3-2-7 の多分化能試験と同様の手法で行い、以前の研究の特性基準 [1、39] に従って SCAP として決定した。

### 4-2-5. ASA 処理

ASA (Merck) を滅菌 PBS で希釈し、100 µg/mL で作用させた。ASA 処理のコントロールとして、ASA を含まない PBS 単独で処理した。

#### 4-2-6.F アクチン染色

SCAP (P3) は、tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC) 標識 phalloidin (Merck) で染色し、DAPI (Nacalai Tesque) で染色した。サンプルは、デジタルモノクロカメラ AxioCam 506 mono (Carl Zeiss Microscopy) と ApoTome.2 optical section system を装着した正立顕微鏡 Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy) で観察し、画像を撮影した。

#### 4-2-7. フローサイトメトリー解析

3-2-4 と同様の手法で行った。本フローサイトメトリー解析に使用した標的抗原特異的抗体は、表 3-1 に記載したものと同一の抗体を使用した。

#### 4-2-8. テロメラーゼ活性解析

テロメラーゼ活性は、テロメア反復増幅プロトコールに従って quantitative

telomerase detection kit (Allied Biotech, Ijamsville, MD) を用いて測定した [30]。

HEK293T 細胞をポジティブコントロールとして用いた。各サンプルの一部を 85°C で 10 分間処理し、ネガティブコントロールとした。蛍光ユニットの平均初期量を用いてサンプル間のテロメラーゼ活性を比較した。

#### 4-2-9. 多分化能試験

3-2-7 と同様の手法で、SCAP の多分化能試験を行った。

#### 4-2-10. RT-qPCR 解析

3-2-13 と同様の手法で、RT-qPCR 解析を行った。本研究に用いた全ての標的 TaqMan プローブは、Applied Biosystems より購入し、表 4-1 に列挙した。



表 4-1 : RT-qPCR 用 TaqMan Probe リスト

<b>Name</b>	<b>Gene assay ID Number</b>
<i>BGLAP</i>	Hs01587814_g1
<i>COL10A1</i>	Hs00166657_m1
<i>DSPP</i>	Hs00171962_m1
<i>LPL</i>	Hs00173425_m1
<i>PPARG</i>	Hs0115513_m1
<i>RUNX2</i>	Hs00231692_m1
<i>SOX9</i>	Hs01001343_g1
Ribosomal RNA, 18S	Hs99999901_s1

*BGLAP*: bone gamma-carboxyglutamate protein

*COL10A1*: collagen type X alpha 1 chain

*DSPP*: dentin sialophosphoprotein

*LPL*: lipoprotein lipase

*PPARG*: peroxisome proliferator-activated receptor gamma

*RUNX2*: runt related transcription factor 2

*SOX9*: SPY-box 9

#### 4-2-11. ウェスタンブロット解析

3-2-14 と同様の手法で、ウェスタンブロット解析を行った。本研究に用いた全ての抗体は表 4-2 に列挙した。

表 4-2 : ウェスタンブロット及び免疫蛍光解析用抗体リスト

<b>Name</b>	<b>Host/Isotype</b>	<b>Supplier</b>
anti-ACTB	mouse IgG <sub>1</sub>	Merck (Kenilworth, NJ)
anti-AKT	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-AKT, phosphorylated	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-BGLAP	rabbit IgG	LifeSapn BioScience (Seattle, WA)
anti-DSPP	mouse IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)
anti-ERK1/2	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-ERK1/2, phosphorylated	mouse IgG <sub>1</sub>	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-mitochondria, human	mouse IgG <sub>1</sub>	Merck (Kenilworth, NJ)
anti-mTOR	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-mTOR, phosphorylated	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-p38	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-p38, phosphorylated	rabbit IgG	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
anti-RUNX2	rabbit IgG	Abcam (Cambridge, England)

ACTB: actin,  $\beta$

BGLAP: bone gamma-carboxyglutamate acid protein

DSPP: dentin sialophosphoprotein

ERK: extracellular signal-regulated kinases

mTOR: mammalian target of rapamycin

RUNX2: runt-related transcription factor 2

#### **4-2-12. AKT-siRNA および LY294002 による前処理**

**3-2-8** と同様の手法で、AKT-siRNA (20nM; Santa Cruz Biotechnology) および LY294002 (50  $\mu$ M、Wako) による前処理を行った。

#### **4-2-13. in vivo 象牙質再生解析**

**3-2-9** と同様の手法で解析を行った。

#### **4-2-14.組織学的解析**

**3-2-15** と同様の手法で解析を行った。

#### **4-2-15.免疫蛍光解析**

**3-2-15** と同様の手法で解析を行った。

#### **4-2-16.統計解析**

**3-2-17** と同様の手法で解析を行った。

## § 4-3. 結果

### 4-3-1. ASA は SCAP の *in vitro* 象牙芽細胞分化を促進する

ヒト永久歯の未完成歯根の根尖乳頭組織から酵素処理により単離された細胞集団の中には、プラスチック製培養ディッシュ上に、紡錘形を呈し、付着する細胞がクラスターを形成した細胞集団が存在していた (図 4-3-1)。その付着性細胞コロニーの大きさと細胞密度にコロニー間で差が認められた (図 4-3-1)。

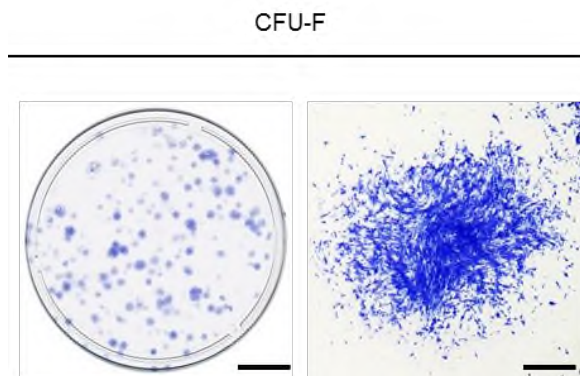


図 4-3-1. SCAP のコロニー形成能

付着コロニー形成解析。トルイジンブルー染色。付着コロニー像。バー=20 mm。形成したコロニーはそのサイズおよび密度に差を有していた (左パネル) プラスチック製培養ディッシュ上に形成された線維芽細胞からなる colony forming unit-fibroblasts (CFU-F) の画像。バー=2 mm (右パネル)。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

これら付着コロニー形成細胞は、MSCs としての表面抗原プロファイルを有し、象牙芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞へ分化する多分化能を備えていることから（後述）、MSCs の最低基準および SCAP としての特性の基準 [1] と照合した結果、今回単離した付着性コロニー形成細胞を SCAP として同定した。

SCAP の細胞形態、免疫表現型およびテロメラーゼ活性に対する ASA の効果を試験した。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ASA で 3 日間処理した P3 の SCAP を解析に用いた。ASA は、SCAP の細胞形態や F-アクチン分布には効果を示さなかった（図 4-3-2）。

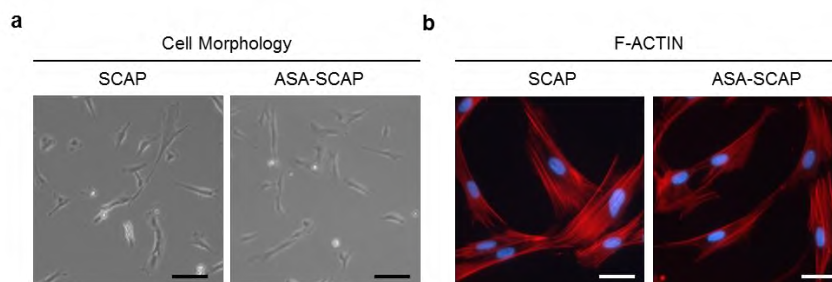


図 4-3-2. アセチルサリチル酸 acetylsalicylic acid (ASA) が SCAP の細胞形態に及ぼす影響

SCAP を ASA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で 3 日間処理した。(a) ASA 処理 SCAP (ASA-SCAP) およびコントロール SCAP の顕微鏡画像。バー=100  $\mu\text{m}$ 。(b) ASA-SCAP およびコントロール SCAP を、それぞれ TRITC 標識 phalloidin および DAPI で染色して、F-ACTIN および核をそれぞれ検出した。バー=30  $\mu\text{m}$ 。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

ASA-SCAP は、CD146、CD105、CD73、CD90、CD24、CD44 および CD29 に陽性を示し、CD34、CD45 および CD14 に陰性であった (図 4-3-3 a)。興味深いことに、ASA-SCAP は、コントロール SCAP と比較して CD146 および CD24 の発現が著しく増強されていた (図 4-3-3 b)。

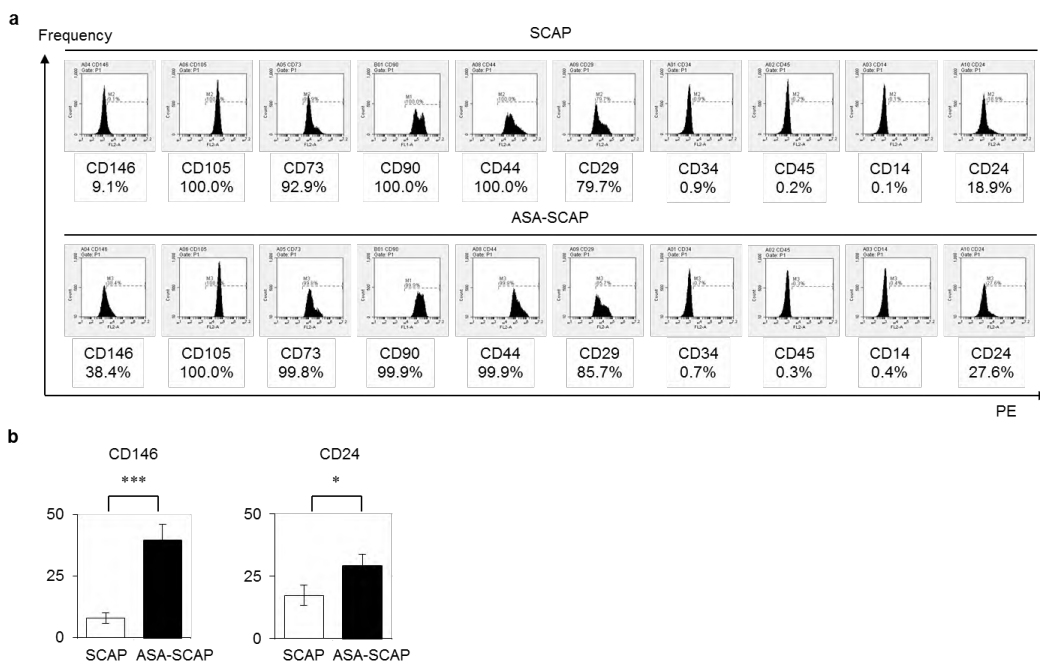


図 4-3-3. SCAP の免疫表現型に対する ASA の影響

SCAP を、ASA (100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) で 3 日間処理した。フローサイトメトリー解析。

(a) SCAP および ASA-SCAP の免疫表現型。ヒストグラム。数字は各抗原の陽性率の平均値を示す。R-PE : フィコエリトリン。(b) CD146 および CD24 の発現グラフ。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

テロメラーゼ活性試験にて、ASA (100 µg/mL) 刺激が、SCAP のテロメラーゼ活性を有意に増加させた (図 4-3-4)。HEK293T 細胞は、非常に高いテロメラーゼ活性を示したが、その熱不活化サンプルはその活性を失っていた (図 4-3-4)。

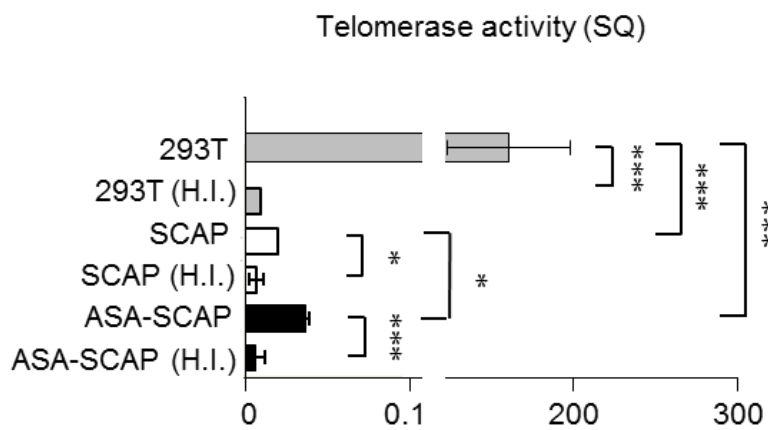


図 4-3-4. SCAP のテロメラーゼ活性に対する ASA の影響

SCAP を、ASA (100 µg/mL) で 3 日間処理した。テロメラーゼ活性解析。H.I.、熱不活性化群；SQ、標準量；293T、HEK293T 細胞。n=3。\* P<0.05、\*\*\* P<0.005。結果は平均値±標準誤差で表示。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

SCAP を、ASA (100  $\mu$  g/mL) 刺激下にて脂肪細胞分化培地および軟骨細胞分化培地でそれぞれ 4 週間と 6 週間培養した。脂肪細胞および軟骨細胞への分化度は、*PPARG*、*LPL*、*SOX9*、および *COL10A* を含む脂肪細胞および軟骨細胞特異的遺伝子の発現を RT-qPCR 法で、オイルレッド-O およびサフラニン-O の特異的染色で解析した。解析の結果、100  $\mu$  g/mL ASA 刺激は、SCAP の脂肪細胞分化および軟骨細胞分化に対し、何ら影響を与えなかった (図 4-3-5)。



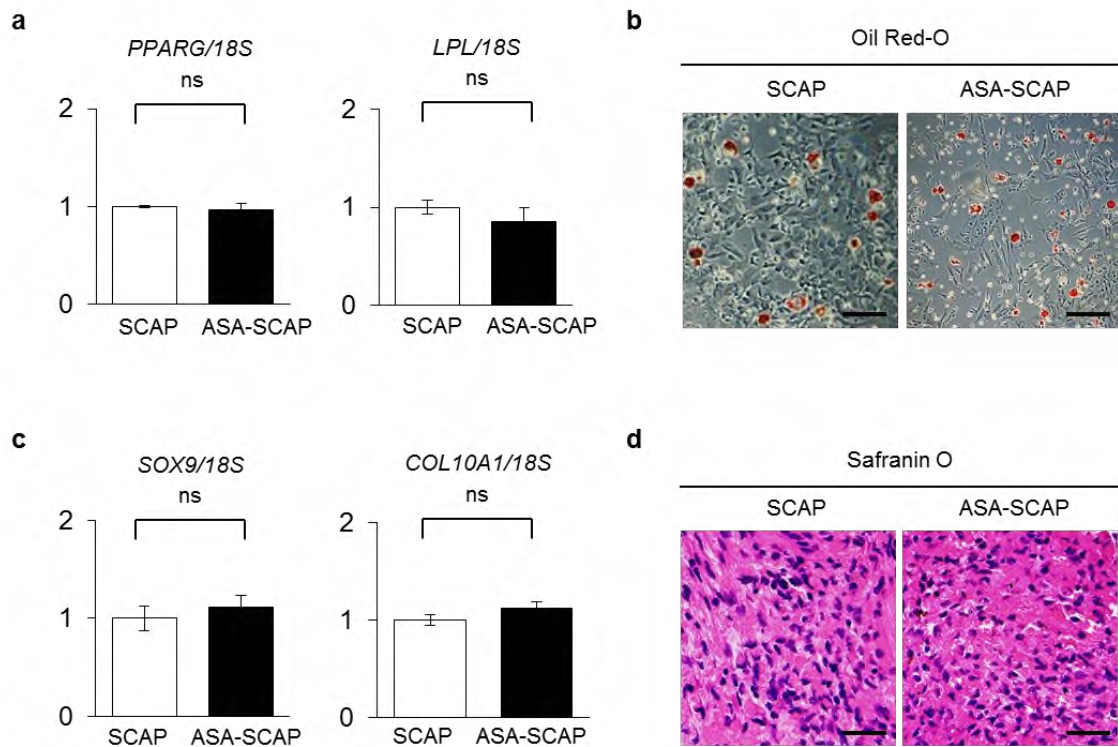


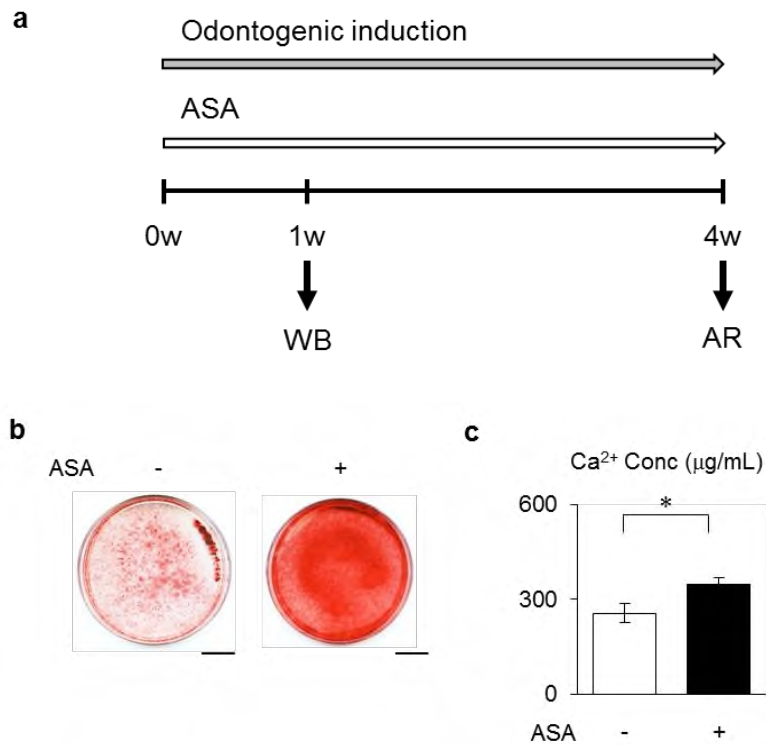
図 4-3-5. SCAP の脂肪細胞分化および軟骨細胞分化に対する ASA の影響

SCAP を、ASA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激下で、脂肪細胞分化培地 (a、b) および軟骨細胞分化培地 (c、d) でそれぞれ 4 週間と 6 週間培養した。(a、c) SCAP における脂肪細胞および軟骨細胞マーカー遺伝子の発現。RT-qPCR 解析。n = 5。ns : 有意差無し。結果は、18S リボソーム RNA (18S) の発現に対する割合の平均値  $\pm$  標準誤差で表示。黒色棒グラフ : ASA-SCAP の脂肪細胞分化誘導群 (a) および軟骨細胞分化誘導群 (c)。白色棒グラフ : コントロール SCAP の脂肪細胞分化誘導群 (a) および軟骨細胞分化誘導群 (c)。(b) オイルレッド-O 染色像。バー = 200  $\mu\text{m}$  (d) サフランニン-O 染色像。バー = 100  $\mu\text{m}$ 。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

SCAP を、ASA (100  $\mu$ g/mL) 刺激下にて象牙芽細胞分化培地で 1 週間または 4 週間培養した (図 4-3-6 a)。

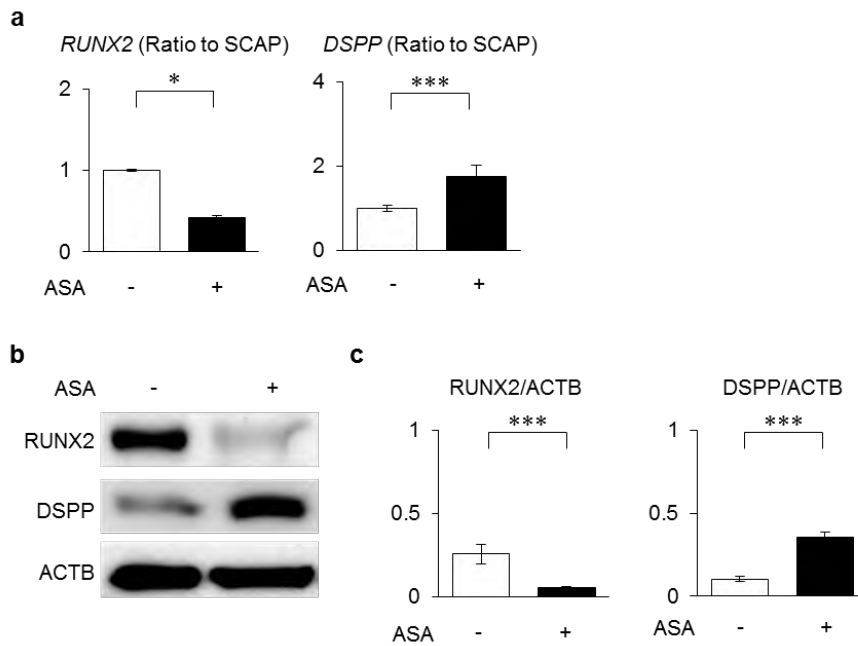
象牙芽細胞分化 4 週後、アリザリンレッド-S 染色法を施した。100  $\mu$ g/mL ASA 刺激が、SCAP による石灰化組織形成を促進した (図 4-3-6 b、c)。

RT-qPCR 法およびウェスタンブロット法にて、象牙芽細胞分化 1 週後の SCAP において、100  $\mu$ g/mL ASA が、象牙芽細胞への分化において重要な転写因子である *RUNX2* の遺伝子およびタンパク質の発現を有意に抑制し、象牙質特異的基質である *DSPP* の遺伝子およびタンパク質の発現を著しく増加させた (図 4-3-7)。



**図 4-3-6. SCAP の象牙芽細胞分化に対する ASA の影響 1**

(a) ASA 処理と象牙芽細胞分化のスキーム。SCAP を、ASA (100 µg / mL) 刺激下で、象牙芽細胞分化培地で培養した。サンプルは、象牙芽細胞分化誘導後 1 週間および 4 週後に回収し、それぞれ、RT-qPCR 法/ウェスタンブロット法 (WB)、アリザリンレッド-S 染色法 (AR) で解析した。(b、c) 象牙芽細胞分化培養 4 週後のアリザリンレッド-S 染色。アリザリンレッド-S 染色の画像。バー= 20 mm (b)。カルシウム含有解析。n = 5。\* P <0.05、結果は、平均±標準誤差で表示 (c)。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)



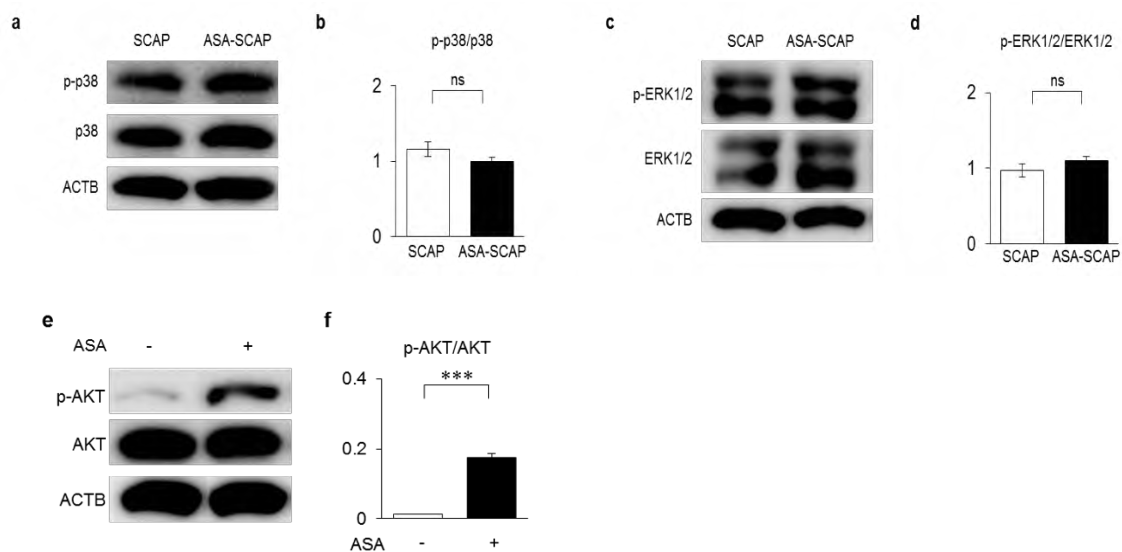
#### 図 4-3-7. SCAP の象牙芽細胞分化に対する ASA の影響 2

SCAP を、ASA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激下で、象牙芽細胞分化培地で 1 週間培養した。

(a) 象牙芽細胞特異的遺伝子 *RUNX2* および *DSPP* の発現。RT-qPCR 解析。結果は、コントロール SCAP に対する相対値で表示。(b、c) 象牙芽細胞特異的タンパク質 *RUNX2* および *DSPP* の発現。ウェスタンブロット像 (b)。ACTB に対する相対的発現 (c)。a、c : n=5。\* P<0.05、\*\*\* P<0.005。結果は、平均値±標準誤差で表す。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

#### 4-3-2. ASA は、SCAP の *in vitro* 象牙芽細胞への分化過程において、AKT のリン酸化を促進する

次に、象牙芽細胞へ分化誘導中の SCAP における p38、ERK1/2 および AKT の発現ならびにそれらのリン酸化に対する ASA の効果をウェスタンブロット法にて解析した。象牙芽細胞分化誘導 1 週後、100  $\mu$ g/mL ASA 刺激下の SCAP では、ASA で刺激していないコントロール SCAP と比較して、p38 および ERK 1/2 の発現ならびにそれらのリン酸化に対して、何ら影響は認められなかった (図 4-3-8 a-d)。一方、100  $\mu$ g/mL ASA 刺激は、AKT の発現には変化を生じさせなかったが、AKT のリン酸化を著しく促進することが明らかとなった (図 4-3-8 e、f)。これらの所見は、ASA により活性化された AKT 経路が SCAP の象牙芽細胞分化に関与する可能性を示唆した。



**図 4-3-8. SCAP の象牙芽細胞分化過程における細胞内シグナル分子 p38、ERK1/2 および AKT の発現とそれらのリン酸化に対する ASA の影響**

SCAP を、ASA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激下で、象牙芽細胞分化培地で 1 週間培養した。ウェスタンブロット解析。(a-f) p38 およびリン酸化 p-38 (p-p38) (a, b)、ERK1/2 およびリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) (c, d)、AKT およびリン酸化 AKT (p-AKT) (e, f) の発現。ウェスタンブロット像 (a, c, e)。ACTB に対する相対的発現。n=5。ns : 有意差無し。結果は平均 $\pm$ 標準誤差で表示 (b, d, f)。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

### 4-3-3. ASA 刺激で促進される SCAP の *in vitro* 象牙芽細胞分化は、PI3K-AKT シグナル経路の前抑制によりさらに加速する

次に、ASA 刺激により促進される SCAP の象牙芽細胞分化過程における PI3K-AKT シグナル経路の役割を調べた。まず、象牙芽細胞分化を誘導する前 3 日間、SCAP を LY294002 (50  $\mu$ M) および AKT-siRNA (20nM) で前処理した (図 4-3-9)。

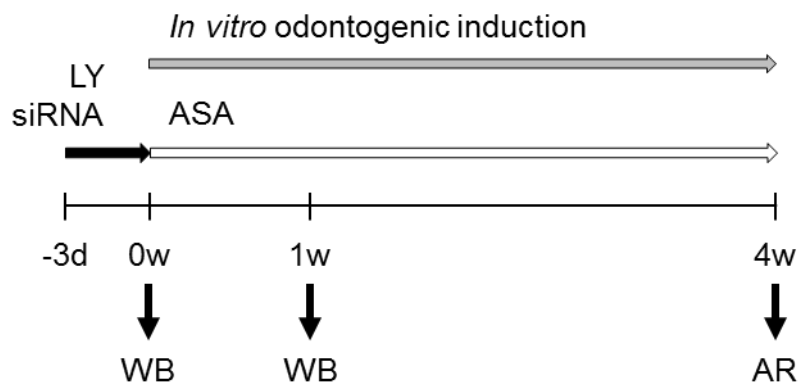


図 4-3-9. LY294002 (LY) および AKT-siRNA (siRNA) の前処理と ASA 刺激下における SCAP の象牙芽細胞分化のスキーム

SCAP を LY294002 (50  $\mu$ M) および AKT-siRNA (20 nM) で 3 日間前処理を行った。その後、ASA (100  $\mu$ g/mL) の存在下で、象牙芽細胞分化培地で培養した。サンプルは、前処理から 3 日後、象牙芽細胞分化誘導後 1 週および 4 週で回収し、それぞれ、RT-qPCR 法/ウェスタンブロット法 (WB)、アリザリンレッド-S 染色法 (AR) で解析した。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

次に、前処理による AKT の発現とリン酸化への影響をウェスタンブロット法にて解析した。LY294002 (50 $\mu$ M) の前処理は、SCAP における AKT のリン酸化を著しく抑制していた (図 4-3-10 a、b)。また、AKT-siRNA (20nM) の前処理は、AKT の発現を効果的に抑制していた (図 4-3-10 c、d)。従って、LY294002 (50 $\mu$ M) および AKT-siRNA (20nM) による 3 日間の前処理は、SCAP における PI3K-AKT シグナル経路を十分に抑制する効果を発揮することが分かった。

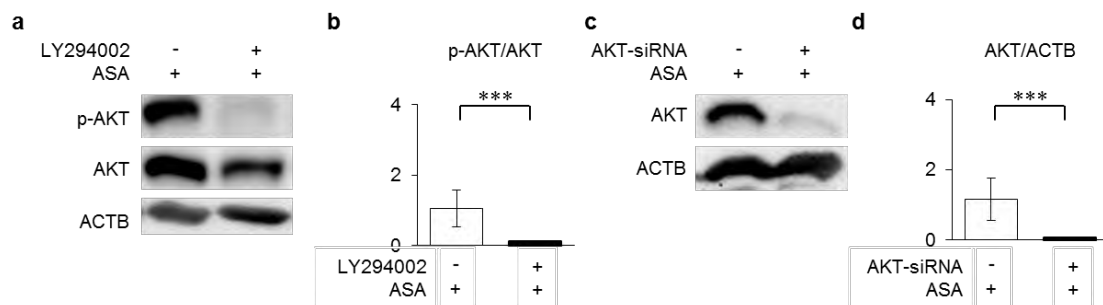


図 4-3-10. SCAP における LY294002 (LY) および AKT-siRNA (siRNA) 前処理の効果

(a-d) SCAP を LY294002 (50 $\mu$ M) (a、b) および AKT-siRNA (20 nM) (c、d) で 3 日間前処理を行った。AKT および p-AKT の発現をウェスタンブロット法で解析した。ウェスタンブロット像 (a、c)。AKT の相対的リン酸化 (b)。AKT の相対的発現 (d)。b、d : n = 5。\*\*\* P < 0.005。結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表示。

(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)



そこで、PI3K-AKT シグナル経路が十分に抑制された SCAP を、ASA (100 µg / mL) の存在下で、象牙芽細胞分化培地で培養した。象牙芽細胞分化 4 週間において、アリザリンレッド-S で染色すると、LY294002 前処理 SCAP 群 (図 4-3-11 a、b) または AKT-siRNA 前処理 SCAP 群 (図 4-3-11 e、f) は、前処理していないコントロール SCAP 群と比較して、ASA により促進された *in vitro* 石灰化結節形成能力が有意に増強した。

次に、象牙芽細胞分化 1 週間における、象牙芽細胞特異的タンパク質の発現をウェスタンブロット法にて解析した。LY294002 前処理 SCAP 群 (図 4-3-11 c、d) または AKT-siRNA 前処理 SCAP 群 (図 4-3-11 g、h) は、ASA により誘導された *RUNX2* の発現抑制および *DSPP* の発現促進が著しく増強した。

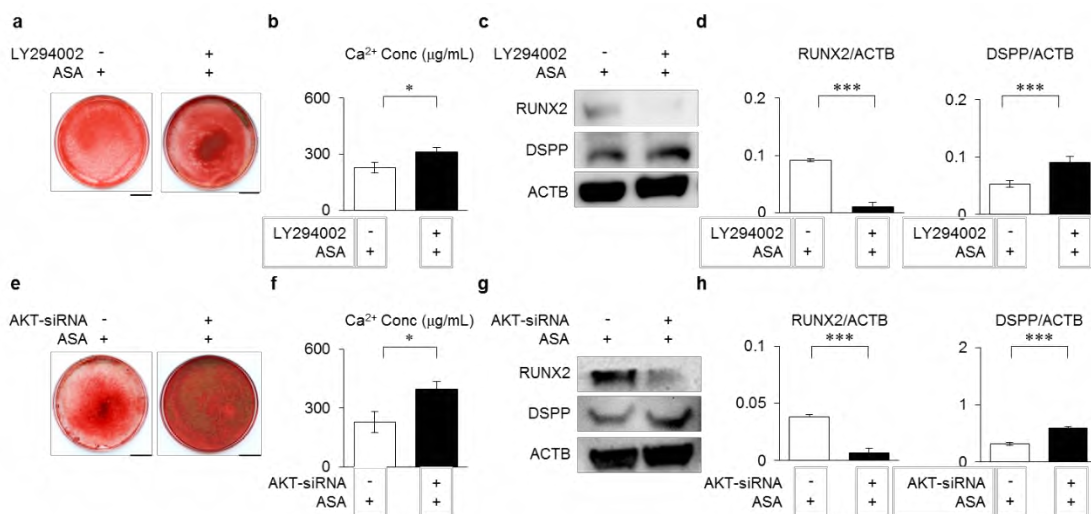


Figure 3

**図 4-3-11. ASA 刺激下での SCAP の象牙芽細胞分化に対する LY294002 および AKT-siRNA による前処理の効果 1**

SCAP は、予め 3 日間 LY294002 (50 μM) (a-d) および AKT-siRNA (20 nM) (e-h) で処理された。その後、ASA (100 μg/mL) の存在下で、象牙芽細胞分化培地で培養した。(a、b、e、f) 象牙芽細胞分化培養 4 週後での Alizarin Red-S 染色法による石灰化結節形成の解析。アリザリンレッド-S 染色像。バー = 20 mm (a、e)。カルシウム含有解析 (b、f)。(c、d、g、h) 象牙芽細胞分化培養 1 週後でのウェスタンブロット法による *RUNX2* および *DSPP* の発現。ウェスタンブロット像 (c、g)。ACTB に対する *RUNX2* および *DSPP* の相対的発現 (d、h)。b、d、f、h : n = 5。\* P < 0.05、\*\*\* P < 0.005。結果は、平均値 ± 標準誤差で表示。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

さらに、象牙芽細胞分化 1 週後における、象牙芽細胞特異的遺伝子の発現を RT-qPCR 法にて解析した。LY294002 前処理 SCAP 群 (図 4-3-12 a、b) または AKT-siRNA 前処理 SCAP 群 (図 4-3-12 c、d) は、非前処理群と比較して、ASA により誘導された RUNX2 発現の抑制がさらに抑制され、また ASA により誘導された DSPP 発現の促進がさらに促進した結果となった。この結果は、ウェスタンブロット法による LY294002 および AKT-siRNA の前処理による象牙芽細胞特異的タンパク質の発現変化 (図 4-3-11 c、d、g、h) と一致するものであった。

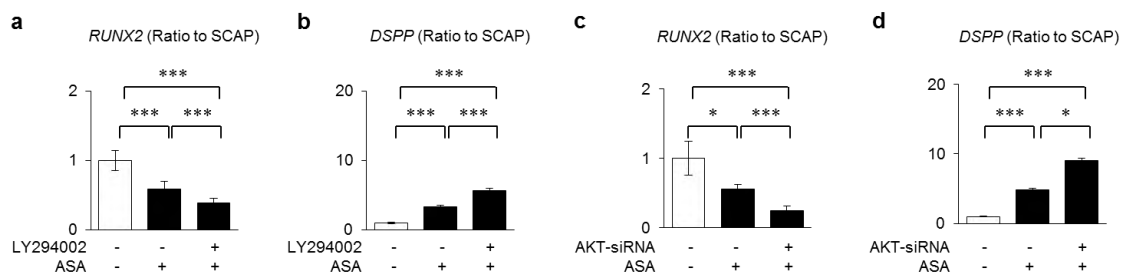
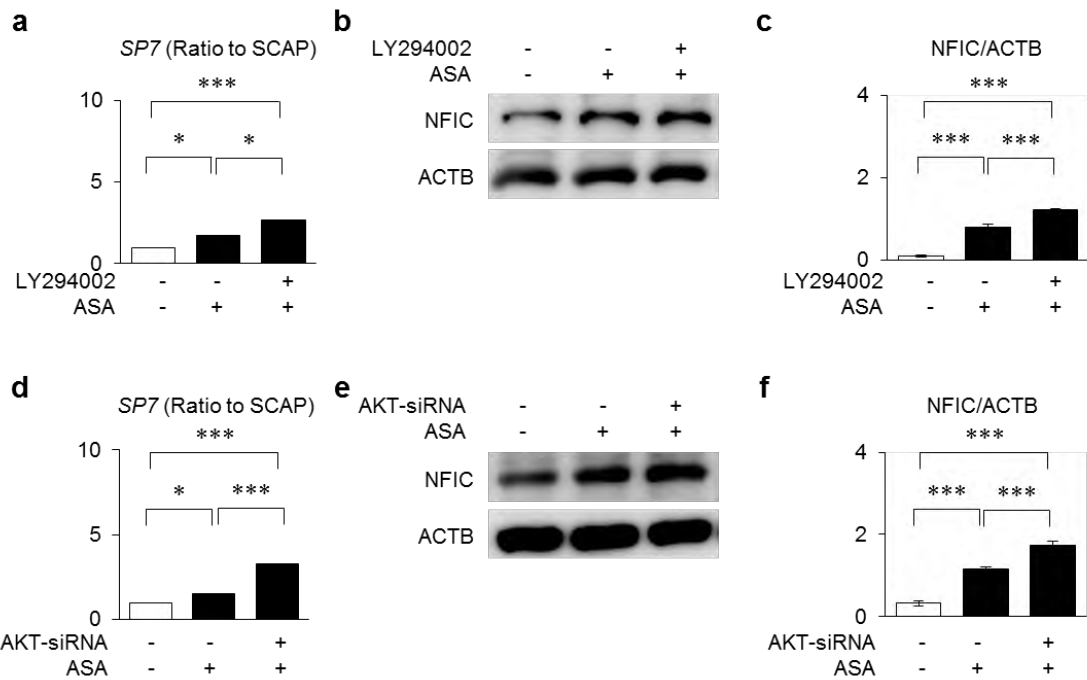


図 4-3-12. ASA 刺激下での SCAP の象牙芽細胞分化に対する LY294002 および AKT-siRNA による前処理の効果 2

SCAP は、予め 3 日間 LY294002 (50  $\mu$ M) (a、b) および AKT-siRNA (20 nM) (c、d) で処理された。その後、ASA (100  $\mu$ g/mL) の存在下で、象牙芽細胞分化培地で培養した。象牙芽細胞分化培養 1 週後での RT-qPCR 法による RUNX2 (a、c) および DSPP (b、d) の発現。コントロール SCAP に対する相対発現。a-d : n = 5。\* P < 0.05、\*\*\* P < 0.005。結果は、平均値  $\pm$  標準誤差で表示。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

以上の結果から、象牙芽細胞分化過程において、象牙芽細胞分化特異的分子である *RUNX2* と *DSPP* の遺伝子ならびにタンパク質の発現が、*ASA* の刺激によってそれぞれ抑制と促進を受けることから、それらの発現の制御に関連する *SP7* および *NFIC* の発現を解析することとした。

象牙芽細胞分化 1 週間後における RT-qPCR 法およびウェスタンブロット法による解析にて、*ASA-SCAP* では、*SP7* および *NFIC* の発現が顕著に増加していた (図 4-3-13 a-c)。また、*LY294002* および *AKT-siRNA* 前処理は、*ASA-SCAP* において、コントロール *SCAP* と比較して *SP7* および *NFIC* の発現をさらに増強させた (図 4-3-13 d-f)。



**図 4-3-13. SCAP の象牙芽細胞分化過程における SP7 および NFIC の発現に対する ASA 刺激ならびに LY294002 および AKT-siRNA による前処理の影響**

SCAP は、予め 3 日間 LY294002 (50  $\mu$ M) (a-c) および AKT-siRNA (20 nM) (d-f) で処理された。その後、ASA (100  $\mu$ g / mL) の存在下で、象牙芽細胞分化培地で培養した。(a, d) 象牙芽細胞分化培養 1 週間後の RT-qPCR 法による SP7 の発現。コントロール SCAP に対する相対発現。(b, c, e, f) 象牙芽細胞分化培養 1 週間後のウェスタンブロット法による NFIC の発現。ウェスタンブロット像 (b, e)。ACTB に対する相対発現 (c, f)。a, c, d, f : n = 5。\* P < 0.05、\*\*\* P < 0.005。結果は、平均  $\pm$  標準誤差で表示。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

#### 4-3-4. SCAP の *in vivo* 象牙質形成に及ぼす ASA の影響

次に、生体内での SCAP による象牙質形成に対する ASA の効果を確認するために、SCAP の移植実験を行った。また、生体内での SCAP による象牙質形成に対する PI3K-AKT シグナル抑制の影響も調べた。つまり、SCAP ( $4 \times 10^6$ ) に ASA (100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) を添加し、HA/TCP キャリアー (40 mg) と混合した。この混合物を免疫不全マウスの皮下に移植した (図 4-3-14)。

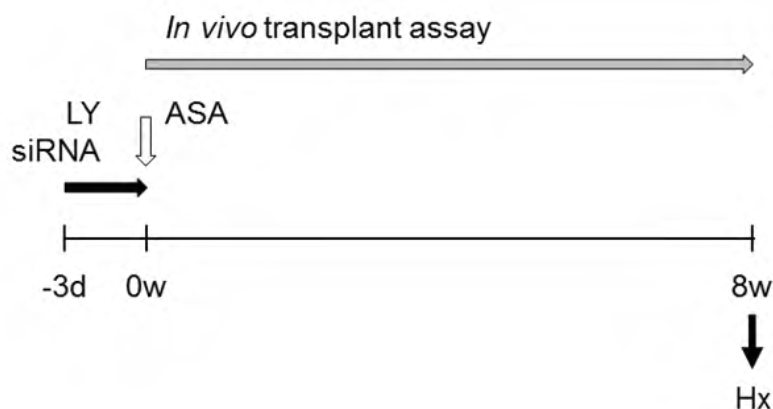


図 4-3-14. *In vivo* 移植解析のスキーム

SCAP を、予め 3 日間 LY294002 (50  $\mu\text{M}$ ) および AKT-siRNA (20 nM) で処理した。その後 SCAP ( $4 \times 10^6$ ) を、ASA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と HA/TCP (40 mg) と混合し、免疫不全マウスの皮下に移植した。移植 8 週後、移植組織を採取し、組織学的解析 (Hx) と遺伝子発現解析を行った。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

移植 8 週後、移植体の組織学的解析を行った。ASA-SCAP 移植組織ならびにコントロール SCAP 移植組織では、後述するヒト *DSPP* の発現が認められたことから、象牙質様石灰化構造体が新たに形成されたと考えられた (図 4-3-15 a)。

コントロール SCAP 移植組織と比較して、ASA-SCAP 移植組織では、新生した石灰化組織がより多く形成されていた (図 4-3-15 a、b)。コントロール SCAP 移植組織では、新生石灰化基質内に細胞様の封入体は全く認められなかったが、ASA-SCAP 移植組織の新規形成石灰化基質では、細胞様封入体が観察される場合もあった (図 4-3-15 a)。これは、石灰化組織が迅速かつ豊富に形成されたことを示唆し、歯内治療の臨床で認められる骨様象牙質が形成されていた可能性が考えられた[44]。

移植 8 週後の移植体を免疫蛍光染色法により解析した。コントロール SCAP 移植組織 (データ未提示) [1]および ASA-SCAP 移植組織 (図 4-3-15 c) の移植体内に形成された石灰化基質に沿って局在する細胞に、ヒト・ミトコンドリア陽性細胞およびヒト *DSPP* 陽性細胞が認められた。

移植 8 週後の移植体を RT-qPCR 法により解析した。ASA-SCAP 移植組織およびコントロール SCAP 移植組織ともに、*RUNX2* および *DSPP* が発現していた (図 4-3-16)。コントロール SCAP 移植組織と比較して ASA-SCAP 移植組織では、*RUNX2* の発現が抑制され、*DSPP* の発現が増加していた (図 4-3-16)。

次に、ASA-SCAP における PI3K-AKT シグナル経路が、移植組織の石灰化組織形成に与える影響を検索した。SCAP に、LY294002 (50  $\mu$ M) および AKT-siRNA (20nM) による前処理を 3 日間施した (図 4-3-14)。その後、前述と同じ方法で皮下移植を行った。

移植 8 週後、移植体の組織学的解析を行った。LY294002 (50  $\mu$ M) および AKT-siRNA (20 nM) 前処理を行った ASA-SCAP 移植組織では、未処理 ASA-SCAP 移植組織と比較して、新生した象牙質様石灰化組織がより多く形成されていた (図 4-3-15 a、b)。また、その石灰化基質内には、細胞様封入体も多く観察された (図 4-3-15 a)。AKT-siRNA 前処理群は、LY294002 前処理群と比較して、新規石灰化基質を有意に多く形成した (図 4-3-15 a、b)。



移植 8 週後の移植体を免疫蛍光染色法により解析した。AKT-siRNA 前処理群および LY294002 前処理群ともに、その移植体内に形成された石灰化基質に沿って局在する細胞が、ヒト・ミトコンドリア陽性およびヒト *DSPP* 陽性を示した（データ未提示）。

移植 8 週後の移植体を RT-qPCR 法により解析すると、LY294002 および AKT-siRNA 前処理は、ASA-SCAP 移植組織における *RUNX2* の発現をより抑制し、*DSPP* の発現をより増大させた（図 4-3-16）。AKT-siRNA 前処理群は、LY294002 前処理群と比較して、この両者の遺伝子変化がより大きく認められた（図 4-3-16）。

HA/TCP 単独のコントロール移植組織では、石灰化組織形成、*RUNX2* および *DSPP* の発現は検出されなかった（データ未提示）。

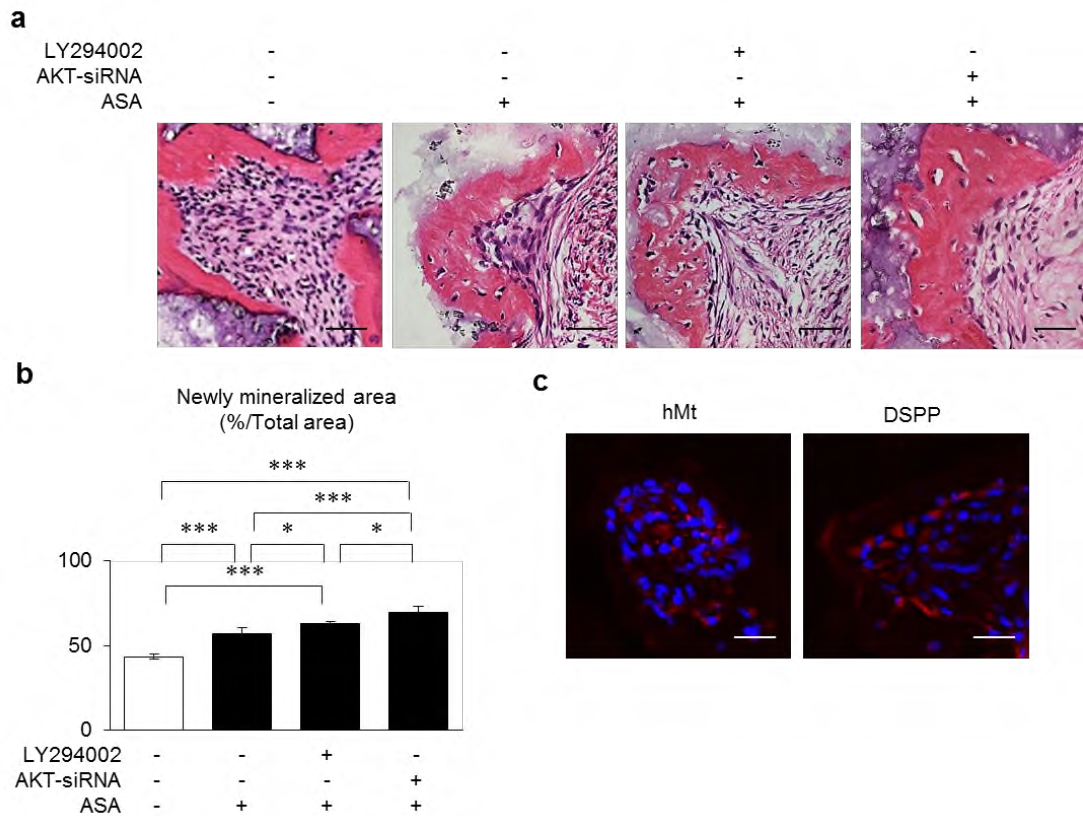
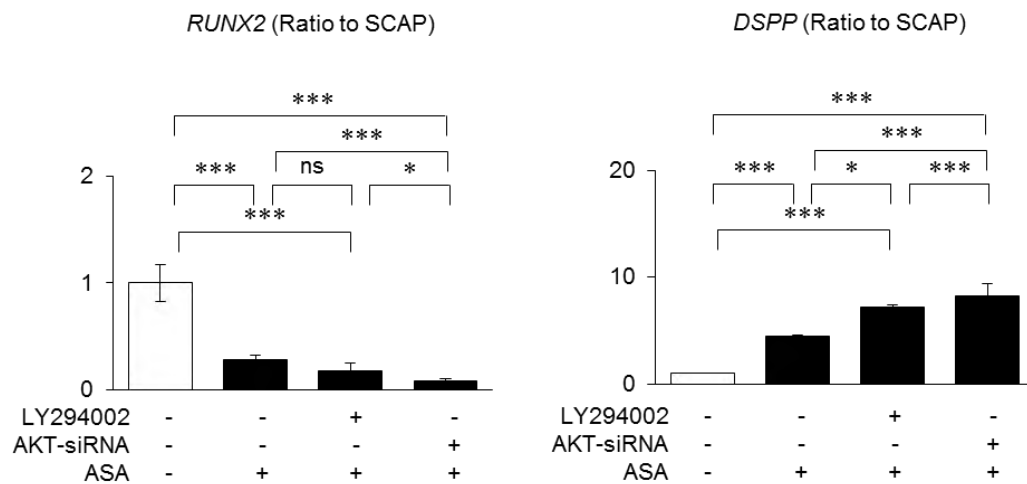


図 4-3-15. SCAP の *in vivo* 石灰化組織形成能力に対し、ASA 処理が与える影響と LY294002 および AKT-siRNA 前処理の効果 1

SCAP ( $4 \times 10^6$ ) に ASA ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加し、HA/TCP キャリアー (40 mg) と混合した。この混合物を免疫不全マウスの皮下に移植した。一部の SCAP は、LY294002 ( $50 \mu\text{M}$ ) および AKT-siRNA ( $20 \text{ nM}$ ) で前処理した。(a, b) 移植後 8 週における SCAP 移植体の組織学的解析。H&E 染色像。バー =  $200 \mu\text{m}$  (a)。移植組織における新生された石灰化基質領域の計測。n = 5。\*  $P < 0.05$ 、\*\*\*  $P < 0.005$ 。ns、有意差無し。結果は平均±標準誤差で表示 (b)。(c) ASA-SCAP 移植組織中の免疫蛍光染色。抗ヒト・ミトコンドリア抗体 (hMt ; 左パネル) および抗ヒト DSPP 抗体 (右パネル) による染色と DAPI による核染色を施行。バー =  $150 \mu\text{m}$ 。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)



**図 4-3-16. SCAP の *in vivo* 石灰化組織形成能力に対し、ASA 処理が与える影響と LY294002 および AKT-siRNA 前処理の効果 2**

SCAP ( $4 \times 10^6$ ) に ASA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加し、HA/TCP キャリアー (40 mg) と混合した。この混合物を免疫不全マウスの皮下に移植した。一部の SCAP は、LY294002 (50  $\mu\text{M}$ ) および AKT-siRNA (20 nM) で前処理した。移植組織における *RUNX2* および *DSPP* の発現を RT-qPCR 法で解析した。結果は、コントロール SCAP 移植組織における各遺伝子の発現に対する相対発現とし、平均値±標準誤差で表示。n = 5。\* P < 0.05、\*\*\* P < 0.005。ns、有意差無し。(Tanaka et al., J Endodo, 2019 より改変)

#### §4-4. 小括

実験Ⅱから以下のことが分かった。

1. ASA は SCAP の細胞形態、細胞接着には効果を示さない。
2. ASA は SCAP の CD146 および CD24 の発現を促進させる。
3. ASA は SCAP のテロメラーゼ活性を促進させる。
4. ASA は SCAP の *in vitro* での脂肪細胞分化および軟骨細胞分化には影響を与えない。
5. ASA は SCAP の *in vitro* での象牙芽細胞への分化を促進する。
6. ASA は、SCAP の象牙芽細胞分化過程における AKT のリン酸化を促進する。
7. PI3K-AKT シグナル経路の阻害は、ASA により促進される SCAP の *in vitro* での象牙芽細胞分化をさらに加速させる。
8. ASA は、SCAP の *in vivo* での象牙質形成を促進する。
9. PI3K-AKT シグナル経路の阻害は、ASA により促進される SCAP の *in vivo* での象牙質形成をさらに加速する。

## §5. 考 察

### §5-1. 研究 I の考察

最近、PI3K-AKT シグナル経路の活性化が、ヒト BMMSCs による骨形成を亢進することが報告された [45]。研究 I では、SCAP の象牙芽細胞への分化過程において、AKT のリン酸化が亢進することを明らかにした。しかし、AKT のリン酸化が SCAP の象牙芽細胞に対し、正の作用か、負の作用か、どちらの制御を行っているかは不明であった。そこで、AKT シグナルを抑制した SCAP を用いて、その象牙芽細胞への分化能力を解析することとした。AKT シグナルを抑制するために、AKT の上流のシグナルである、PI3K に対する特異的阻害剤 LY294002 による AKT のリン酸化阻害と、AKT mRNA の siRNA による AKT の発現抑制を用いて、AKT 機能の抑制を行った。LY294002 と AKT-siRNA により AKT 機能を抑制された SCAP は、予想に反して、その *in vitro* および *in vivo* における象牙質形成能力が亢進した。つまり、今回の研究結果から、同じ MSC に属する 2 つのタイプの幹細胞が、石灰化組織形成に対し、細胞内 AKT シグナルが全く正反対の機能を有するという、非常に興味深い結果を得た。象牙芽細胞の

分化過程において、初期分化過程においては PI3K-AKT シグナル経路の阻害を、そして後期分化過程においては PI3K-AKT シグナル経路の活性化を行うという、分化ステージ特異的に PI3K-AKT シグナル経路を調節することで、SHED の象牙芽細胞分化を促進するという報告がある [10]。従って、今回の LY294002 および AKT-siRNA を用いた前処理による、SCAP の象牙芽細胞分化に対する結果を考慮すると、PI3K-AKT シグナル伝達のステージ特異的調節は、正常な SCAP の象牙芽細胞への分化過程において、成熟した象牙芽細胞細胞へ分化が向うための、初期分化段階で必要な律速段階であると考えられる。

転写因子 *RUNX2* は、骨芽細胞ならびに象牙芽細胞の分化および成熟に必須の転写因子である [46-48]。しかし、その発現パターンは、骨芽細胞と象牙芽細胞では異なることが知られている。骨芽細胞の分化過程では、*RUNX2* の発現は骨芽細胞の分化段階の進行とともに増加する [46]。一方、象牙芽細胞では *RUNX2* の発現は分化過程の進行とともに増加するが、*DSPP* が発現する象牙芽細胞分化の最終段階においては抑制されている [47、48]。最近の研究結果において、マイクロ RNA 338-3p、微小管関連タンパク質 Tau、小ヘテロ二量体パートナーお

よび Rho/Rho 関連プロテインキナーゼなどの *RUNX2* ターゲット分子のステージ特異的調節が、*RUNX2* の発現を転写的に抑制し、象牙芽細胞分化の最終段階で *DSPP* の発現を誘導していることが明らかとなった [49-52]。骨肉腫細胞および前立腺癌細胞において、*AKT* およびその下流シグナルの *FOXO1* が *RUNX2* の転写を負に調節することが報告されている [53, 54]。今回の実験結果から、*SCAP* の象牙芽細胞分化における初期の *PI3K-AKT* シグナル経路が、象牙芽細胞分化過程の初期段階において *RUNX2* 発現を転写調節し、*SCAP* を成熟象牙芽細胞へ分化させるための重要な過程であると考えられた。さらに *SCAP* における *PI3K-AKT* シグナル経路を介した *RUNX2* の転写調節を研究することは、*SCAP* の象牙芽細胞分化に関する新たなメカニズムを明らかにする可能性とともに、歯根象牙質再生への礎となるものと考えられる。

本研究では、スキャフォールドを使用せずに、細胞凝集現象を利用して *SCAP* の球状構造物、すなわちスフェロイドを作製した。そしてこの *SCAP* ベースのスフェロイドを石灰化させ、象牙芽細胞特異的基質タンパク質 *DSPP* の遺伝子が発現する立体石灰化構造体を開発することに成功した。我々の開発した *SCAP*

ベース立体石灰化構造体は、市販の低付着性 U 底マルチウェルプレートおよび一般的な培養液を使用したことから、製作に特別な機器や複雑なプロトコルを必要としない。また、作製後、DNase 処理や滅菌操作によって無細胞化を行うことができ、天然の石灰化組織そのものを作製することができる。さらに今回の顎骨欠損モデルにおける移植実験の結果を考慮すると、開発した SCAP ベースの石灰化構造体は、骨再生に非常に有用であることが示された。外科的侵襲を伴う骨移植材の採取およびドナー不足 [15、16]、生体材料による感染や炎症 [19、20、55] など、臨床適応の上での問題点を克服する移植片となり得ることも期待される。また歯周炎での骨欠損治療や、歯内療法での覆髄材としての応用の可能性も有し得る。再生医療用として臨床的に応用、または歯科インプラント治療での天然象牙質素材による歯根象牙質としての応用など、臨床応用を行うためにはさらなる組織工学に基づいた基礎研究と前臨床試験が必要である。

ヒトの臓器/組織の代替モデルとして研究に用いている動物モデルおよび 2D 細胞培養試験は、種特異的および構造特異的な違いによる、ヒト反応とは異なった予測に基づく高コストな実験および薬物反応など、いくつかの問題を抱えて



いる[56]。SCAPの直接的な多分化能を考慮すると [2,57-59]、この scaffold-free 培養 3D-SCAP-スフェロイドの技術は、ヒトの臓器を小型化することを可能とし、その結果、基本的な 2D スクリーニングプラットフォームスクリーニングと現在の前臨床動物モデルに対する有利な代替法となり得るかもしれない。scaffold-free 培養 3D-SCAP-スフェロイドはまた、3D バイオプリンターを用いて複数のヒトの臓器/組織を製造するための実現可能な機能的 3D 組織芽となり得る[60]。この scaffold-free 培養 3D スフェロイドと組み合わせたさらなる研究は、ヒト疾患の治療および高スループットの薬物スクリーニングにおける新たな戦略を提供するであろう。

3D 環境の培養系は微小環境を再構築し、細胞間相互作用において細胞内シグナル伝達活性を促進する [61]。最近、3D スフェロイドで培養した DPSCs が、2D 単層で培養した DPSCs と比較して、石灰化組織を形成する能力を高く示すことが報告された [19]。また、3D DPSCs スフェロイドは、細胞密度が高く石灰化が進んだ辺縁ゾーンと、アポトーシスが生じ細胞密度が低いコアゾーンの2つの領域からなる。一方、PI3K-AKT シグナル経路の下流の一部である mTOR シ

グナル経路は、細胞内でのオートファジーを阻害しアポトーシスを誘導することが知られている [62]。今回の SCAP ベースのスフェロイドにおいて、rapamycin 前処理を施した SCAP ベース立体石灰化構造体は、LY294002 前処理を施した SCAP ベース立体石灰化構造体と比較して、*in vitro* で著しく高い石灰化密度をもたらし、*in vivo* 骨再生を強く誘導していた。また、rapamycin 前処理による mTOR の阻害は、象牙芽細胞への分化初期段階で SHED の分化を加速させるという報告がある [10]。つまり我々は mTOR の阻害により、SCAP のアポトーシスによる細胞死を抑制する事で、三次元立体構造体の特に内部まで、高い石灰化組織を有する新たな SCAP ベースの石灰化構造体を開発することに成功した。さらに今回の移植研究により、石灰化密度が高い SCAP ベースの石灰化構造体の方が、骨再生においてより優れた骨誘導性を示すことが明らかとなった。今後は、より均質な石灰化構造体の開発へ着手するとともに、より大きな石灰化構造体の作製、また 3D プリンターを用いた種々の形態の石灰化構造体の作製にチャレンジする予定である。

## §5-2. 研究Ⅱの考察

歯根象牙質の幹細胞である SCAP の象牙芽細胞分化能・象牙質形成能は、歯根象牙質/歯髄複合体の組織工学的再生における治療可能性を決定するための重要な性質である [1]。しかし、SCAP を用いた *in vitro* および *in vivo* において、象牙芽細胞分化能・象牙質形成能を促進する研究はあまり報告されていない。

ASA は、組織工学および細胞療法におけるヒト MSCs による骨再生において、骨造成を促進させる薬剤として興味深い結果を得ている [30、31]。そこで我々は、ASA の薬理学的作用が SCAP の象牙質形成能に有益であると仮定した。本研究では、ASA が SCAP の *in vitro* および *in vivo* において象牙芽細胞分化能・象牙質形成能を促進することを明らかにし、ASA 処理が SCAP を用いた歯根象牙質再生に有効なアプローチであることを示唆した。

最近の研究では、テロメラーゼ活性が幹細胞の特性の維持および MSCs の骨形成能力に促進的に関与していることが報告された [29、30、63、64]。従って、テロメラーゼの活性を有することは、骨再生のための組織工学において MSCs が備えるべき必須な性質であることが示唆されている。TERT 遺伝子を遺伝子導入

により過剰発現させ、MSCsにおいて TERT 活性を亢進させた場合、MSC 表面抗原の陽性マーカーである STRO-1、CD146 および CD105 の発現が著しく上昇することが報告されている [30、63]。細胞分取により得られた STRO-1 と CD146 の二重陽性 SCAP は、コントロールの SCAP よりも優れた象牙質形成能力を示すことも報告されている [65]。本研究では SCAP を ASA 処理することにより、以下の研究成果を得た。ASA 処理により SCAP のテロメラーゼ活性がわずかに上昇した。さらに、SCAP における CD146 および CD24 の発現が増加していた。また、SCAP の *in vitro* および *in vivo* での象牙質形成が亢進していた。以上の所見より、ASA 処理により SCAP のテロメラーゼ活性を制御する薬理学的アプローチは、SCAP を応用した歯根再生のための新しい戦略となることが示唆された。

研究 II では、LY294002 による機能的抑制および AKT-siRNA 前処理によって、ASA 刺激下でその促進が認められた SCAP の *in vitro* および *in vivo* における象牙芽細胞分化能・象牙質形成能がさらに促進された。研究 I の考察で述べたように、様々な細胞内因子・分子が象牙芽細胞の分化をステージ特異的に制御していることが明らかとなっている [46-54]。SP7 および NFIC は SCAP の最終分化に

関与する重要な転写因子であり [66,67]、歯根形成に重要な役割を果たす [68-70]。NFIC は、SCAP および象牙芽細胞の分化過程において *DSPP* 発現を調節する [71,72]。最近の研究によると、NFIC が、*RUNX2* の下流シグナルである *SP7* の発現を決定する転写スイッチとして機能し、*BMMSCs* の骨芽細胞への分化を調節することが示唆されている [73]。研究 II では、ASA 刺激による SCAP の象牙芽細胞分化の促進において、PI3K-AKT シグナル経路の前抑制が *RUNX2* の発現抑制および *DSPP* の発現亢進、引いては SCAP の象牙芽細胞分化の促進に関連していることを明らかにした。そこで、*SP7* および NFIC の発現に着目した。PI3K-AKT 経路の機能的抑制はまた、ASA 刺激下での SCAP の象牙芽細胞分化における *SP7* および NFIC の発現をさらに促進した。以上の結果は、PI3K-AKT シグナル経路が、ASA 刺激下での SCAP の象牙芽細胞分化・成熟を促進する新しいステージ特異的スイッチとして作用することを示唆した。

ASA および AKT 阻害剤が、SCAP の *in vivo* での象牙質様構造体の形成能を加速するというこの知見から考えると、現在のアペキシフィケーションおよび直接覆髓で使用される薬剤に加え、ASA、AKT 阻害剤および SCAP との混合物が、

象牙芽細胞およびその幹細胞／前駆細胞の内因性を標的とし、歯内治療における象牙質/歯髄再生の臨床的成功を導く、新たなユニークな代替物となり得ることを示している。また最近我々は、scaffold-free の SCAP ベースのスフェロイドとその石灰化物質の開発に加えて、マウスの顎骨欠損における骨再生を誘導することに成功しており [74]、ASA 処理した scaffold-free の SCAP ベースのスフェロイドは、歯根尖切除術および抜歯後の、歯根および歯槽骨の再生のための新しい組織工学的材料となり得る事を示唆する。ASA および AKT 阻害剤と組み合わせたさらなる前臨床試験は、将来の再生歯学に基づく歯内療法における新たな再生戦略を提供し得る。

結論として、我々は ASA が PI3K-AKT シグナル経路を増加させて SCAP の象牙質形成機能を促進することを実証した。しかし、PI3K-AKT シグナルの機能的抑制は、*RUNX2* の抑制および *SP7*、*NFIC*、*DSPP* の増強を介して、ASA により加速する SCAP の象牙芽細胞分化を促進することから、PI3K-AKT シグナル経路が象牙質形成 SCAP を最終段階（完全に成熟した段階）にするためのスイッチとして機能することを示唆している。今後、このスイッチ機構をより詳細に解明

し、ASA 処理と PI3K-AKT シグナル経路の抑制制御を組み合わせることにより、  
SCAP ベースの歯根象牙質再生のための新しいアプローチがさらに開発される  
ことが期待される。

## §6. 総括

本研究では、SCAP の象牙芽細胞分化のメカニズムを解明するため、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の SCAP への役割を検討した。また、SCAP の象牙質再生医療への応用を見据えて、scaffold を使用しない SCAP ベースの石灰化球状構造体の開発に挑戦した。さらに、SCAP の象牙芽細胞分化ならびに象牙質形成能を加速させる条件を見つけるため、ASA を SCAP に応用し、象牙芽細胞分化ならびに象牙質形成能への影響を調べた。本研究により得られた成果は以下の通りである。

1. PI3K-AKT-mTOR シグナル経路が SCAP の象牙芽細胞分化過程で負の調節機構として関与している。
2. PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の抑制により、SCAP の *in vitro* での象牙芽細胞分化が促進される。
3. PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の抑制により、SCAP の *in vivo* での象牙質形成が促進される。



4. SCAP のスフェロイドを作製するための至適初期細胞播種数および培養期間は、96 ウェルマルチウェルプレート 1well 当り、それぞれ  $1 \times 10^5$  個および7日間である。
5. scaffold-free で SCAP ベースの3次元石灰化構造体を作製できる（平均値カルシウム含有量 20.8 重量%）。
6. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体は、象牙芽細胞特異的遺伝子 *RUNX2*、*BGLAP* および *DSPP* を発現する。
7. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体は、LY294002 および rapamycin の前処理により、その石灰化が向上する。
8. SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体は、顎骨欠損部における骨再生を誘導する。
9. SCAP または SCAP ベース scaffold-free 石灰化構造体による顎骨欠損部における骨再生は、LY294002 および rapamycin での前処理により促進する。
10. ASA は SCAP の細胞形態、細胞接着には効果を示さない。
11. ASA は SCAP の CD146 および CD24 の発現を促進させる。
12. ASA は SCAP のテロメラーゼ活性を促進させる。

13. ASA は SCAP の *in vitro* での脂肪細胞分化および軟骨細胞分化には影響を与えない。
14. ASA は SCAP の *in vitro* での象牙芽細胞への分化を促進する。
15. ASA は、SCAP の象牙芽細胞分化過程における AKT のリン酸化を促進する。
16. PI3K-AKT シグナル経路の阻害は、ASA により促進される SCAP の *in vitro* での象牙芽細胞分化をさらに加速する。
17. ASA は、SCAP の *in vivo* での象牙質形成を促進する。
18. PI3K-AKT シグナル経路の阻害は、ASA により促進される SCAP の *in vivo* での象牙質形成をさらに加速する。

今後は、SCAP の象牙芽細胞分化メカニズムの解明をさらに進めていくとともに、象牙質様構造物を再生歯根象牙質に発展させる方法を探求していく予定である。

## §7. 謝辞

稿を終えるにあたり、終始、御懇篤なる御指導と御高閲を賜りました、九州大学 大学院歯学研究院 分子口腔解剖学分野 教授 久木田 敏夫 先生に、  
深甚なる謝意を表します。加えて、本研究を遂行するにあたり示唆に富む御助言  
や技術面で御指導と御援助頂きました、九州大学 大学院歯学研究院 口腔常  
態制御学講座 分子口腔解剖学分野 准教授 山座 孝義 先生に厚く御礼申  
し上げます。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり、多くの御援助や御協力を頂  
きました、九州大学 大学院歯学研究院 口腔常態制御学講座 分子口腔解剖  
学分野の皆様方に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

## §8. 引用文献

1. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.Y., Wang, S., Shi, S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLOS ONE* **1**, e79 (2006).
2. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S., Huang, GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics* **34**, 166–171 (2008).
3. Abuarqoub, D., Awidi, A., Abuharfeil, N. Comparison of osteo/dentinogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate. *Archives of Oral Biology* **60**, 1545–1553 (2015).
4. Abe, S., Hamada, K., Miura, M., Yamaguchi, S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell Biology International* **36**, 927–936 (2012).
5. Li, J., Parada, C., Chai, Y. Cellular and molecular mechanisms of tooth root development. *Development* **144**, 374–384 (2017).
6. Hay, N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* **8**, 179–183 (2005).
7. Bhaskar, P.T., Hay, N. The two TORCs and Akt. *Developmental Cell* **12**, 487–502

- (2007).
8. Yamaza, T., Kentaro, A., Chen, C., Liu, Y., Shi, Y., Gronthos, S., Wang, S., Shi., S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Research & Therapy* 1, 5 (2010).
  9. Kim, J.K., Baker, J., Nor, J.E., Hill, E.E. mTor plays an important role in odontoblast differentiation. *Journal of Endodontics* **37**, 1081 – 1085 (2011).
  10. Pantovic, A., Krstic, A., Janjetovic, K., Kocic, J., Harhaji-Trajkovic, L., Bugarski, D., Trajkovic, V. Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* **52**, 524 – 531 (2013).
  11. Li, B., Qu, C., Chen, C., Liu, Y., Akiyama, K., Yang, R., Chen, F., Zhao, Y., Shi, S. Basic fibroblast growth factor inhibits osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through ERK signaling. *Oral Diseases* **18**, 285–292 (2012).
  12. Boyle, M., Chun, C., Strojny, C., Narayanan, R., Bartholomew, A., Sundivakkam, P., Alapati, S. Chronic inflammation and angiogenic signaling axis impairs differentiation of dental-pulp stem cells. *PLOS ONE* **9**, e113419 (2014).
  13. Cao, Y., Xia, D.S., Qi, S.R., Du, J., Ma, P., Wang, SL., Fan, Z.P. Epiregulin can promote proliferation of stem cells from the dental apical papilla via MEK/Erk and JNK signalling pathways. *Cell Proliferation* **46**, 447–456 (2013).
  14. Laurencin, C., Khan, Y., El-Amin, S.F. Bone graft substitutes. *Expert Review of Medical Devices* **3**, 49–57 (2006).

15. von Arx, T., Cochran, D.L., Hermann, J.S., Schenk, R.K., Buser, D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clinical Oral Implants Research* **12**, 260–269 (2001).
16. Joshi, A., Kostakis, G.C. An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting. *British Dental Journal* **196**, 167–171 (2004).
17. Liu, H.C., E, L.L., Wang, D.S., Su, F., Wu, X., Shi, Z.P., Lv, Y., Wang, J.Z. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Engineering Part A* **17**, 2417–2433 (2011).
18. Annibali, S., Bellavia, D., Ottolenghi, L., Cicconetti, A., Cristalli, M.P., Quaranta, R., Pilloni, A. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial “critical size” defect: Preliminary data. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **102**, 815–825 (2014).
19. Yamamoto, M., Kawashima, N., Takashino, N., Koizumi, Y., Takimoto, K., Suzuki, N., Saito, M., Suda, H. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells. *Archives of Oral Biology* **59**, 310–317 (2014).
20. Watanabe, Y., Harada, N., Sato, K., Abe, S., Yamanaka, K., Matushita, T. Stem cell therapy: Is there a future for reconstruction of large bone defect? *Injury* **47**, S47–S51

(2016).

21. Abbott, A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* **424**, 870–872 (2003).
22. Griffith, L.G., Swartz, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 211–224 (2006).
23. Pampaloni, F., Reynaud, E.G., Stelzer, E.H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 839–845 (2007).
24. Lin, R.Z., Chang, H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* **3**, 1172–1184 (2008).
25. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., de Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology* **31**, 108–115 (2013).
26. Krelin Y., Berkovich, L., Amit, M., Gil, Z. Association between tumorigenic potential and the fate of cancer cells in a syngeneic melanoma model. *PLOS ONE* **8**, e62124 (2013).
27. Smith, J.B., Willis, A.L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature New Biology* **231**, 235–237 (1971).
28. Wang, L., Zhao, Y., Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration. *Journal of Dental Research* **91**, 1003–1010 (2012).
29. Yamaza, T., Miura, Y., Bi, Y., Liu, Y., Akiyama, K., Sonoyama, W., Patel, V., Gutkind, S., Young, M., Gronthos, S., Le, A., Wang, C.Y., Chen, W., Shi, S.

Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents. *PLOS ONE* **3**, e2615 (2008).

30. Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Yang, R., Chen, W., Wang, S., Shi, S. Mesenchymal stem cell based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *Nature Medicine* **17**, 1594–1601 (2011).
31. Liu, Y., Chen, C., Liu, S., Liu, D., Xu, X., Chen, X., Shi, S. Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED. *Journal of Dental Research* **94**, 209–218. (2015).
32. Yuan, M., Zhan, Y., Hu, W., Li, Y., Xie, X., Miao, N., Jin, H., Zhang, B. Aspirin promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *International Journal of Molecular Medicine* **42**, 1967–1976 (2018).
33. Abd Rahman, F., Mohd Ali, J., Abdullah, M., Abu Kasim, N.H., Musa, S. Aspirin enhances osteogenic potential of periodontal ligament stem cells (PDLSCs) and modulates the expression profile of growth factor-associated genes in PDLSCs. *Journal of Periodontology* **87**, 837–847 (2016).
34. Li, B., Sun, J., Dong, Z., Xue, P., He, X., Liao, L., Yuan, L., Jin, Y. GCN5 modulates osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through DKK1 acetylation in inflammatory microenvironment. *Scientific Reports* **6**, 26542 (2016).



35. Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13625–13630 (2000).
36. Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* **81**, 531–535 (2002).
37. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5807–5812 (2003).
38. Sakai, V.T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K.G., Machado, M.A., Shi, S., Santos, C.F., Nör, J.E. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *Journal of Dental Research* **89**, 791–796 (2010).
39. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
40. Yamaza, T., Ren, G., Akiyama, K., Chen, C., Shi, Y., Shi, S. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research* **90**, 317–324 (2011).
41. Yamaza, H., Tomoda, E., Sonoda, S., Nonaka, K., Kukita, T., Yamaza, T. Bilirubin reversibly affects cell death and dentinogenic capacity in stem cells from human

- exfoliated deciduous teeth. *Oral Diseases* **24**, 809–819 (2018).
42. Ma, L., Aijima, R., Hoshino, Y., Yamaza, H., Tomoda, E., Tanaka, Y., Sonoda, S., Song, G., Zhao, W., Nonaka, K., Shi, S., Yamaza, T. Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates secondary osteoporosis through interleukin-17-impaired functions of recipient bone marrow mesenchymal stem cells in MRL/lpr mice. *Stem Cell Research & Therapy* **6**, 104 (2015).
43. Maeda, H., Hashiguchi, I., Nakamuta, H., Toriya, Y., Wada, N., Akamine, A. Histological study of periapical tissue healing in the rat molar after retrofilling with various materials. *Journal of Endodontics* **25**, 38–42 (1999).
44. Bakhit, A., Kawashima, N., Hashimoto, K., Noda, S., Nara, K., Kuramoto, M., Tazawa, K., Okiji, T. Strontium ranelate promotes odonto-/osteogenic differentiation/mineralization of dental papillae cells in vitro and mineralized tissue formation of the dental pulp in vivo. *Scientific Reports* **8**, 9224 2018.
45. Baker, N., Sohn, J., Tuan, R.S. Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/Akt signaling, and the influence of caveolin-1/cholesterol homeostasis. *Stem Cell Research & Therapy* **6**, 238 (2015).
46. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., Kishimoto, T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).
47. Miyazaki, T., Kanatani, N., Rokutanda, S., Yoshida, C., Toyosawa, S., Nakamura, R., Takada, S., Komori, T. Inhibition of the terminal differentiation of odontoblasts

- and their transdifferentiation into osteoblasts in Runx2 transgenic mice. *Archives of Histology and Cytology* **71**, 131–146 (2008).
48. Chen, S., Rani, S., Wu, Y., Unterbrink, A., Gu, T.T., Gluhak-Heinrich, J., Chuang, H.H., Macdougall, M. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 29717–29727 (2005).
49. Oh, S.H., Hwang, Y.C., Yang, H., Kang, J.H., Hur, S.W., Jung, N.R., Jang, W.G., Lee, K.N., Oh, W.M., Park, J.C., Kim, S.H., Koh, J.T. SHP is involved in BMP2-induced odontoblast differentiation. *Journal of Dental Research* **91**, 1124–1129 (2012).
50. Sun, Q., Liu, H., Lin, H., Yuan, G., Zhang, L., Chen, Z. MicroRNA-338-3p promotes differentiation of mDPC6T into odontoblast-like cells by targeting Runx2. *Molecular and Cellular Biochemistry* **377**, 143–149 (2013).
51. Miyazaki, T., Baba, T.T., Mori, M., Moriishi, T., Komori, T. Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed in terminally differentiated odontoblasts and severely down-regulated in morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice. *Cell and Tissue Research* **361**, 457–466 (2015).
52. Huang, X., Chen, X., Chen, H., Xu, D., Lin, C., Peng, B. Rho/Rho-associated protein kinase signaling pathway-mediated downregulation of runt-related transcription factor 2 expression promotes the differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Experimental and Therapeutic Medicine* **15**, 4457–4464 (2018).

53. Zhang, H., Pan, Y., Zheng, L., Choe, C., Lindgren, B., Jensen, E.D., Westendorf, JJ., Cheng, L., Huang, H. FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion. *Cancer Research* **71**, 3257–3267 (2011).
54. Liang, G.H., Liu, N., He, M.T., Yang, J., Liang, Z.J., Gao, X.J., Rahhal, A.H., He, Q.Y., Zhang, H.T., Zha, Z.G. Transcriptional regulation of Runx2 by HSP90 controls osteosarcoma apoptosis via the AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling. *Journal Of Cellular Biochemistry* **119**, 948–959 (2018).
55. Williams, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–2953 (2008).
56. Shamir, E.R., Ewald, A.J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 647–664 (2014).
57. Kumar, A., Kumar, V., Rattan, V., Jha, V., Pal, A., Bhattacharyya, S. Molecular spectrum of secretome regulates the relative hepatogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow and dental tissue. *Scientific Reports* **7**, 15015 (2017).
58. Koutsoumparis, A., Vassili, A., Bakopoulou, A., Ziouta, A., Tsiftoglou, A.S. Erythropoietin (rhEPOa) promotes endothelial transdifferentiation of stem cells of the apical papilla (SCAP). *Archives of Oral Biology* **96**, 96–103 (2018).
59. Simonovic, J., Toljic, B., Nikolic, N., Peric, M., Vujin, J., Panajotovic, R., Gajic, R., Bekyarova, E., Cataldi, A., Parpura, V., Milasin, J. Differentiation of stem cells from apical papilla into neural lineage using graphene dispersion and single walled

- carbon nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2018). In press.
60. Yanagi, Y., Nakayama, K., Taguchi, T., Enosawa, S., Tamura, T., Yoshimaru, K., Matsuura, T., Hayashida, M., Kohashi, K., Oda, Y., Yamaza, T., Kobayashi, E. In vivo and ex vivo methods of growing a liver bud through tissue connection. *Scientific Reports* **7**, 14085 (2017).
61. Cukierman, E., Pankov, R., Yamada, K.M. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion In Cell Biology* **14**, 633–639 (2002).
62. Castedo, M., Ferri, K.F., Kroemer, G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell death and Differentiation* **9**, 99–100 (2002).
63. Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C.M., Robey, P.G., Wang, C.Y. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nature Biotechnology* **20**, 587–591 (2002).
64. Chen, C., Akiyama, K., Yamaza, T., You, Y.O., Xu, X., Li, B., Zhao, Y., Shi, S. Telomerase governs immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells by regulating FAS ligand expression. *EMBO Molecular Medicine* **6**, 322–334 2014.
65. Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Koidis, P., Geurtsen, W. Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Archives of Oral Biology* **58**, 1556-1568 (2013).
66. Wang, S., Mu, J., Fan, Z., Yu, Y., Yan, M., Lei, G., Tang, C., Wang, Z., Zheng, Y., Yu, J., Zhang, G. Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic

- differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Research* **8**, 346–356 (2012).
67. Zhang, J., Wang, Z., Jiang, Y., Niu, Z., Fu, L., Luo, Z., Cooper, P.R., Smith, A.J., He W. Nuclear Factor I-C promotes proliferation and differentiation of apical papilla-derived human stem cells in vitro. *Experimental Cell Research* **332**, 259–266 (2015).
68. Lee, D.S., Park, J.T., Kim, H.M., Ko, J.S., Son, H.H., Gronostajski, R.M., Cho, M.I., Choung, P.H., Park, J.C. Nuclear factor I-C is essential for odontogenic cell proliferation and odontoblast differentiation during tooth root development. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 17293–17303 (2009).
69. Zhang, H., Jiang, Y., Qin, C., Liu, Y., Ho, S.P., Feng, J.Q. Essential role of osterix for tooth root but not crown dentin formation. *Journal of Bone and Mineral Research* **30**, 742–746 (2015).
70. Bae, J.M., Clarke, J.C., Rashid, H., Adhami, M.D., McCullough, K., Scott, J.S., Chen, H., Sinha, K.M., de Crombrughe, B., Javed, A. Specificity Protein 7 Is Required for Proliferation and Differentiation of Ameloblasts and Odontoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* **33**; 1126–1140 (2018).
71. Gao, S., Zhao, Y.M., Ge, L.H. Nuclear factor I-C expression pattern in developing teeth and its important role in odontogenic differentiation of human molar stem cells from the apical papilla. *European Journal of Oral Sciences* **122**, 382–390 (2014).

72. Lee, H.K., Lee, D.S., Park, S.J., Cho, K.H., Bae, H.S., Park, J.C. Nuclear factor I-C (NFIC) regulates dentin sialophosphoprotein (DSPP) and E-cadherin via control of Krüppel-like factor 4 (KLF4) during dentinogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 28225–28336 (2014).
73. Lee, D.S., Choung, H.W., Kim, H.J., Gronostajski, R.M., Yang, Y.I., Ryoo, H.M., Lee, Z.H., Kim, H.H., Cho, E.S., Park, J.C. NFI-C regulates osteoblast differentiation via control of osterix expression. *Stem Cells* **32**, 2467–2479 (2014).
74. Tanaka, Y., Sonoda, S., Yamaza, H., Murata, S., Nishida, K., Hama, S., Kyumoto-Nakamura, Y., Uehara, N., Nonaka, K., Kukita, T., Yamaza, T. Suppression of AKT-mTOR signal pathway enhances osteogenic/dentinogenic capacity of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Research & Therapy* **9**, 334 (2018).

## 付. 略語集

AKT: protein kinase B

ASA: acetylsalicylic acid

$\alpha$ MEM: minimum essential medium alpha modification

BGLAP: bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein

BMMSC: bone marrow mesenchymal stem cell

CFU-F: colony-forming unit-fibroblasts

CNCCs: cranial neural crest cells

CT: connective tissue

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

DPSCs: dental pulp stem cells

DSPP: dentin sialophosphoprotein

ERK1/2: extracellular signal-related kinase 1 and 2

FBS: fetal bovine serum

HA/TCP: hydroxyapatite/tricalcium phosphate

HE: hematoxylin and eosin

MSCs: mesenchymal stem cells

mTOR: mammalian target of rapamycin

NF- $\kappa$ B: nuclear factor  $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

p-AKT: phosphorylated AKT

PBS: phosphate-buffer saline



PDLSCs: periodontal ligament stem cells

p-ERK1/2: phosphorylated ERK1/2

PI3K: phosphatidyl inositol 3 kinase

R-PE: R-phycoerythrin

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

RT-qPCR: RT- quantitative PCR

RUNX2: runt-related transcription factor 2

SCAP: stem cells from apical papilla

SHED: stem cell from human exfoliated deciduous teeth

siRNA: small interfere RNA

SP7: specificity protein 7

TBR: transforming growth factor beta receptor

TERT: telomerase reverse transcriptase

TGF  $\beta$  : transforming growth factor beta

Wnt: wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member