

酵素法と outgrowth 法で得られたヒト歯小囊及び歯根膜由来幹細胞の
特性に関する *in vitro* と *in vivo* の解析

品川 令

明海大学大学院歯学研究科

歯学専攻

(指導：須田 直人 教授)

In vitro and *In vivo* Analysis of Characteristics of Stem Cells
Derived from Human Dental Follicles and Periodontal Ligaments
Isolated by Enzymatic Digestion or Outgrowth Method

Rei SHINAGAWA

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor : Prof. Naoto SUDA)

要 旨

矯正歯科治療に伴う歯根の外部吸収は、臨床上回避すべき重要な問題である。外部吸収した歯根の再生にあたり、生体内でのセメント質再生が効果的と考えられる。再生医療において、間葉系幹細胞（MSCs）は硬組織の再生にしばしば利用されている。間葉系幹細胞は、歯小囊（DF）、歯根膜（PDL）などの歯の周囲組織からも分離可能であることが知られている。本研究では、セメント質形成に最も有用であるヒト抜去歯由来細胞の種類を明らかにすることを目的とした。我々は2種類の異なる細胞分離法、すなわち酵素法（EZ）と outgrowth 法（OG）を用いて、DF 及び PDL から抜去歯由来幹細胞（DSCs）を分離した。得られた4つの異なる細胞種を各々DF-EZ 群、DF-OG 群、PDL-EZ 群、PDL-OG 群とした。各群について、*in vitro* では増殖能、表面抗原、遺伝子発現、多分化能を検討した。*In vivo* での硬組織形成能評価では、各細胞をハイドロキシアパタイトと混在させたものを SCID マウスへ移植し、組織形成を組織学的に観察した。本研究で得られた計4種の細胞群は、*in vitro* において間葉系幹細胞マーカーに陽性であり、胚性幹（ES）細胞／人工多能性幹（iPS）細胞関連遺伝子を発現し、多分化能を有していた。セメント質関連遺伝子は、PDL-OG 群が最も高発現した。*In vivo* の評価では、細胞を移植したすべての群で硬組織様組織の形成がみられた。DF-EZ 群、PDL-EZ 群、PDL-OG 群の移植片は免疫染色においてセメント質マーカーに陽性を示し、移植したヒトの DSCs がセメント質様組織を形成したと考えられた。さらに、PDL-OG 群の移植片では無細胞セメント質様の組織に加えて有細胞セメント質様の組織形成がみられた。これらの知見により、PDL-OG 群はセメント質再生にあたり特に有用な細胞群であると期待された。

索引用語：歯根膜幹細胞、歯小囊幹細胞、酵素法、outgrowth 法、セメント質形成

Abstract

External apical root resorption is an undesirable complication during orthodontic treatment. The clinical resolution of this problem is to regenerate the tooth root by *de novo* cementum formation. In regenerative medicine, mesenchymal stem cells (MSCs) are frequently utilized for hard tissue regeneration. It is known that MSCs can be isolated from human dental tissues, including the dental follicle (DF) and periodontal ligament (PDL). The present study aimed to clarify which kinds of cell populations derived from human extracted teeth can be used as a bioresource for cementogenesis. We isolated dental stem cells (DSCs) from human DF and PDL using distinct two procedures: enzymatic digestion (EZ) or outgrowth method (OG). This procedure provided four different cell populations: DF-EZ, DF-OG, PDL-EZ, and PDL-OG. Cell surface markers, gene expression, and the multilineage differentiation capacity of the four DSCs were examined. To test hard-tissue formation *in vivo*, DSCs combined with hydroxyapatite were transplanted into severe combined immunodeficiency (SCID) mice, and tissue formation was histologically analyzed. Each four group showed typical stem cell properties, such as expression of MSC surface markers, embryonic stem (ES)/ induced pluripotent stem (iPS) cell-associated genes, and multipotency *in vitro*. PDL-OG showed the highest gene expression of cementum markers among four groups *in vitro*. *In vivo* experiments, all explants formed hard tissue-like tissue. DF-EZ, PDL-EZ and PDL-OG transplants were positively immunostained for cementum markers, suggesting that the transplanted human DSCs generated the cementum-like tissues. Interestingly, PDL-OG could form the cellular cementum-like tissues in addition to the acellular cementum-like tissue *in vivo*. These findings indicate PDL-derived cells isolated by the outgrowth method are likely to be the most competent cells for *de novo* cementogenesis.

Key words: dental follicle-derived stem cell, periodontal ligament-derived stem cell, enzymatic digestion, outgrowth method, cementogenesis

緒 言

矯正歯科治療による正常な咬合歯列への改善は様々な意義を持つ一方、歯根の外部吸収を伴うことがある¹⁾。このような外部吸収は、矯正歯科治療の安全性を考えると臨床上回避すべき重要な問題である。McLaughlin²⁾は、歯根吸収はわずかな程度のもので含めると矯正歯科治療を行った歯の比較的多くで生じうると報告している。歯根吸収に対して、エナメルタンパクのアメロゲニンや Emdogain®が抑制作用を持つことが報告されている³⁾。しかしながら、矯正歯科治療中にこれらを歯根表面に塗布して歯根吸収を抑制することは現実的とは言えない。したがって、矯正歯科治療中に外部吸収した歯根の再生を目的とした場合、生体内でのセメント質再生が効果的と考えられる。

再生医療において、幹細胞移植療法は、組織の再生に有用であると考えられている⁴⁻⁸⁾。幹細胞は、自己複製能および多分化能を持ち、コロニー形成能を有する細胞 (colony-forming unit - fibroblast; CFU-F) として定義される⁹⁻¹¹⁾。なかでも間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSCs) は、適切な条件下で培養することにより、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞および神経細胞を含む複数の細胞種に分化しうる自家細胞として、近年は臨床応用に向けて様々な分野で盛んに研究が行われている¹²⁻¹⁵⁾。これらの細胞は胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell ; iPS 細胞) とは異なり、生体に由来する組織幹細胞であるため、腫瘍化やがん化の危険性が低く、安全な臨床応用が期待できると考えられている¹⁰⁾。

MSCs は、骨髄、臍帯、胎盤および脂肪組織など様々な組織から単離されている^{10, 16-18)}。MSCs は成体マウスの骨髄吸引液中から同定され¹⁶⁾、再生医療の幹細胞移植療法の細胞源として有力視された。しかし、骨髄由来幹細胞を分離するには、骨髄液を得るために腸骨骨髄穿刺を行わなければならない、患者の負担が大きいことが欠点の一つとして挙げられてきた^{9, 10, 19)}。

幹細胞として骨髄液以外の細胞源が模索される中で、近年、歯科治療で得られた智

歯や乳歯からも骨髄由来幹細胞に類似した性質を有する細胞群、すなわち抜去歯由来幹細胞 (dental stem cells; DSCs) の分離が報告された。DSCs は、種々の疾患治療への応用が実験動物モデルで検討されている^{9,20,21)}。最初に分離が報告されたヒトの DSCs は、抜去智歯の歯髄腔内に存在する歯髄組織から単離された歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells; DPSCs) であった²²⁾。以来 DSCs は、ヒト脱落乳歯の歯髄組織、歯根が形成途上にある智歯の根尖部歯乳頭組織や歯小囊組織 (DF)、歯根が完成した智歯の歯根膜組織 (PDL) などからの分離も報告されており、それぞれ乳歯幹細胞 (stem cells from exfoliated deciduous teeth; SHEDs)²³⁾、歯乳頭幹細胞 (stem cells from the apical papilla; SCAP)²⁴⁾、歯小囊幹細胞 (dental follicle precursor cells; DFPCs)²⁵⁾、歯根膜幹細胞 (periodontal ligament stem cells; PDLSCs)²⁶⁾と呼ばれている。これらの DSCs は骨髄幹細胞と比較して容易に入手でき、抜去歯を再利用できるため細胞供給源として利用する上で侵襲も少なく、その有用性が期待されている^{27,28)}。

上記のヒト DSCs を再生医療に応用する上では、細胞特性のより詳細な検討が必要とされている。この点に関して、Tamaki ら¹⁹⁾は、ヒト抜去歯とその付着組織から分離培養した4種類の幹細胞、すなわち、歯髄幹細胞 (DPSCs)、歯根膜幹細胞 (PDLSCs)、歯小囊幹細胞 (DFSCs)、歯乳頭幹細胞 (APSCs) に加え、これまで再生医療で多くの期待を受けてきた骨髄幹細胞 (BMSCs) を含めた5種類の MSCs の解析を行った。*In vitro* における検討の結果、抜去歯由来の4種類の幹細胞は、骨髄幹細胞と同程度の骨芽細胞・脂肪細胞・神経細胞への分化能を示し、骨髄由来の幹細胞よりも活発な増殖能を有していたことを報告した¹⁹⁾。

このような抜去歯由来の細胞は *in vivo* でセメント質様組織を形成することが知られている²⁹⁾。ウシの歯小囊細胞を移植した実験では、移植細胞は、セメント質に特異性の高いマーカーである cementum attachment protein (CAP) 陽性のセメント質様基質を形成した²⁹⁾。しかし、ヒト試料を用いた場合に、どのようなヒト抜去歯由来細胞がセメント質形成に最も適切かは、いまだ不明である。さらに、歯の周囲組織を用いた

細胞分離法には、酵素処理により細胞を単離する方法（enzymatic digestion ; EZ 法）と採取組織を静置培養する方法（outgrowth ; OG 法）が広く用いられている^{27, 30-32}。OG 法は MSC の樹脂接着性を利用し、組織片から外生してきた細胞を得る方法であるのに対し、EZ 法は collagenase type I と dispase により組織を溶解し、単一細胞浮遊液を得る方法である³²。どちらの細胞分離法が、再生医療に有用な幹細胞の分離に適しているのかも不明である。

そこで本研究では、セメント質形成に最も有用となるヒト抜去歯由来組織と細胞分離法を明らかにすることを目的として、採取組織として DF と PDL、分離法として EZ 法と OG 法を用いて異なる 4 組の DSCs を分離し、*in vitro* と *in vivo* の双方から解析した。

材料と方法

1. 細胞培養

本研究は、日本歯科大学生命歯学部倫理委員会の承認のもと実施された (NDU-T2013-10)。研究の目的と趣旨を説明後、インフォームドコンセントの得られた健常な 15~29 歳の患者より、治療上の理由により抜歯された智歯を実験に用いた。過去の報告¹⁹⁾に従い、DF は完全埋伏根未完成智歯の歯冠周囲からマイクロ剪刀（夏目製作所、東京、日本）を用いて採取し、PDL は根完成歯の歯根中央 1/3 部分から滅菌カミソリ（フェザー安全剃刀、大阪、日本）を用いて採取した。採取した組織は、滅菌カミソリにより約 2 mm×2 mm の大きさに細切した。DF 及び PDL 細胞は、2 つの異なる方法、すなわち EZ 法および OG 法によって単離した。

EZ 法は Gronthos ら²²⁾の方法に準じて行った。簡潔に記すと、細切した組織を Hanks 液（日水製薬、東京、日本）中に溶解した 3 mg/ml collagenase type I (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) と 4 mg/ml dispase (和光純薬工業、大阪、日本) の混合溶液 (pH 7.4) 10 ml 中に移し、37°C 恒温槽中で 1 時間インキュベート後、試験管ミキサー（デルタミキサー；タイテック、埼玉、日本）で数秒間攪拌した。その後、70 µm のセルストレイナー（Merck KGaA）により細胞を単離し、 1×10^5 個の細胞を 100 mm 培養皿（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA）に播種し、培養した。培養液（growth medium; GM）には、15% fetal bovine serum (FBS; Lot No: 12483, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、100 µM glutamate (GlutaMAX I; Thermo Fisher Scientific)、0.1% MEM Non-Essential Amino Acids (MEM-NEAA; Thermo Fisher Scientific)、50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific)、0.25 mg/ml Fungizone (Thermo Fisher Scientific) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's nutrient mixture F12 (DMEM/F12) 培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られた DF 細胞と PDL 細胞をそれぞれ DF-EZ 群、PDL-EZ 群とした。

OG 法は Bakopoulou ら²⁷⁾の方法に準じ、細切した組織小片を 60 mm 培養皿 (Becton

Dickinson) に静置し、少量の GM を添加して培養を行った。24 時間後、組織小片が培養皿から剥離しないよう注意しながら 2 ml の GM を添加した。その後 1 週間以内に DF と PDL より外生した付着細胞を、各々 DF-OG 群と PDL-OG 群とした。

培養はすべて 37°C、4.7% CO₂ 湿潤下で行い、GM は 3~4 日おきに新しい培地と交換した。70~80% 程度コンフルエントに達した後、0.25% trypsin (Becton Dickinson) /0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA ; 同仁化学研究所、熊本、日本) (以下 trypsin/EDTA) を用いて細胞を剥離し、1 : 3 の割合で継代培養を行い、継代数 3 または 4 の細胞を実験に供した。以下の実験では、少なくとも 3 人以上の異なる患者由来の細胞を用いた。

2. 細胞増殖能評価

細胞増殖能の検討を行うため、各細胞群 (DF-EZ 群、DF-OG 群、PDL-EZ 群、PDL-OG 群) を 24 well プレート (Becton Dickinson) に 3×10^3 個/well ずつ播種し、GM 中で 12 日間培養を行った。培地は 2 日おきに交換した。48 時間毎に trypsin/EDTA を用いて細胞を培養プレートから剥離し、細胞数を血球計算板で計測した。

3. フローサイトメトリー

継代数 3 の DF-EZ 群、DF-OG 群、PDL-EZ 群、PDL-OG 群の各細胞群を trypsin/EDTA を用いて培養皿から回収し、430×g、5 分間の遠心分離後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 15 分間固定した。各種抗ヒト抗体を添加して室温で 1 時間インキュベートした。過去の報告^{19, 33-35)}に従い、一次抗体は、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識マウス抗ヒト CD14、CD90 抗体、phycoerythrin (PE) 標識マウス抗ヒト CD29、CD31、CD105、CD106、CD140b、CD146 抗体 (以上 Becton Dickinson)、FITC 標識マウス抗ヒト CD34、CD44 抗体、PE 標識マウス抗ヒト CD166 抗体 (以上 Beckman Coulter, Brea, CA, USA)、FITC 標識マウス抗ヒト Stro-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,

USA)、ウサギ抗ヒト NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2) 抗体 (Merck KGaA) を使用した。抗 NG2 抗体の染色には、さらに Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を二次抗体として添加し、30 分間インキュベートした。一次抗体を使用せず phosphate buffer saline (PBS ; タカラバイオ、滋賀、日本) のみとインキュベートしたものをコントロールとした。抗体と反応させた細胞を PBS で洗浄し、Guava™ flow cytometer と Guava TM Express Plus (version 5.3) software (Merck KGaA) を使用して各抗体に対する細胞表面抗原のマーカー解析を行った。各抗体について独立した実験を 3 回繰り返し行った。

4. 遺伝子発現解析

1) Reverse transcription (RT) - Polymerase chain reaction (PCR)

コンフルエントまで培養した各細胞群から RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して total RNA を抽出した。1 µg に調製した total RNA を用いて、High Capacity cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) により cDNA を合成し、PCR Supermix Platinum kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて 20 µl の反応液を調製した。PCR 反応は Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) を用い、94°C で 2 分間反応させた後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。使用したプライマーを Table 1 に示す。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロールとして用いた。PCR 反応産物液は 0.5 µg/ml エチジウムブロマイド添加 1.8% アガロースゲルにて電気泳動後、紫外線照射下で観察した。

2) Real-time PCR

前述した cDNA の合成後、TaqMan one-step RT-PCR master mix reagents kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、TaqMan プローブを用いた $\Delta\Delta C_t$ 法による real-time PCR

で CAP 遺伝子、cementum-derived protein 1 (CEMP1) 遺伝子の発現を定量解析した。PCR 反応は 95°C で 10 分間反応させた後、95°C 15 秒、60°C 1 分、95 °C 15 秒を 1 サイクルとして、40 サイクル行った。得られたデータは β -actin 遺伝子の発現を用いて標準化した。使用した TaqMan プローブを以下に示す：CAP (assay ID: Hs00171965_m1, gene bank number: NM_014241.3, amplicon length: 74)、CEMP1 (assay ID: Hs04185363_s1, gene bank number: NM_001048212.3, amplicon length: 72)、 β -actin (assay ID: Hs99999903_m1, gene bank number: NM_001101.3, amplicon length: 171 ; 以上 Thermo Fisher Scientific)。検出には StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使用した。各細胞群とも 4 well の結果を用いて統計解析を行った。なお、全ての実験において融解曲線を作成し、非特異的な増幅産物がないことを確認した。

5. 多分化能評価

1) 骨芽細胞／セメント芽細胞分化誘導

Tamaki ら¹⁹⁾の方法に従い、各細胞群を、6 well プレートに 1×10^5 個/well となるよう播種し、GM 中で培養した。コンフルエントに達した後、骨芽細胞／セメント芽細胞分化誘導培養液として 10% FBS、10 nM dexamethasone (Merck KGaA)、10 mM β -glycerophosphate (Merck KGaA)、100 μ M L-ascorbate-2-phosphate (和光純薬工業) を添加した α -modified minimal essential medium (α -MEM ; 和光純薬工業) を用いた。コントロール群として 10% FBS 含有 α -MEM 培地を用い、同様に培養した。培地交換は 3~4 日おきに行い、誘導培養液に交換後、3 週間培養を継続した。分化誘導開始から 3 週間後、石灰化結節の形成とその定量評価を行うため、Alizarin Red S 染色を行った。まず各 well から培地を除き、PBS にて 1 回洗浄した後、10% 中性緩衝ホルマリン (和光純薬工業) を用いて細胞を 10 分間固定した。1% Alizarin Red S (Merck KGaA) により室温で 30 分間染色後、洗浄した。洗浄後、Miyazaki

ら³⁶⁾の方法に従い、形成された石灰化結節の定量を行った。well内の水分を除いた後、0.5 ml/wellの5%ギ酸（関東化学、東京、日本）を添加し、プレートを10分間攪拌して、Alizarin Red Sの色素を溶出した。溶出液100 µlを測定用96 wellプレート（Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany）に移し、Corona Grating Microplate Reader SH-9000 Lab（日立ハイテクノロジーズ、東京、日本）を用いて400 nmの吸光度を測定した。また、骨芽細胞／セメント芽細胞分化誘導後のCAP遺伝子とCEMP1遺伝子の発現を前述したTaqManプローブを用いてReal-time PCRにて定量解析した。

2) 脂肪細胞分化誘導

Tamakiら¹⁹⁾の方法に従い、各細胞群を、6 wellプレートに 1×10^5 個/wellとなるよう播種し、GMにより培養を行った。コンフルエントに達した後、脂肪細胞誘導培養液として10% FBS、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine（Merck KGaA）、0.5 µM hydrocortisone（和光純薬工業）、60 µM indomethacin（Merck KGaA）を添加したα-MEM培地を用いた。コントロール群として10% FBS含有α-MEM培地を用い、同様に培養した。培地交換は3~4日おきに行い、誘導培養液に切り替えてから3週間培養を継続した。分化誘導開始から3週間後、細胞内の脂肪小滴の蓄積とその定量評価を行うため、Oil Red O染色を行った。まず各wellから培地を除き、PBSにて2回洗浄した後、10%中性緩衝ホルマリンを用いて室温で5分間固定した。固定液を除き、新しい10%中性緩衝ホルマリンを添加し、さらに10分間固定した。固定液を除き、60% isopropanol（和光純薬工業）で1回洗浄した後、各wellを完全に乾燥させた。乾燥後、0.2% Oil Red O（和光純薬工業）により室温で15分間染色を行い、染色液を除き、精製水で各wellを4回洗浄した。形成された脂肪小滴の定量を行うため、風乾後、750 µl/wellの100% isopropanol（和光純薬工業）を添加し、室温で10分間静置して、Oil Red Oの色素を溶出した。溶出液100 µlを測定

用 96well プレートに移し、Corona Grating Microplate Reader SH-9000 Lab を用いて 520 nm の吸光度を測定した。

3) 軟骨細胞分化誘導

軟骨細胞への分化誘導は、Johnstone ら³⁷⁾の方法に従ってペレット培養法を用いて行った。約 1×10^6 個の各細胞群を、それぞれを 15 ml のポリプロピレンチューブ (Becton Dickinson) 中に移し、430×g、室温で 5 分間遠沈し、細胞ペレットを作製した。軟骨分化誘導培養液として、1% FBS、10 ng/ml transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1: Peprotech, Oak Park, CA, USA)、1% insulin-transferrin-selenium (ITS) +1 supplement (Merck KGaA)、50 mM ascorbate-phosphate (Merck KGaA) を添加した DMEM/F12 培地を 15 ml ポリプロピレンチューブ中に 1 ml 静かに加え、培養を行った。培養液は 3~4 日おきに交換し、培養は 4 週間継続した。4 週間後、4% PFA を用いて細胞ペレットを固定し、パラフィン包埋した後、5 μ m の切片を作製した。軟骨細胞への分化を確認するため、1% alcian blue solution (Merck KGaA)、0.1% safranin-O (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Germany) を用いた染色と、ウサギ抗 type II collagen 抗体 (Santa Cruz、希釈倍率 1:50) を用いた免疫組織化学的染色を行った。

6. 移植による硬組織形成能評価

動物実験は、日本歯科大学生命歯学部動物実験規程に則って計画し、動物実験委員会の承認後行った (承認番号: 14-09)。

1) 実験動物

6 週齢の雌性 C.B-17/Icr-scid マウス (日本クレア、東京、日本) 計 25 匹 (DF-EZ 群、DF-OG 群、PDL-EZ 群、PDL-OG 群、コントロール群各 5 匹) を用いた。

2) 移植方法

Huang ら⁹⁾の方法に準じ、各細胞群 1.0×10^6 個を 40 mg のハイドロキシアパタイト粒子 (HA; Calcitite, Zimmer Dental, Warsaw, IN, USA)、と混合し、その混合物を $430 \times g$ で 5 分間遠沈しペレットを作製した。その細胞ペレット/HA 混合物に、さらにコラーゲンゲル (新田ゼラチン、大阪、日本) を添加したものを、マウスの背側皮下に移植した。また、細胞を除いた HA/コラーゲンゲルのみの混合物を、コントロール群として移植した。

3) 組織学的・免疫組織化学的評価

移植 16 週後にマウスを屠殺し、移植片を摘出した。摘出した試料は Tominaga ら³⁸⁾の方法に従い、4% PFA にて固定後、脱灰し、パラフィン包埋を行い、厚さ $5 \mu m$ の切片を作製した。脱パラフィンした切片をヘマトキシリンエオジン染色及び Masson's trichrome 染色を行った。免疫組織化学的染色には、一次抗体として、マウス抗ヒト vimentin モノクローナル抗体 (v6630; Merck KGaA、希釈倍率 1:10000)、ウサギ抗ヒト osteopontin (OPN) ポリクローナル抗体 (ab8448; Abcam, Cambridge, UK、希釈倍率 1:1000)、マウス抗ヒト osteocalcin (OCN) モノクローナル抗体 (ab13418; Abcam、希釈倍率 1:500)、ウサギ抗 protein-tyrosine phosphatase-like member A (PTPLA; CAP) ポリクローナル抗体 (LS-C162297; LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, USA、希釈倍率 1:100)、マウス抗ヒト dentin sialoprotein (DSP) モノクローナル抗体 (sc-73632; Santa Cruz、希釈倍率 1:100) を用いた。Peroxidase-Blocking Solution Dako REAL™ (Dako, Glostrup, Denmark) による内在性ペルオキシダーゼの不活化の後、一次抗体に応じて 0.1% trypsin/PBS (37°C、30 分間) 処理による抗原の賦活化を行った。非特異的抗体結合のブロッキングは Blocking One Histo (ナカライテスク、京都、日本) を室温で 10 分間作用させた。前述の各一次抗体を 4°C

で一晩反応させた。二次抗体には Dako Envision™ + Dual Link System-HRP を使い、室温で 30 分間作用させた。3,3'-diaminobenzidine using ImmPACT™ DAB Peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) による発色後、ヘマトキシリンで対比染色を行った。一次抗体を用いずに同じ手順を行ったものをコントロールとした。

7. 統計処理

二元配置分散分析または Wilcoxon の順位和検定により統計解析を行い、多重比較には Bonferroni 法を用いた。p < 0.05 を有意水準とした。ソフトウェアは SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) を用いた。

結 果

1. 細胞形態と細胞増殖能

初代培養開始 1~2 週間後、DF-EZ 群と PDL-EZ 群の両方で接着性細胞塊の形成が認められた (Fig. 1A)。一方、培養皿に静置した DF および PDL 組織では、2~4 日後までに組織片の周囲より細胞の外生が開始した (Fig. 1B)。細胞形態は、4 つの細胞群ともに紡錘形の線維芽細胞様の形態を示した (Fig. 1A, B)。

細胞増殖能に関して、培養開始後 2 日目より PDL 群に比較し DF 群が有意に高かった ($p < 0.05$)。12 日間の培養期間を通じて EZ 群と OG 群間には有意な差は認められなかった (Fig. 1C)。

2. 細胞表面抗原の発現

細胞表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した。4 つの細胞群のすべてにおいて、間葉系間質細胞のマーカーである CD29 ($> 86.9\%$)、CD44 ($> 90.9\%$)、および CD90 ($> 86.1\%$) の高い発現を認めた。Stro-1 の発現は、すべての細胞群で 5% 前後認められた。CD14 (単球マーカー)、CD31 (内皮細胞マーカー) および CD34 (造血幹細胞マーカー) の発現は、4 群すべてにおいて低い値を示した ($< 2.7\%$)。これらのマーカーの発現は 4 つの細胞群の間で有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (Fig. 2A)。

全 4 細胞群ともに間葉系間質細胞マーカーである CD105、CD106、CD146 及び CD166 に陽性を示した。これらの発現は、EZ 群で OG 群よりも高い傾向がみられ、特に CD105、CD146、および CD166 の 3 つの発現は、有意に高かった ($p < 0.05$)。Pericyte マーカーである NG2 と CD140b は、OG 群と比較して EZ 群において有意に高かった (Fig. 2B)。

3. RT-PCR による遺伝子発現解析

GM で培養し、コンフルエントに達した DF-EZ、DF-OG、PDL-EZ、PDL-OG の各

群における、種々のマーカー分子の遺伝子発現を RT-PCR で検討した。歯髄幹細胞 (DP) の cDNA は、Tamaki ら¹⁹⁾の報告に従って合成した。その結果、幹細胞関連遺伝子である *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* と、骨芽細胞関連遺伝子である *Runx2*、*Type I collagen*、*Osterix* の発現が全細胞群で同程度に発現された。歯根膜関連遺伝子である *GDF5* の発現は全細胞群で同程度にみられたが、*Scleraxis* の発現は PDL-EZ 群が最も高く、*Tenascin-N* の発現は DF 群と比較して PDL 群で高かった (Fig. 3A)。また cDNA を 50 倍希釈して行った半定量 PCR の結果では、全細胞群 DF-EZ、DF-OG、PDL-EZ、PDL-OG において、セメント質関連遺伝子である *CAP* と *CEMP1* の発現が認められた。一方、DP では、DF 群や PDL 群と比較して、発現が著しく低かった (Fig. 3B)。

4. *in vitro* における多分化能

1) 骨芽細胞／セメント芽細胞への分化能

骨芽細胞／セメント芽細胞への分化誘導開始から 3 週間後、すべての細胞群において、Alizarin Red 陽性の石灰化結節の形成が認められた (Fig. 4A-D)。一方、コントロール群においては、陽性像は認められなかった (Fig. 4A-D 右上挿入図)。定量評価の結果から、PDL 群と比較して DF 群で、石灰化物の形成量が有意に多かった (Fig. 4E)。また、骨芽細胞／セメント芽細胞への分化誘導後、セメント質関連遺伝子である *CAP*、*CEMP1* の発現は PDL-OG 群が最も高かった (Fig. 4F, G)。リファレンスサンプルには、前述の DP を使用した。

2) 脂肪細胞への分化能

脂肪細胞への分化誘導開始から 3 週間後、すべての細胞群において、Oil Red O 陽性の細胞内の脂肪小滴の形成が認められた (Fig. 4H-K)。一方、コントロール群においては、陽性像は認められなかった (Fig. 4H-K, 右上挿入図)。定量評価の結果、OG 群と比較して EZ 群で、脂肪小滴の形成量が有意に多かった (Fig. 4L)。

3) 軟骨細胞への分化能

軟骨分化誘導培地でのペレット培養開始から4週間後、すべての細胞群において、alcian blue 染色、safranin O 染色で染色性を示す軟骨様の基質形成が認められた (Fig. 4M-T)。また免疫組織化学的染色の結果、これらの基質は抗 type II collagen 抗体に陽性を示した (Fig. 4U-X)。各細胞種間で、形成された軟骨様組織の大きさや形態の明らかな差は認められなかった。

5. *In vivo* での硬組織形成能

1) 組織学的所見

細胞を含まずコラーゲンゲル/HA の担体のみを移植したコントロール群では、HA は宿主であるマウスの細胞と線維性組織に取り囲まれていた (Fig. 5A)。これらの線維性組織は Masson's trichrome 染色に青く染まることから、コラーゲン線維と考えられた (Fig. 5F)。HA 周囲には、管腔構造がみられたものの、硬組織様組織 (hard tissue-like tissue; HTLT) の形成はみられなかった (Fig. 5A, F)。

一方、細胞を移植した4種の移植片すべてで、HA の周囲に HTLT と硬組織を含まない線維状組織が比較的境界明瞭に観察された (Fig. 5B-E)。これらの組織はいずれも Masson's trichrome 染色に青く染まり、コラーゲン線維に富んでいると考えられた (Fig. 5G-J)。DF-OG 群の移植により形成される組織量は、他の細胞の移植片よりも明らかに少なかった (Fig. 5C, H)。DF-EZ 群、DF-OG 群、PDL-EZ 群の HTLT は、大部分が無細胞性であったのに対して (Fig. 5B-D, G-I)、PDL-OG 群では HTLT 内に埋入細胞がみられた (Fig. 5E, J)。4つの細胞移植群のすべてで、HTLT の内部に血管の侵入は認められなかったものの (Fig. 5G-I)、硬組織を含まない線維性組織には血管腔が観察された (Fig. 5J)。

2) 免疫組織化学的所見

細胞を含まずコラーゲンゲル/HA の担体のみを移植したコントロール群では、いずれの抗体とも陽性反応はなかった (Fig. 6A, F, K, P)。

抗ヒト vimentin 抗体に対し、DF-EZ 群と DF-OG 群の移植片では、HTLT に陽性反応はみられず、その周囲の線維性組織に多数の陽性細胞がみられた (Fig. 6B, C)。PDL-EZ 群と PDL-OG 群の移植片では、抗ヒト vimentin 抗体陽性細胞が線維性組織に多数みられた点は DF-EZ 群と DF-OG 群の移植片と同じであったが、HTLT を構成する細胞にも観察された (Fig. 6D, E)。PDL-EZ 群では陽性細胞が集塊状にクラスターを形成していたのに対し (Fig. 6D)、PDL-OG 群では一つ一つの陽性細胞が単独に存在した (Fig. 6E)。Figure 5 でも示したように、DF-OG 群の移植により形成される組織量は少なく、特に HTLT の形成量は他の細胞の移植片よりも明らかに少なかった (Fig. 6C, H, M, R)。

次に抗 OPN 抗体との反応は、いずれの移植片においても HTLT と、その周囲の線維性組織の細胞と基質に強くみられた (Fig. 6G-J)。PDL-OG 群の移植片における HTLT 内の埋入細胞は、抗 OPN 抗体にも反応した (Fig. 6J)。HTLT における陽性反応は、PDL-EZ 群 (Fig. 6I) の移植片が最も強く、DF-EZ 群 (Fig. 6G) と DF-OG 群 (Fig. 6H) が同程度、PDL-OG 群 (Fig. 6J) の順で減少した。

次に抗 OCN 抗体との反応は、DF-EZ 群、PDL-EZ 群、PDL-OG 群の移植片の HTLT とその周囲の線維性組織の細胞と基質にわずかにみられた (Fig. 6L, N, O)。PDL-OG 群の移植片における硬組織内の埋入細胞は、抗 OCN 抗体にも反応した (Fig. 6O)。一方、DF-OG 群の移植片における陽性反応は、ほとんどみられなかった (Fig. 6M)。

最後に抗 CAP 抗体との反応は、DF-EZ 群、PDL-EZ 群、PDL-OG 群の移植片の HTLT とその周囲の線維性組織の細胞と基質に明瞭に観察された (Fig. 6Q, S, T)。PDL-OG 群の移植片における HTLT 内の埋入細胞は、抗 CAP 抗体にも陽性であっ

た (Fig. 6T)。DF-OG 群の移植片における抗 CAP 抗体との反応は、HTLT ではみられず、周囲の線維状組織中の細胞の一部にみられた (Fig. 6R)。HTLT における陽性反応は、DF-EZ 群 と PDL-EZ 群との移植片が最も強く (Fig. 6Q, S)、PDL-OG 群 (Fig. 6T) はそれよりもやや弱かった。

また、形成された組織片は 4 群とも抗 DSP 抗体とは反応せず、象牙質様の組織ではないと考えられた (データは示さず)。

なお、一次抗体を用いずに同じ手順を行ったコントロールにおいては、非特異的反応はみられなかった (データは示さず)。

考 察

本研究では、セメント質および歯根再生の実現に向けた再生医療技術の確立を目指し、ヒト DSCs であるヒト歯小囊幹細胞および歯根膜幹細胞に注目した。そして、MSCs の特性を、*in vitro* と *in vivo* において細胞生物学的に解析した。

細胞増殖能評価の結果、DF 群は PDL 群と比較して高い増殖を示し、過去の報告^{19, 39)}と一致していた。これは、歯小囊が歯の発生途中に形成される未成熟な組織であるために、その由来細胞である DF-EZ 群、DF-OG 群には、より未分化な細胞が多く存在したためと考えられる。一方で、分離法の違いによる細胞増殖能には有意な差が認められず、Tanaka ら³⁰⁾が報告した、酵素法で分離した PDL 細胞の方が outgrowth 法で分離した PDL 細胞に比べ高い細胞増殖能を示すという結果とは異なっていた。本研究で DF-EZ 群、PDL-EZ 群の分離に使用した酵素は collagenase (3 mg/ml) / dispase (4 mg/ml) であり、Tanaka ら³⁰⁾の報告で使用された trypsin-EDTA とは異なる組成であったことから、細胞の単離に差が生じた可能性がある。Jeon⁴⁰⁾らは、本研究と同じく collagenase (3 mg/ml) / dispase (4 mg/ml) を用いて分離した SHED (e-SHED) と、outgrowth 法により分離した SHED (o-SHED) を比較し、細胞増殖において両者に明らかな差は認められなかったと報告している。

またフローサイトメトリーにおける細胞表面抗原解析では、全群に、MSCs マーカーである CD106、CD146、CD166、CD29、CD105、CD44、CD90 および Stro-1 の発現が認められ、過去の報告と一致していた^{33, 34)}。この結果は、MSCs の特性を有する細胞が存在することを示唆している。一方で、CD14 (単球マーカー)、CD31 (内皮細胞マーカー) および CD34 (造血幹細胞マーカー) は陰性であり、我々が単離した細胞集団には、いずれも血液系細胞の混入がなかったと考えられる。また Iwasaki ら³⁵⁾は、酵素法により分離培養した PDLSCs は pericyte マーカーとして知られる CD146、CD140b、NG2 を発現し、マトリゲル上での臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) との共培養において、HUVEC が形成した網状構造周囲に PDLSCs が接着する像が観察されたこ

とから、PDLSCs は pericyte 様の性質を有する可能性が示唆されたと報告している。そこで本研究においても、pericyte マーカーである CD146、CD140b、NG2 の発現を解析した。その結果、採取組織に関わらず、酵素法で得られた細胞群 (DF-EZ、PDL-EZ) では、血管内皮接着分子である CD106、CD166、CD29、CD105 と pericyte マーカーである CD146、CD140b、NG2 の発現が高かった。この結果は、ヒト歯根膜から酵素法により分離培養した PDLSCs は MSC マーカーと pericyte マーカーの両方に陽性であったという Iwasaki ら³⁵⁾の報告と一致する。したがって本研究の結果は、outgrowth 法で分離した細胞と比較し、酵素法で分離した細胞の中には多くの pericyte 様の性質を持った細胞が存在していたことを示す。

分化誘導前の RT-PCR により、全細胞群で骨芽細胞関連遺伝子である *Runx2*、*Type I collagen*、*Osterix*、歯根膜関連遺伝子である *Scleraxis*、*GDF5*、*Tenascin-N*、*Periostin*、セメント質関連遺伝子である *CAP*、*CEMP1* の発現が認められた。これらの遺伝子発現パターンから、本研究の細胞は、いずれも内在性に歯周組織関連細胞の特性を有している細胞集団であることが示唆された。また、歯根膜関連遺伝子の 1 つである *Tenascin-N* の発現は、DF 群と比較して PDL 群で顕著に高かった。この結果は、*Tenascin-N* の発現は歯小囊から歯根膜への分化段階で増加するという Nishida ら⁴¹⁾の報告と一致する。セメント質関連遺伝子である *CAP*、*CEMP1* の発現は、本研究で用いた 4 種類の細胞群と比較して、DP で著しく低かった。*CEMP1* の発現は、DF 群と比較して PDL 群で高い傾向がみられた。*CAP* は、セメント芽細胞に発現している 65 kDa のタンパク質であり、セメント質形成における関与が示唆されている⁴²⁾。*CEMP1* は、cementum protein-23 (CP-23) と呼ばれ、セメント芽細胞、一部の歯根膜細胞、歯根膜中の血管周囲に局在する細胞に強く発現していることが報告されている⁴³⁾。また別の報告では、*CEMP1* はセメント芽細胞関連細胞のマーカーであるだけでなく、歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化を制御すると言われている⁴⁴⁾。このことから、本研究で用いた PDL-EZ 群、PDL-OG 群の細胞の一部には、セメント芽細胞へコミッ

トした細胞が多く存在していると考えられる。また、ES 細胞や iPS 細胞の多分化能の維持に関与する転写因子として知られている *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* は、全群で mRNA の発現が認められた^{45,46)}。これらの結果から、いずれの細胞群にもきわめて未分化な細胞の存在が示唆される。

多分化能の評価に関しては、骨芽細胞／セメント芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への各種分化誘導により、全群で組織特異的染色に陽性を示し、骨芽細胞／セメント芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能が認められた。この結果は、Tanaka ら³⁰⁾が報告した、outgrowth 法により分離培養した PDL 細胞は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化はいずれもほとんどみられないという報告とは異なる結果となった。本研究ではさらに定量評価を行い、骨分化誘導においては DF 群、脂肪分化誘導においては EZ 群で、それぞれ石灰化結節と脂肪小滴の形成量が有意に多かった。フローサイトメトリや RT-PCR、細胞増殖能の結果と合わせて考えると、DF 群は未分化な細胞が多いのに対し、PDL 群は分化の進んだ細胞集団であり、また、EZ 群は pericyte 様の特徴を持つ MSCs が多く存在する比較的均一な細胞集団であるのに対し、OG 群は、ES/iPS 細胞関連遺伝子を発現する未分化な細胞から、歯根膜線維芽細胞やセメント芽細胞の細胞系譜へコミットしているような前駆細胞まで存在するヘテロな細胞集団で構成されている可能性が示唆された。

移植による硬組織形成能の評価では、コラーゲンゲル／HA の担体と共に移植した 4 種類の細胞により、全群で HA 周囲に HTLT の形成がみられた。一方で、細胞を含まないコントロールである担体のみの移植では、HA 周囲にこのような組織形成はみられなかった。細胞移植により形成された HTLT の周囲には、抗ヒト vimentin 抗体に陽性反応を示す細胞が存在した。このことから、HTLT の形成には、移植した抗ヒト vimentin 抗体陽性細胞の存在が必須であったと考えられる。しかしながら、ホストであるマウスの細胞も HTLT の形成に直接的・間接的に関与した可能性がある。

HTLT は Masson's trichrome 染色で青色に染色されたことから、コラーゲン線維を多

く含むと考えられる⁵¹⁾。細胞を含まない担体のみの移植によっても、Masson's trichrome 染色で青色に染色されるコラーゲン線維が観察された。細胞移植により形成された HTLT を構成するコラーゲン線維は、移植細胞が形成したもののみとは限定できず、ホストであるマウス由来のものも含まれた可能性がある。

本研究と同じように担体と共にヒトのセメント質由来の細胞を免疫不全マウスの皮下に移植した報告では、骨髄由来の間質細胞の移植により形成された骨組織とは異なり、基質には層状構造と血管侵入のないセメント質様組織が形成された⁴⁷⁾。本研究でDF-EZ群、PDL-EZ群、PDL-OG群によりマウス皮下に形成されたHTLTも、基質が層状構造を欠き、血管の侵入もみられなかった。また抗CAP抗体に対して陽性反応を示した。CAPはセメント質やPDL中のセメント芽細胞とその前駆細胞に特異的に発現することが報告されている⁴²⁾。このことから、本研究の移植片中にはセメント質様組織 (cementum-like tissue; CLT) が形成されたと考えられる。OPNは α V β 3 integrinを介し、セメント芽細胞の細胞外基質への接着に関与しているといわれている⁴⁸⁾。また、OCNはセメント芽細胞の成熟型への最終分化に関与すると考えられている⁴⁹⁾。DF-EZ群、PDL-EZ群、PDL-OG群の移植片中に形成されたCLTは、抗OPN抗体に陽性で、弱いながらも抗OCN抗体とも反応したことから、移植により形成されたCLTは、比較的石灰化度が低い硬組織であると考えられる。

またセメント質は有細胞セメント質、無細胞セメント質の2種類に大別される⁵⁰⁾。PDL-OG群の移植片中に観察されたCLTは、細胞成分を欠く基質と、基質中に細胞が埋入された基質の2種類に分類された。前者は無細胞セメント質、後者は有細胞セメント質に近似した組織と考えられる。この有細胞セメント質様硬組織は、他の細胞種の移植では一例も認められなかった。このことから、PDL-OG群は他群よりもセメント質形成能が高いことが示唆された。

PDL-EZ群の移植片中のCLTにも、抗ヒトvimentin抗体陽性の細胞を認めた。これらの細胞は細胞塊を形成し、PDL-OG群の移植片でみられた一つ一つが単独に存在する

埋入細胞や、ヒト生体の有細胞セメント質内にみられる典型的なセメント細胞の局在とは異なっていた。

一方、DF-OG群の移植片では形成される組織量が少なく、抗CAP抗体との反応もほとんどみられず、セメント質としての特性が不十分な組織が形成された可能性がある。*in vitro*の結果を考え合わせると、PDL群はDF群と比較してセメント芽細胞・前駆細胞系譜へコミットした細胞が多く存在し、これらがセメント質様組織の形成に寄与したと考えられ、DF-EZ群はDF-OG群よりもMSCsが多く存在するため、同じDFに由来する細胞であっても、より多くの細胞がセメント芽細胞へ分化しCLTの形成に寄与した可能性が考えられる。

以上の結果より、DF-EZ 群、DF-OG 群、PDL-EZ 群、PDL-OG 群はいずれも MSCs の性質を有し、歯や歯周組織の再生に有用となりうるが、特に生体内におけるセメント質の再生には、PDL-OG 群が有力なバイオリソースと考えられる。

結 論

本研究で得られた4種類の細胞集団は、全群が間葉系幹細胞マーカーに陽性で、未分化維持関連遺伝子を発現し、多分化能を持つことから、いずれの細胞群にも間葉系幹細胞の存在が示唆された。また、これらの4種の細胞集団は、すべて硬組織形成能を有しており、セメント質関連遺伝子も発現していたことから、いずれも歯や歯周組織の再生に有用なバイオリソースと考えられた。特に、PDL-OG群はセメント質形成能が高いことが示唆された。

謝 辞

本論文を執筆するにあたり、全過程において御指導頂きました明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野 須田直人教授、ならびに日本歯科大学生命歯学部発生・再生医科学講座 中原貴教授に心より感謝申し上げます。また、本論文をご精読頂き有用な御助言を賜りました明海大学歯学部形態機能成育学講座解剖学分野 天野修教授、口腔生物再生医工学講座生化学分野 友村明人教授、機能保存回復学講座保存治療学分野 横瀬敏志教授に深謝致します。本研究に対して多くの御協力を頂いた明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野の教室員の皆様、ならびに日本歯科大学生命歯学部発生・再生医科学講座の皆様に厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究（B）25293422）および2015年度宮田研究奨励金（E）の助成により行われた。

引用文献

1. Brezniak N and Wasserstein A: Root resorption after orthodontic treatment: Part 1. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 103, 62-66, 1993
2. McLaughlin DK: Quantitative determination of root resorption during orthodontic treatment. *Am J orthod* 50, 143, 1964
3. Yagi Y, Suda N, Yamakoshi Y, Baba O and Moriyama K: *In vivo* application of amelogenin suppresses root resorption. *J Dent Res* 88, 176-181, 2009
4. Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K, Okano T and Ishikawa I: Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials* 14, 2716-2723, 2009
5. Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, Sakamoto K, Tauchi R, Wakao N, Imagama S, Hibi H, Kadomatsu K, Ishiguro N and Ueda M: Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest* 122, 80-90, 2012
6. Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, Sekiguchi K, Nakagawa M, Parmar M and Takahashi J: Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports* 2, 337-350, 2014
7. Tanaka T, Yokoi T, Tamalu F, Watanabe S, Nishina S and Azuma N: Generation of retinal ganglion cells with functional axons from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 5, 8344, 2015
8. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, Pattany PM, Zambrano JP, Hu Q, McNiece I, Heldman AW and Hare JM: Allogeneic

- mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 14022–14027, 2009
9. Huang GT, Gronthos S and Shi S: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 88, 792–806, 2009
 10. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP and Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211–228, 2001
 11. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147, 1999
 12. Baksh D, Yao R and Tuan RS: Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25, 1384–1392, 2007
 13. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H and Bieback K: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294–1301, 2006
 14. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG and Gronthos S: The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 8, 191–199, 2005
 15. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL and Lo WH: Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 20, 249–258, 2002
 16. Friedenstein AJ, Gorskaja JF and Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267–274, 1976
 17. Erices A, Conget P and Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical

- cord blood. *Br J Haematol* 109, 235-242, 2000
18. Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM et al: Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22, 1338-1345, 2004
 19. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H and Sato S. *In vitro* analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology* 101, 121-132, 2013
 20. Casagrande L, Cordeiro MM, Nor SA and Nor JE: Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 99, 1-7, 2011
 21. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT and Shi S: Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 85, 966-979, 2006
 22. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG and Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13625-13630, 2000
 23. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG and Shi S: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5807-5812, 2003
 24. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S and Shi S: Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 1:e79, 2006
 25. Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C and Hoffmann KH: Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 24, 155-165, 2005
 26. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY and Shi S: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364, 149-155, 2004
 27. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P and Geurtsen W: Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic

- differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 88, 130–141, 2011
28. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, Xu GT, Liang A and Liu S: Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 33, 627-638, 2015
 29. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, and Narayanan AS: Cementum matrix formation *in vivo* by cultured dental follicle cells. *Bone* 31, 606-611, 2002
 30. Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M, Ishikawa I and Izumi Y: Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. *Arch Oral Biol* 56, 380–388, 2011
 31. Karamzadeh R, Eslaminejad MB and Aflatoonian R: Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp* 69, 1–10, 2012
 32. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrechts I and Bronckaers A: Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* 353, 65–78, 2013
 33. Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Ohshima A, Sobajima S, Tadokoro M, Katsube Y, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Go MJ, Adachi H, Yokota Y, Kirita T and Ohgushi H: Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation* 76, 495–505, 2008
 34. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM and Gronthos S: Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol* 219, 667–676, 2009
 35. Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, Takeda M, Oda S,

- Izumi Y and Morita I: Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *J Periodontol* 84, 1425-1433, 2013
36. Miyazaki T, Miyauchi S, Tawada A, Anada T, Matsuzaka S and Suzuki O: Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 217, 769-777, 2008
 37. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM and Yoo JU: *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238, 265-272, 1998
 38. Tominaga N, Nakahara T, Nasu M and Satoh T: Isolation and characterization of epithelial and myogenic cells by "fishing" for the morphologically distinct cell types in rat primary periodontal ligament cultures. *Differentiation* 85, 91-100, 2013
 39. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC and Choung PH: Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 13, 767-773, 2007
 40. Jeon M, Song JS, Choi BJ, Choi HJ, Shin DM, Jung HS and Kim SO: *In vitro* and *in vivo* characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. *Arch Oral Biol* 59, 1013-1023, 2014
 41. Nishida E, Sasaki T, Ishikawa SK, Kosaka K, Aino M, Noguchi T, Teranaka T, Shimizu N and Saito M: Transcriptome database KK-Periome for periodontal ligament development: expression profiles of the extracellular matrix genes. *Gene* 404, 70-79, 2007
 42. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T and Narayanan AS: Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 29, 242-248, 2001
 43. Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B and Arzate H: Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 38, 409-419, 2006

44. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y and Morita I: Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 227, 649–657, 2012
45. Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K, Mori E, Okada Y, Takahashi K, Homma K, Oyamada N, Inuzuka M, Sonoyama T, Ebihara K, Tamura N, Itoh H, Suemori H, Nakatsuji N, Okano H, Yamanaka S and Nakao K: Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 583, 1029–1033, 2009
46. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872, 2007
47. Grzesik, W. J., Cheng, H., Oh, J. S., Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Uzawa, K., Robey, P. G., and Yamauchi, M: Cementum-forming cells are phenotypically distinct from bone-forming cells. *J Bone Miner Res* 15, 52–59, 2000.
48. McKee MD and Nanci A: Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect Tissue Res* 35, 197-205, 1996
49. Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A and Somerman MJ: Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 17, 1441–1451, 2002
50. Lézot F, Davideau JL, Thomas B, Sharpe P, Forest N and Berdal A: Epithelial Dlx-2 homegene expression and cementogenesis. *J Histochem Cytochem* 48, 277-84, 2000
51. 山田正人, 吉元真, 水口國雄 : I . 病理検査. In : 新 染色法のすべて. 水口國雄編, 医歯薬出版, 東京, pp10-13, 1999

Figure legends

Fig. 1 Morphological characteristics and proliferation of DF-EZ, DF-OG, PDL-EZ and PDL-OG cells. (A) Appearance of adherent clonogenic cell cluster formed by EZ-treated cells after 14 days of culture. (B) Appearance of explants and outgrown cells. The cells outgrew from the DF or PDL tissue after from 2 to 4 days of culture. The explant of PDL-EZ is shown as representative sample. Scale bars=100 μ m. (C) Growth curves for DF-EZ, DF-OG PDL-EZ and PDL-OG cells during 12 days of culture. DF-derived cells exhibited significantly greater growth than PDL-derived cells, while no significant differences were observed between EZ-treated cells and OG-treated cells. Data were obtained from three independent experiments, with all samples run in triplicate. The data are represented as mean \pm standard deviation (*P < 0.05).

Fig. 2 Flow cytometric analysis of cell surface antigen expression in DF-EZ, DF-OG, PDL-EZ and PDL-OG cells. (A) Expression of CD29, CD44, CD90, STRO-1, CD14, CD31, CD34 in DF and PDL cells. Representative results among three independent experiments are shown. (B) Y-axis indicates the percentage of positive cells. The expressions of CD105, CD146 and CD166 differed significantly between the two isolation methods. The expression levels of pericyte markers, CD140b and NG2, were significantly higher in EZ-treated cells than in OG-treated cells. The data are represented as mean \pm standard deviation (*P < 0.05).

Fig. 3 Gene expression profiles in DF-EZ, DF-OG, PDL-EZ and PDL-OG cells. (A) Marker genes for pluripotent stem cells (*Nanog*, *Oct3/4* and *Sox2*) osteogenic cells (*Runx2*, *Type I collagen* and *Osterix*) and PDL (*Scleraxis*, *GDF5*, *Tenascin-N*, *Periostin*) were

examined by RT-PCR before induction of cell differentiation. **(B)** The results of semi-quantitative RT-PCR before induction. All four types of cells expressed *CAP* and *CEMP1* (specific markers for cementum) before induction. The expressions of these markers were hardly expressed in the cells derived from human dental pulp (DP).

Fig. 4 *In vitro* multilineage differentiation of DF-EZ, DF-OG, PDL-EZ and PDL-OG cells. **(A-D)** Alizarin red staining indicating the deposition of mineralization in DF-EZ **(A)**, DF-OG **(B)**, PDL-EZ **(C)** and PDL-OG **(D)** cells. All cells were cultured in the osteogenic/cementogenic induction medium for 3 weeks. No mineralized nodule formation was observed in control culture **(A-D inset)**. Scale bars=100 μ m. **(E)** Quantification of Alizarin Red S staining. Dye accumulation data were obtained from three separate experiments, with all samples run in triplicate. The data are represented as mean \pm standard deviation (* $P < 0.05$). **(F, G)** Gene expression patterns of *CAP* **(F)** and *CEMP1* **(G)** in DF-EZ, DF-OG, PDL-EZ and PDL-OG cells after 3 weeks of culture in the osteogenic/cementogenic induction medium. The gene expression level of DP was set as the control (normalized to one). Data were obtained from three independent experiments, with all samples run in quadruplicate. Representative results are shown. The data are represented as mean \pm standard deviation (* $P < 0.05$). **(H-K)** Oil red O-staining indicating lipid clusters in DF-EZ **(H)**, DF-OG **(I)**, PDL-EZ **(J)** and PDL-OG **(K)** cells cultured in the adipogenic induction medium for 3 weeks. No lipid clusters were observed in in control culture **(H-K inset)**. Scale bars=100 μ m. **(L)** Quantification of Oil Red O staining. Dye accumulation data were obtained from three separate experiments, with all samples run in triplicate. The data are represented as mean \pm standard deviation (* $P < 0.05$). **(M-X)** Chondrogenic differentiation. **(M-P)** Alcian Blue staining. **(Q-T)** Safranin O staining. **(U-X)** Immunohistochemical staining for type II collagen. **(M, Q and U)** DF-EZ cells. **(N, R and V)** DF-OG cells. **(O, S and W)**

PDL-EZ cells. (**P, T and X**) PDL-OG cells. Scale bars=50 μ m.

Fig. 5 Histological observation of transplants of DF-EZ, DF-OG, PDL-EZ and PDL-OG cells. (**A–E**) Hematoxylin and eosin staining. (**F–J**) Masson's trichrome staining. Transplants of carrier (HA and collagen gel) solely are shown in **A** and **F**. Transplants of carrier with DF-EZ (**B** and **G**), or DF-OG (**C** and **H**), or PDL-EZ (**D** and **I**) or PDL-OG (**E** and **J**) cells. Hard tissue-like structures are shown between arrows in **B–E** and **G–J**. Blood vessels are shown as **v** in **A, F** and **J**. Boxed areas in **E** and **J** are shown in higher magnification in each inset, and embedded cells are shown by arrowheads. HA: hydroxyapatite. Representative sections are shown (n=5). Scale bars=100 μ m.

Fig. 6 Immunohistochemical staining of transplants of DF-EZ, DF-OG, PDL-EZ and PDL-OG cells. Immunohistochemical staining for vimentin (**A–E**), osteopontin (**F–J**), osteocalcin (**K–O**), and cementum attachment protein (CAP) (**P–T**). (**A, F, K** and **P**) Transplants of carrier (HA and collagen gel) solely. Transplants of carrier with DF-EZ (**B, G, L** and **Q**), or DF-OG (**C, H, M** and **R**), or PDL-EZ (**D, I, N** and **S**) or PDL-OG (**E, J, O** and **T**) cells. Hard tissue-like structures are highlighted by dotted lines in **B–E, G–I, L–N** and **Q–S**, and also between arrows in **E, J, O** and **T**. Boxed areas in **D, E, O** and **T** are shown in higher magnification in each inset, and embedded cells are shown by arrowheads. Note that these embedded cells formed cluster in PDL-EZ transplants (in **D**) but were seen isolated in PDL-OG transplants (in **E, J, O** and **T**). HA; hydroxyapatite, OPN; osteopontin, OCN; osteocalcin; CAP; cementum-attachment protein. Representative sections are shown (n=5). Scale bars=100 μ m.

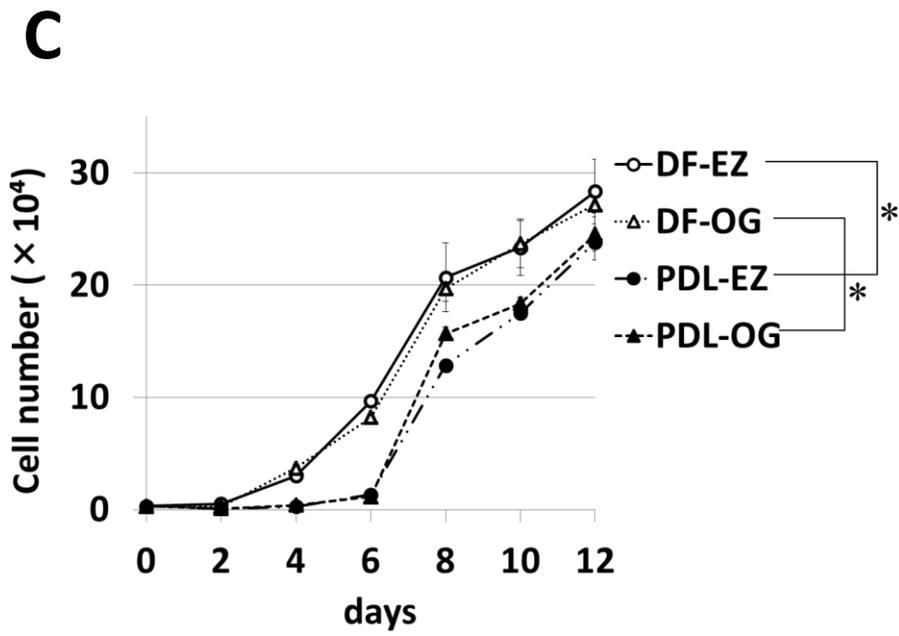
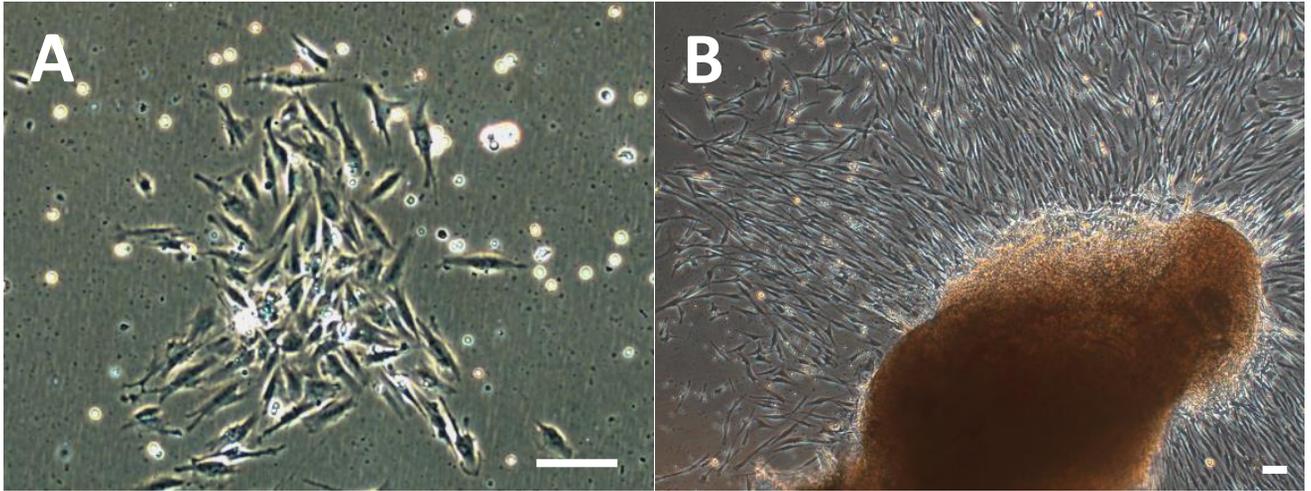
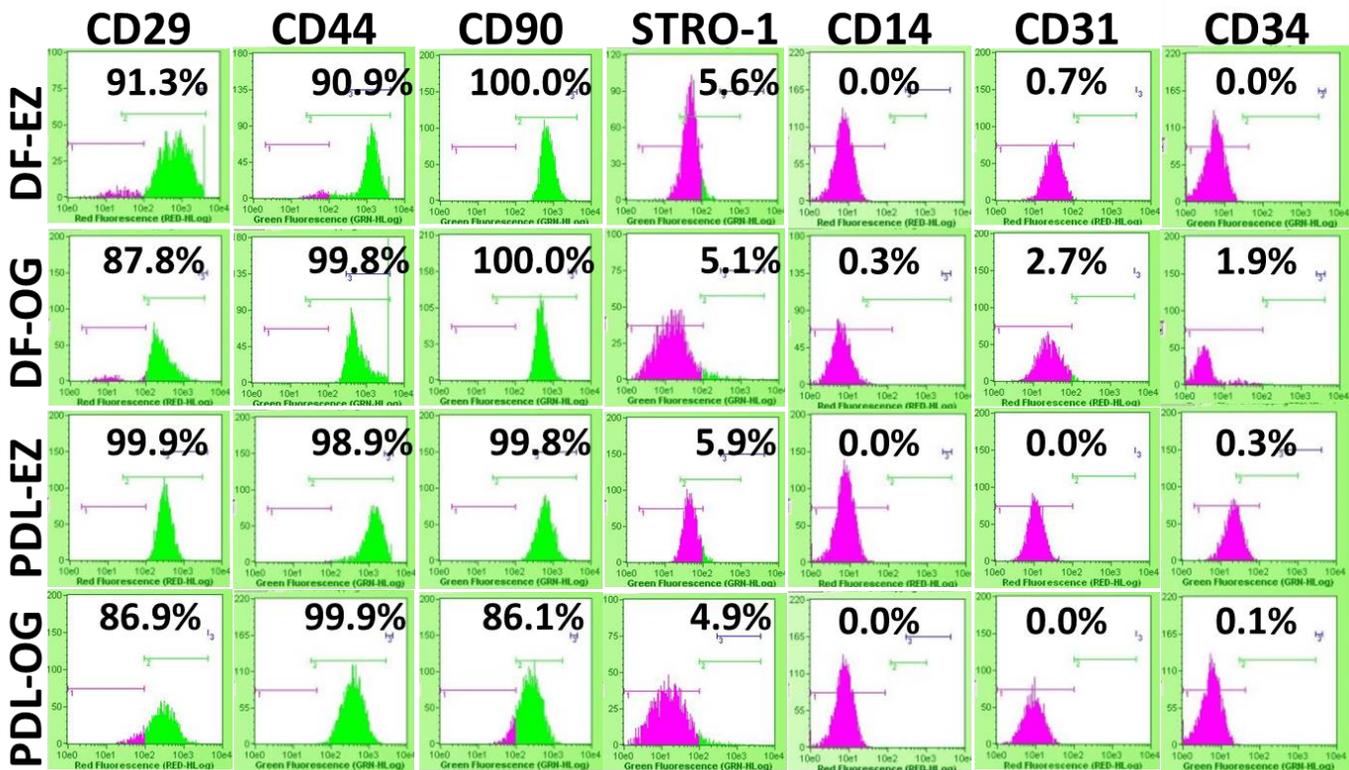
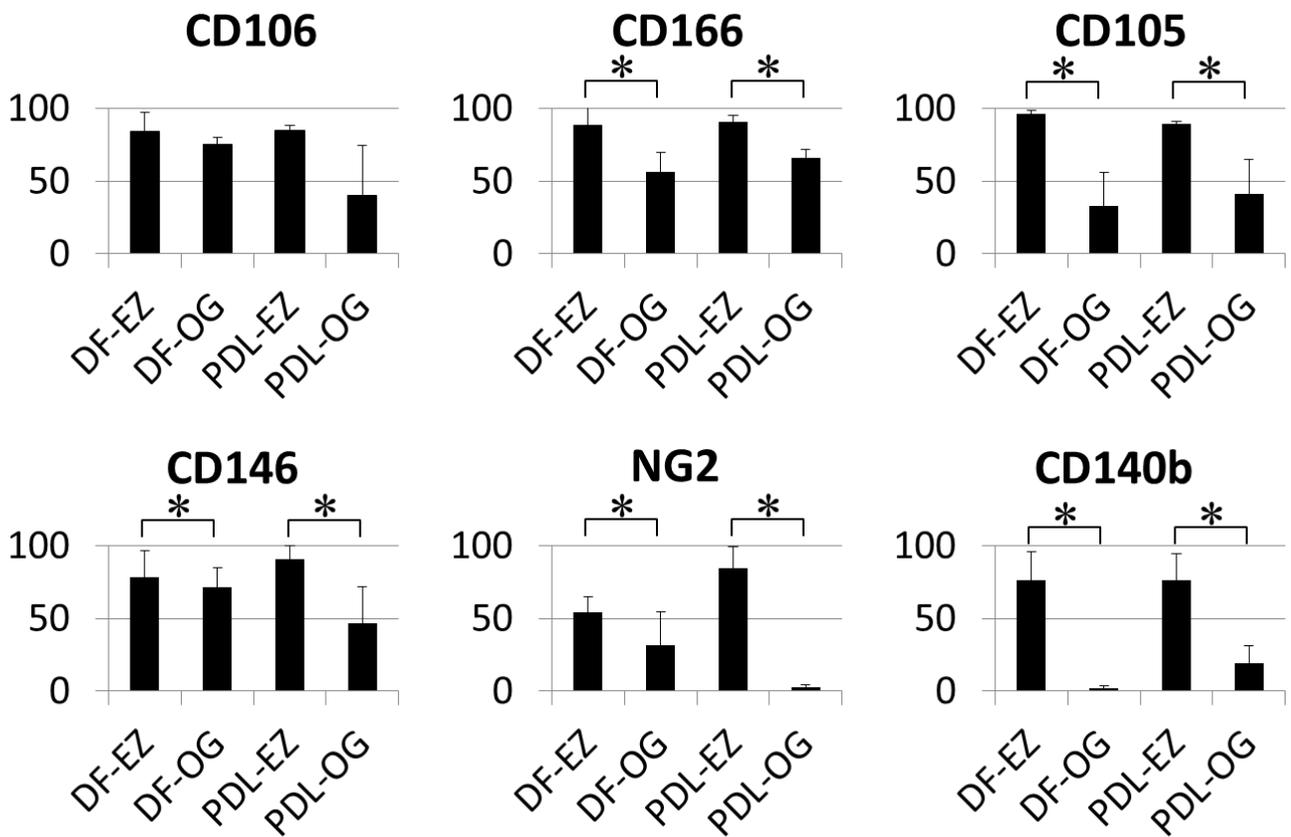
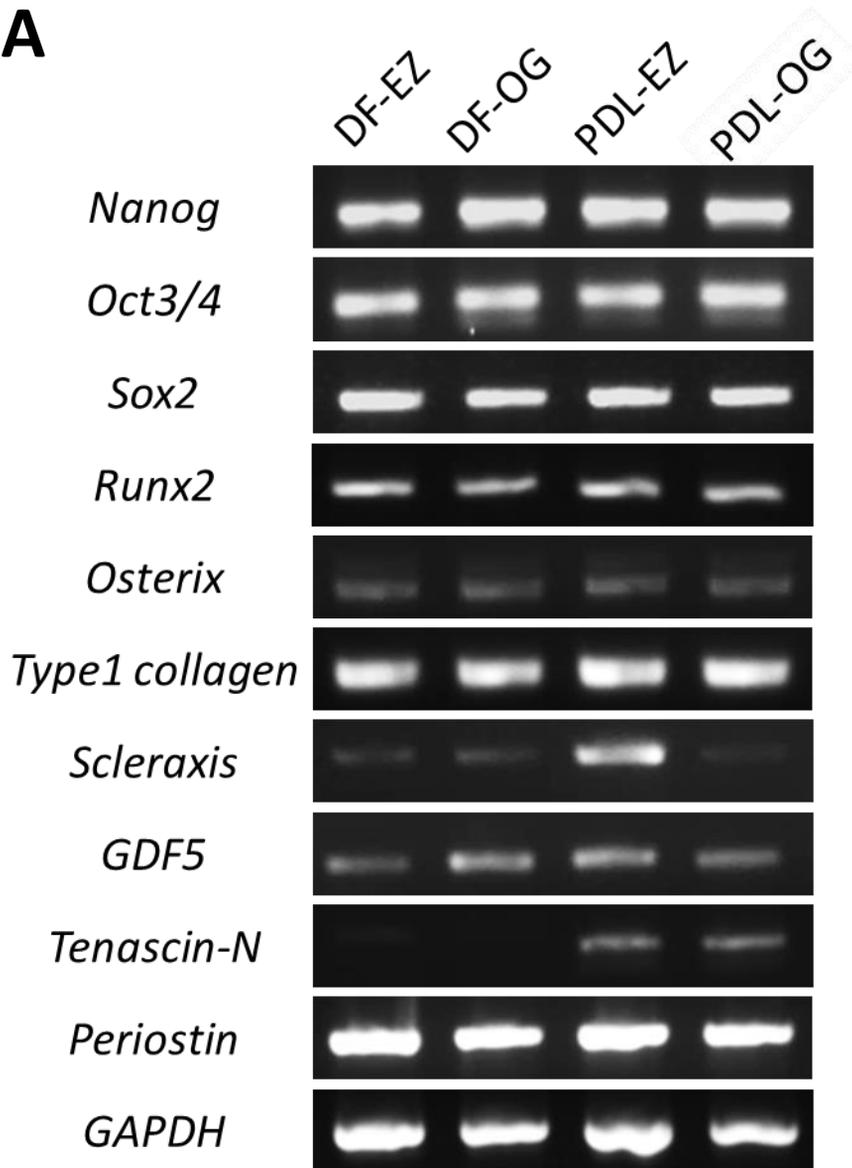
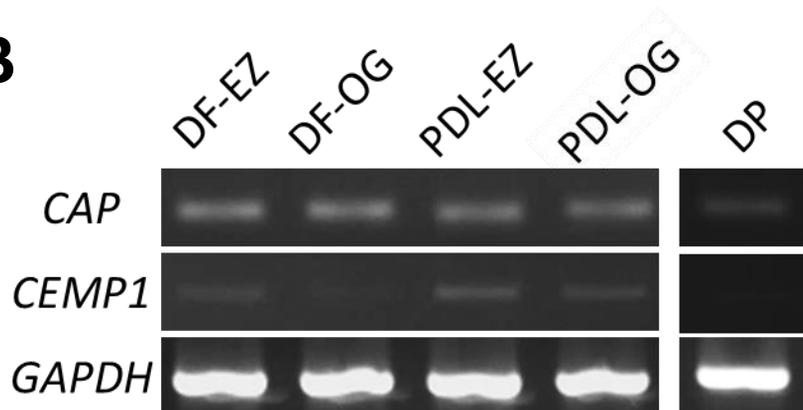


Figure 1

A**B****Figure 2**

A**B****Figure 3**

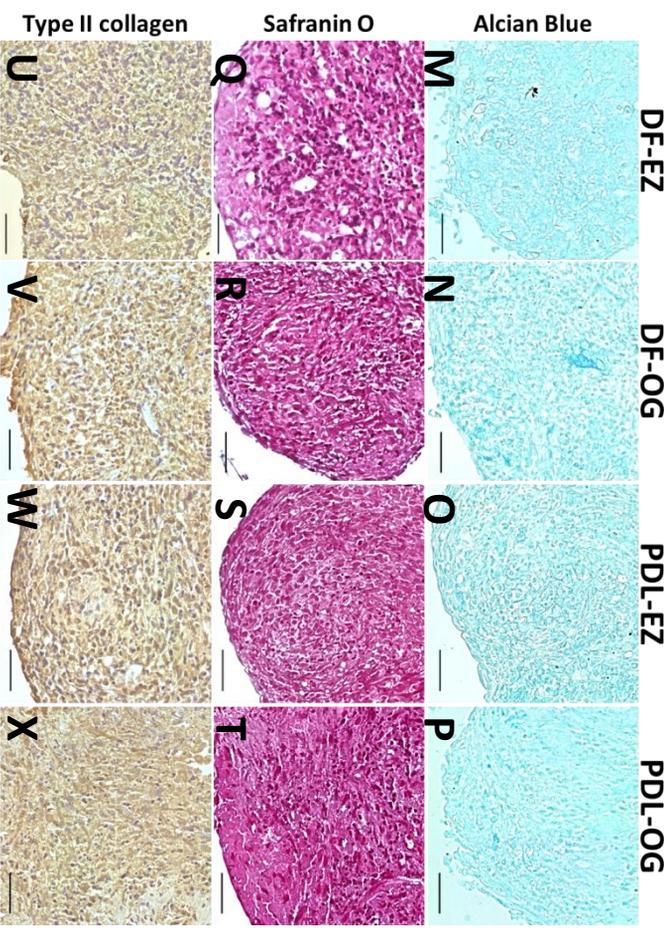
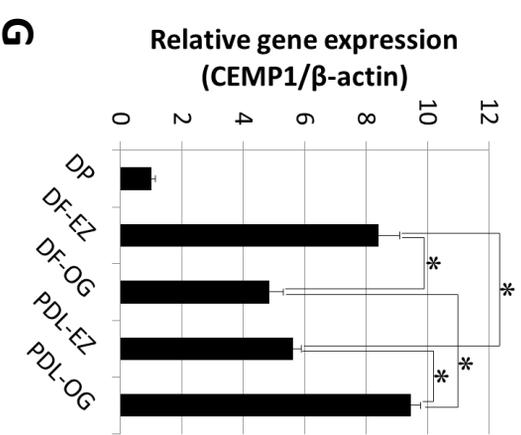
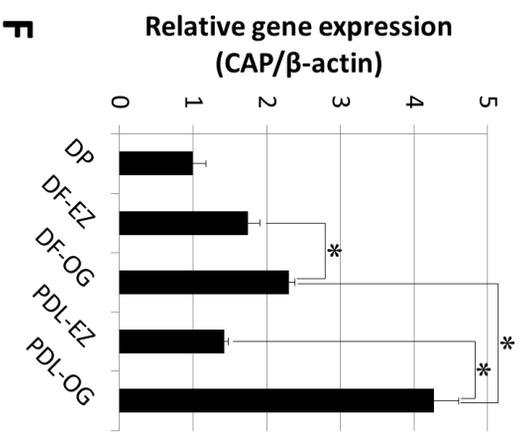
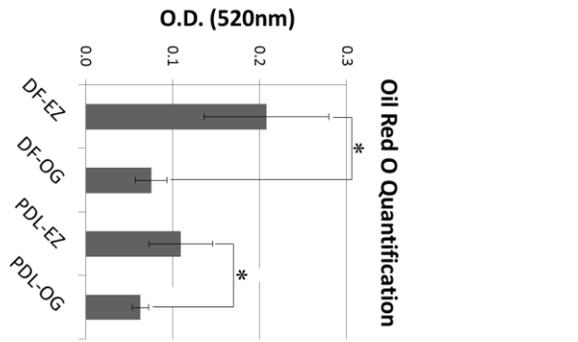
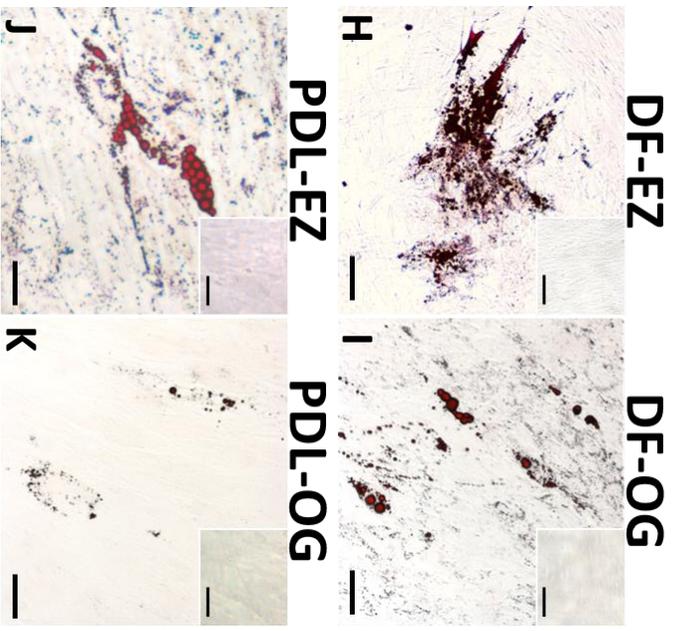
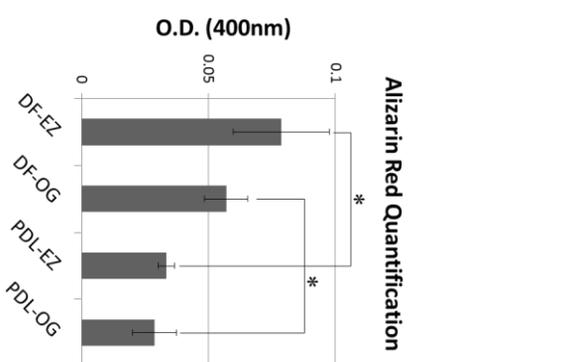
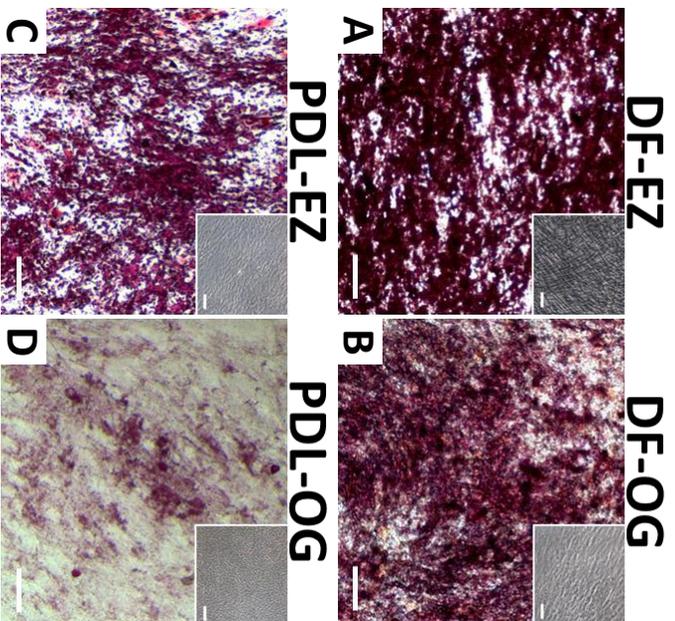


Figure 4

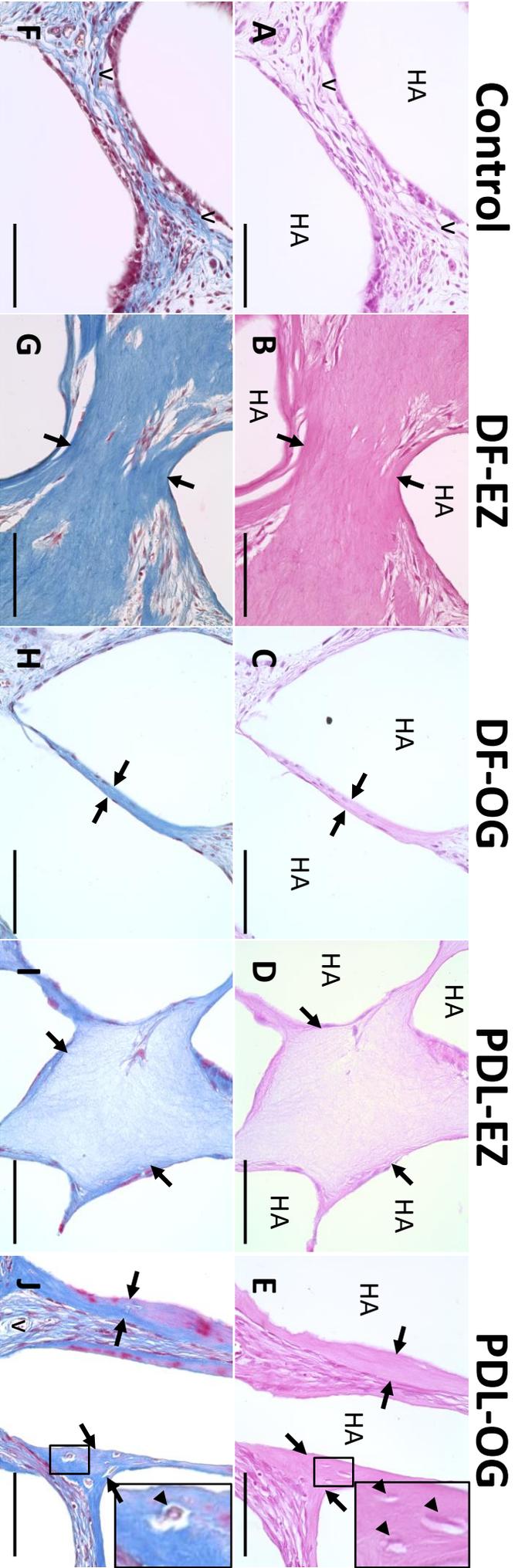


Figure 5

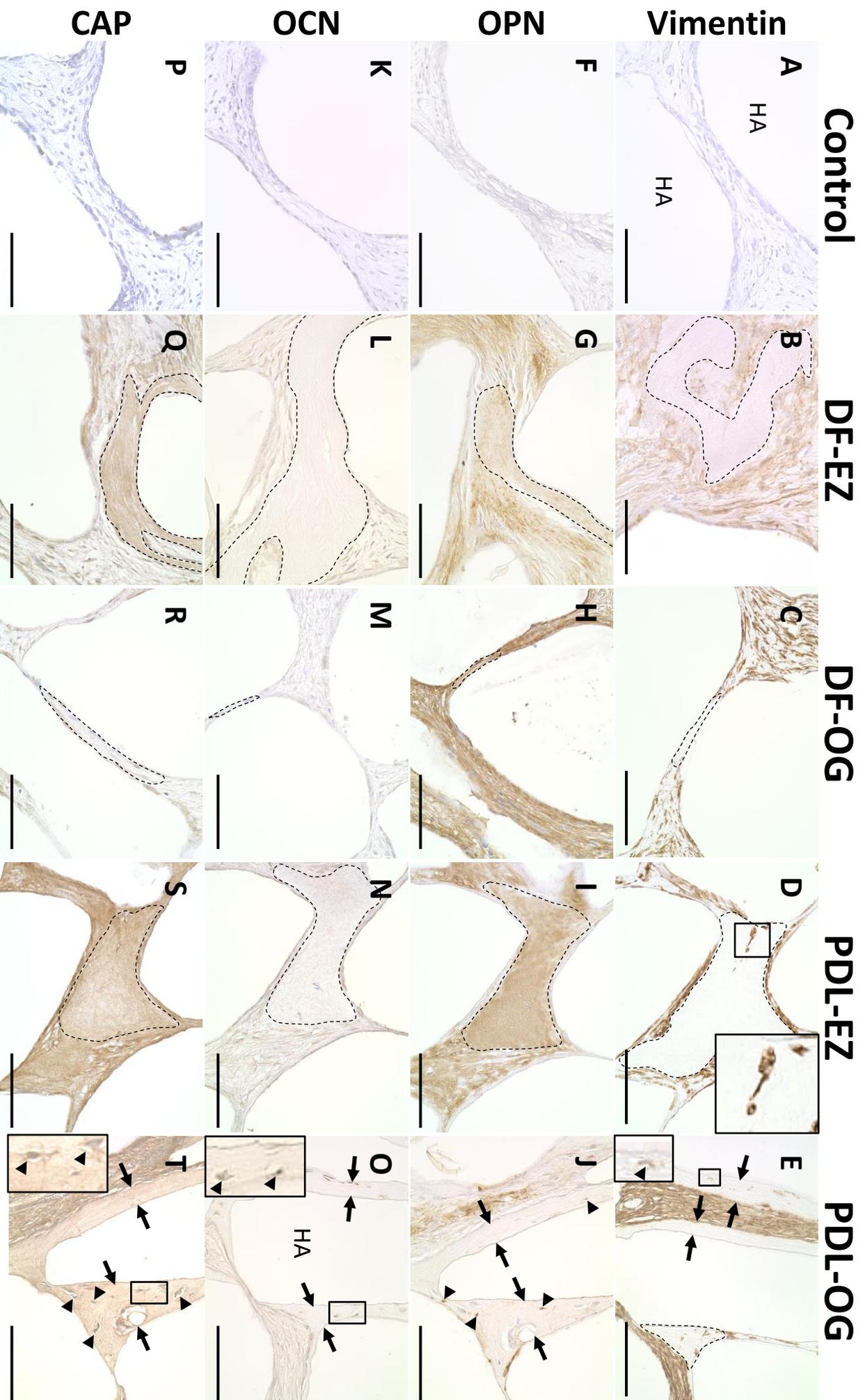


Figure 6

Table 1 Primer sequences for RT-PCR analysis

<i>Genes</i>		<i>Primer sequence (5'→3')</i>	<i>Product size (bp)</i>	<i>Accession number</i>
Nanog	Forward	ACCTTCCAATGTGGAGCAAC	199	NM_024865.2
	Reverse	GAATTTGGCTGGAAGTGCAT		
Sox2	Forward	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG	151	NM_003106
	Reverse	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG		
Oct3/4	Forward	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	144	NM_001173531
	Reverse	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC		
Runx2	Forward	CCCCACGACAACCGCACCAT	292	NM_004348
	Reverse	GTCCACTCCGGCCCACAAATC		
Osterix	Forward	ATGTCTTGCCCCAAGATGTC	408	NM_152860
	Reverse	GCAGGCAGGTGAACTTCTTC		
Type I collagen	Forward	CCAAATCTGTCTCCCCAGAA	214	NM_000088
	Reverse	TCAAAAACGAAGGGGAGATG		
Scleraxis	Forward	CTGGCCTCCAGCTACATCTC	224	NM_001008271
	Reverse	CGGTCCTTGCTCAACTTCT		
GDF5	Forward	CCCATCAGCATCCTCTTCAT	192	NM_000557
	Reverse	TGTAGATGCTCCTGCCACAG		
Tenascin-N	Forward	ACAGGTCAGTGCAGCCACA	250	NM_022093
	Reverse	CTCCACCATCTCTTCTCCA		
Periostin	Forward	CACAACCTGGAGACTGGAC	322	NM_006475.2
	Reverse	GTGTCTGCTGGATAGAGGAG		
CAP	Forward	TTTTTCTGGTCGCGTGGACT	142	NM_014241.3
	Reverse	TCACCAGCAACTCCAACAGG		
CEMP1	Forward	CAGGACAGCACCTGTAAGCA	396	NM_001048212
	Reverse	GGATGACCAGCGTTCTGTTT		
GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	238	NM_002046
	Reverse	TTGATTTGGAGGGATCTCG		

Abbreviations: Runx2, gene encoding runt-related protein 2; GDF5, gene encoding growth differentiation factor 5; CAP, gene encoding cementum attachment protein; CEMP1, gene encoding cementoblastoma-derived protein 1; GAPDH, gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.