

- Wills-Karp, M., 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 255–281.
- Wolff, B., Burns, A.R., Middleton, J., Rot, A., 1998. Endothelial cell “memory” of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel–Palade bodies. *J. Exp. Med.* 188, 1757–1762.
- Yao, L., Pan, J., Setiadi, H., Patel, K.D., McEver, R.P., 1996. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J. Exp. Med.* 184, 81–92.
- Yoshimura, A., Naka, T., Kubo, M., 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 454–465.

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31⁺/CD146⁻ side population cells from a canine tooth

Aim: To achieve complete regeneration of dental pulp *in vivo* by stem/progenitor cells obtained from a fraction of side population (SP) cells from canine pulp. **Materials & methods:** A subfraction of SP cells, CD31⁺/CD146⁻ SP cells, were isolated by flow cytometry from canine dental pulp. The efficiency of this subfraction of SP cells was evaluated in an experimental model of pulp injury in the dog. **Results:** The fractionated SP cells formed extensive networks of tube-like structures *in vitro*. Transplantation of the SP cells into an *in vivo* model of amputated pulp resulted in complete regeneration of pulp tissue with capillaries and neuronal cells within 14 days. Gene-expression studies demonstrated the expression of pro-angiogenic factors, implying trophic action on endothelial cells. **Conclusions:** This investigation demonstrates the potential utility of fractionated SP cells as a source of cells for total pulp regeneration complete with angiogenesis and vasculogenesis.

KEYWORDS: amputated pulp CD31 dental pulp stem cells dentinogenesis pulp regeneration side population cells

Dental caries is one of the most prevailing health problems, causing early loss of dental pulp and resultant tooth loss. Dental pulp is critical for maintenance of homeostasis of teeth and essential for longevity of teeth and quality of life. Therefore, regeneration of pulp is an unmet need in endodontics and dentistry. The vascular system in dental pulp plays a role in nutrition and oxygen supply and functions as a conduit for the transport of metabolic waste. Cellular elements of blood vessels, such as endothelial cells, pericytes and associated cells, and nerves contribute to pulpal homeostasis. Thus, angiogenesis/vasculogenesis and neurogenesis are critical for pulp regeneration [1]. Vascularization during pulpal wound repair and regeneration may be due to angiogenesis (formation of blood vessels by endothelial cells) and vasculogenesis (formation of new blood vessels by angioblasts derived from bone marrow and by endothelial progenitor cells from circulating peripheral blood) [2]. The precise origin and mechanism of angiogenesis/vasculogenesis during the pulpal wound-healing process are not known. It has been proven that dental pulp has the ability to regenerate in teeth with incomplete apical closures [3,4]. There has been no report, however, on successful angiogenesis/vasculogenesis and pulp regeneration on the amputated pulp or disinfected root canals in teeth with complete apical closure without cell transplantation or without protein application. Endothelial progenitor cells (EPCs) home in to sites of neovascularization and differentiate into

endothelial cells *in situ* [5]. This prompted us to explore cell therapy for angiogenesis/vasculogenesis and pulp regeneration to treat pulp injury. EPCs have been identified by cell-surface markers, AC133, CD34, VEGFR2, CXCR4 and c-Kit [5-7], and they have been shown to express endothelial markers, CD31 (PECAM) and CD146, following further differentiation [8]. We have recently isolated a distinct population of CD34⁺, VEGFR2/Fli1⁺, CD31⁺/CD146⁻ side population (SP) cells from porcine dental pulp that differentiate into endothelial cells *in vitro* and have been shown to enhance revascularization of hindlimb ischemia [9]. In the present study, we further examined the potential utility of this subfraction of cells from dog dental pulp for angiogenesis/vasculogenesis and pulp regeneration in a surgically amputated model of pulp injury.

Materials & methods

Cell isolation by flow cytometry

Canine primary pulp cells were separated from pulp tissues that had been extracted from one upper canine and then labeled with Hoechst 33342 (Sigma, St Louis, MO, USA), as previously described [10]. The isolated SP cells were cultured in EBM2 (Cambrex Bio Science, Walkersville, MA, USA) supplemented with IGF (Cambrex Bio Science), EGF (Cambrex Bio Science) and 10% fetal bovine serum (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). The SP cells at the second passage were further

Koichi Iohara,
Li Zheng, Masataka Ito,
Ryo Ishizaka,
Hiroshi Nakamura,
Takeshi Ito,
Kenji Matsushita &
Misako Nakashima^{*}
Author for correspondence:
Department of Oral Disease
Research, National Institute for
Longevity Sciences,
National Center for Geriatrics
& Gerontology, Obu, Aichi
474-8522, Japan.
Tel: +81 562 44 5651 ext. 5053;
Fax: +81 562 46 2684;
E-mail: misako@nls.go.jp
Department of Developmental
Anatomy & Regenerative
Medicine, National Defense
Medical College, Tokorozawa,
Saitama 359-8513, Japan.
Department of Pediatric
Dentistry, School of Dentistry,
Aichi Gakuin University,
Nagoya, Aichi 464-8651, Japan.
Department of Endodontology,
School of Dentistry,
Aichi Gakuin University,
Nagoya,
Aichi 464-8651, Japan

subfractionated into CD31⁺ and CD31⁺ SP cells after labeling. The cells were then resuspended in HEPES buffer containing 2 µg/ml propidium iodide (Sigma). Analysis/sorting of cells was performed using a flow cytometer JSAN (Bay Bioscience, Kobe, Japan). Each cell fraction was plated into 35 mm collagen type I-coated dishes (Asahi Technoglass Corp., Funabashi, Japan) in EBM2 supplemented with suitable growth factors and 10% fetal bovine serum (Invitrogen Corporation) to maintain each phenotype. The medium was changed every 4–5 days. When the cells had reached 50–60% confluence, they were detached by incubation with 0.02% EDTA at 37°C for 10 min and subcultured at a 1:4 dilution.

The phenotypes of canine CD31⁺ and CD31⁺ SP cells were characterized at the second, third and sixth passage of culture. They were immunolabeled with mouse IgG1 negative control (AbD Serotec Ltd, Oxford, UK), mouse IgG1 negative control (fluorescein isothiocyanate; FITC, MCA928F, AbD Serotec), mouse IgG1 negative control (Alexa 647, MRC OX-34, AbD Serotec), and antibodies against CD146 (FITC; sc-18837, Santa Cruz, Biotech, Santa Cruz, CA, USA), CD14 (Alexa Flour 647, TuK4, AbD Serotec), CD34 (Allophycocyanin, APC, IH6, R&D Systems, Inc., MN, USA) and CD105 (FITC; MEM-226, BioLegend, San Diego, CA, USA). The CD31⁺/CD146⁺ and CD31⁺/CD146⁺ SP cells were further isolated from CD31⁺ and CD31⁺ SP cells, respectively, at the third passage.

■ Endothelial cell differentiation *in vitro*

Multidishes with 96 wells were coated with 100 µl of Matrigel™ (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA). The CD31⁺/CD146⁺ and CD31⁺/CD146⁺ SP cells were seeded at the fourth passage (10⁴ cells) on the Matrigel in EGM2 (EBM2 supplemented with VEGF, basic FGF, IGF, EGF, hydrocortisone, heparin, ascorbic acid and 2% fetal bovine serum) (Cambrex Bio Science). Network formation was observed after 12 h of cultivation.

■ Autogenous *in vivo* transplantation of stem cells on the amputated pulp

An experimental model of canine pulp partial removal [11] and transplantation of the CD31⁺/CD146⁺ or CD31⁺/CD146⁺ SP cells was established in adult dogs (Narc, Chiba, Japan). At the fourth passage, both of these populations, 2 × 10⁵ cells in each, were cultured in pellets

(cellular aggregates) with scaffold (collagen type I (Cellmatrix type IA, Nitta Gelatin, Osaka, Japan) and collagen type III (Cellmatrix type III, Nitta Gelatin) [1:1]) after Dil (Sigma) labeling at a final concentration of 4.7 µg/ml at 37°C for 15 min without serum. Under anesthesia with intravenous sodium pentobarbital (Schering-Plough, Germany), surgical amputation was carried out approximately 1 mm under the cervical line by No. 018 round burr in three canine teeth per dog, and autogenous transplantation of the pellets on day 1 of cultivation was performed on the amputated pulp. The cavity was sealed with zinc-phosphate cement (Elite Cement, GC, Tokyo, Japan) and composite resin (Clearfil FII, Kuraray, Kurashiki, Japan) following treatment with a bonding agent (Clearfil Mega Bond, Kuraray). A total of 54 teeth from 18 dogs were used; six teeth transplanted with CD31⁺/CD146⁺ SP cells, six teeth transplanted with CD31⁺/CD146⁺ SP cells, two teeth without a pellet and four teeth with a scaffold only (without cells) were harvested for histology after 14 days. Six teeth, each transplanted with CD31⁺/CD146⁺ SP cells, CD31⁺/CD146⁺ SP cells and with a scaffold only (without cells) were harvested after 30 and 60 days. They were fixed in 4% paraformaldehyde (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) at 4°C overnight and embedded in paraffin wax (Sigma) after demineralization with 10% formic acid. The paraffin sections (5 µm in thickness) were morphologically examined after staining with hematoxylin and eosin.

Fluorescence microscopic images IX 71 (Olympus, Tokyo, Japan) in 5-µm thick paraffin sections of Dil-labeled transplanted cells were scanned into a computer and superimposed on to images of endothelial cell staining with anti-CD146 (sc-18837, Santa Cruz, CA, USA) and goat anti-mouse IgG-FITC (MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, USA) to examine the migration and localization of transplanted cells.

For neuronal staining, 5-µm thick paraffin sections were deparaffinized, rehydrated and boiled with Protein Unmasking solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, to retrieve antigens. Sections were then blocked for endogenous peroxidase by incubating with peroxidase-blocking reagent (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) for 10 min. After incubation with 2.5% normal goat serum to block nonspecific binding, they were incubated with an antineurofilament antibody (ABC Laboratories, Ontario, Canada) (1:50) at 4°C overnight. Subsequently, peroxidase-conjugated secondary antibody

(ImmPRESS[®] reagent, Vector Laboratories) and 3,3'-diaminobenzidine-tetrachloride (Vector Laboratories) were used according to the manufacturer's instructions. Sections were counterstained with hematoxylin. A negative control was designed by using phosphate-buffered saline instead of the primary antibody.

Relative amounts of regenerative pulp tissue, 14 and 60 days after transplantation, were examined in each sample by capturing video images of the histological preparations on a Keyence BZ-9000 fluorescence microscope (Keyence, Tokyo, Japan). Three sections, at 150- μ m intervals for each tooth from a total of six teeth, each transplanted with CD31⁺/CD146⁻ and CD31⁺/CD146⁺ SP cells, were examined. Onscreen image outlines of newly regenerated pulp tissue were traced, and the surface area of these outlines in the cavity of amputated pulp was determined by using a BZ-II Analyzer (Keyence) software. The ratio of regenerated area to cavity area on the amputated pulp was calculated in three sections of each tooth and the mean value was determined. Statistical analyses were performed using an unpaired Student's *t*-test. Data are presented as means \pm standard deviation of six determinations. All animal experiments were conducted using the strict guidelines of the Animal Protocol Committees and DNA Safety Programs both in National Center for Geriatrics and Gerontology and Aichigakuin University, Japan.

Analysis of gene expression of cytokines & enzymes by real-time RT-PCR

Total RNA was isolated by Trizol[®] (Invitrogen) from canine CD31⁺/CD146⁻ and CD31⁺/CD146⁺ SP cells at the fourth passage

of culture. The number of these cells was normalized to 5×10^4 cells in each experiment. First-strand cDNA syntheses were performed from total RNA by reverse transcription using ReverTra Ace- α (Toyobo, Tokyo, Japan) following the manufacturer's recommendations. Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) amplifications were performed at 95°C for 10 s, 62°C for 15 s and 72°C for 8 s using the primers for canine β -actin, VEGF-A, GM-CSF, MMP3 and CXCR4 labeled with Light Cycler-Fast Start DNA master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, USA) in Light Cycler (Roche Diagnostics). The design of the oligonucleotide primers was based on published canine cDNA sequences. The RT-PCR products were confirmed by sequencing based on published cDNA sequences. The expression in canine CD31⁺/CD146⁻ SP cells was compared with CD31⁺/CD146⁺ SP cells after normalizing with β -actin.

In situ hybridization

In vivo gene expression of angiogenic factors strongly expressed in CD31⁺/CD146⁻ SP cells was examined by *in situ* hybridization in cryosections 14 days after the transplantation of CD31⁺/CD146⁻ SP cells in regenerated pulp tissue. Canine cDNA of VEGF-A (183 bp), GM-CSF (195 bp), MMP3 (210 bp), CXCR4 (210 bp) and SDF1/CXCL12 (270 bp) linearized with *Nco* I, *Nco* I, *Nco* I, *Spe* I and *Spe* I, respectively, were used as antisense probes. The probes were constructed out of the plasmids after subcloning the PCR products using the same primers as those designed for real-time RT-PCR (TABLE 1). The DIG signals were detected by TSA system FITC-conjugated tyramide (Invitrogen).

Table 1. Canine primers for real-time reverse transcription-PCR and reverse transcription-PCR for cloning plasmids for *in situ* probes.

Gene		5' \leftarrow DNA sequence \rightarrow 3'	Product size (bp)	Accession number
CXCR4	Forward	CTGTGGCAAACCTGGTACTTC	210	NM_001048026
	Reverse	TCAACAGGAGGGCAGGTATC		
VEGFA	Forward	CTACCTCCACCATGCCAAGT	183	NM_001003175
	Reverse	ACGCAGGATGGCTTGAAGAT		
GM-CSF	Forward	GCAGAACCTGCTTTTCTTGG	195	S49738
	Reverse	CCCTCAGGGTCAAACACTTC		
SDF1 α /CXCL12	Forward	GCCATGAACGCCAAGGTC	270	DQ182700
	Reverse	CTTGTTTTAGAGCTTTCTCCAGGT		
MMP3	Forward	CCCTCTGATTCCTCCAATGA	210	AY183143
	Reverse	GGATGGCCAAAATGAAGAGA		
β -actin	Forward	AAGTACCCCATTTGAGCACGG	257	Z70044
	Reverse	ATCACGATGCCAGTGGTGCC		

bp: Base pair.

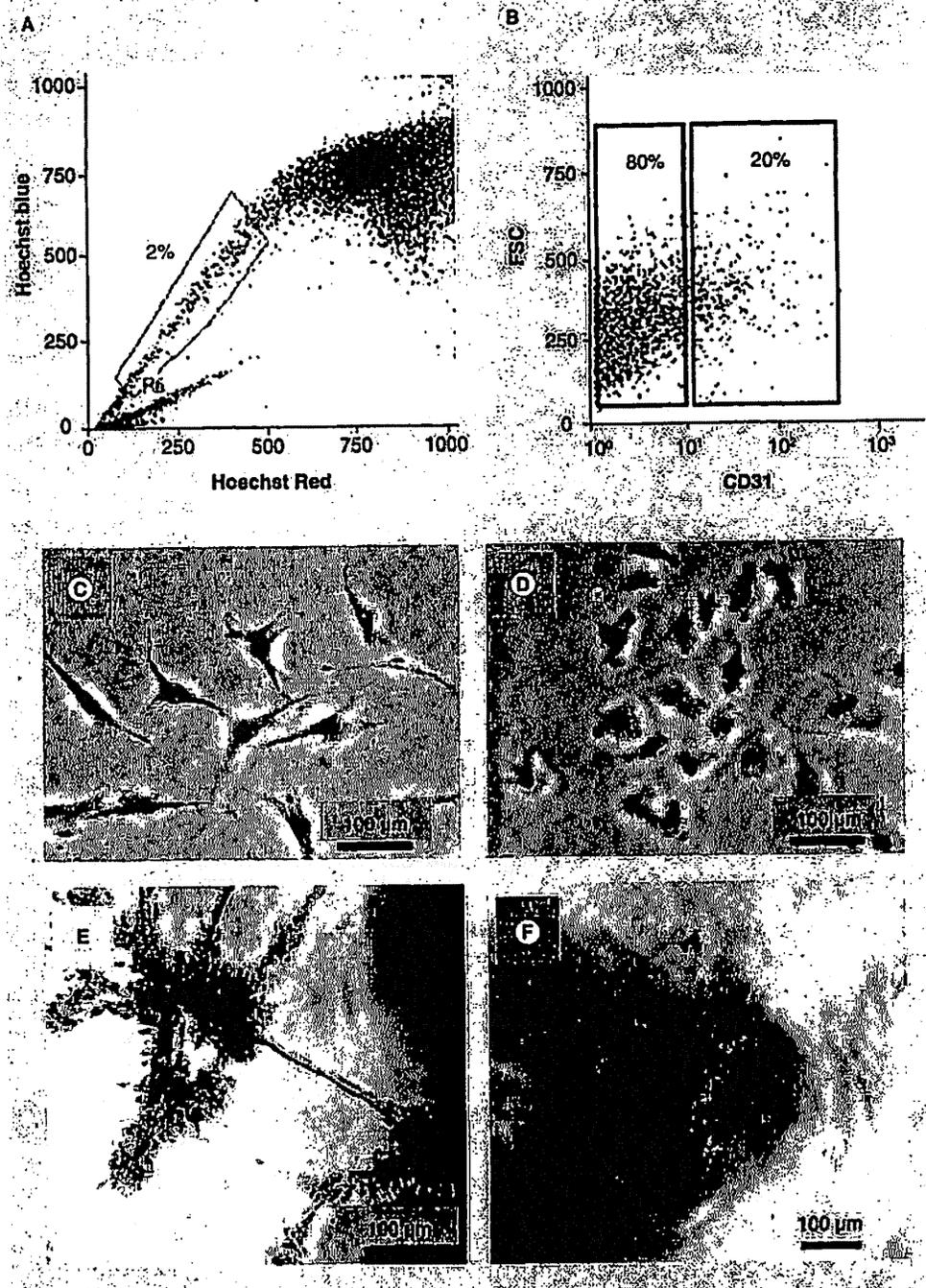


Figure 1. Isolation and comparison of the endothelial differentiation potential of subfractions of CD31⁺/CD146⁻ and CD31⁺/CD146⁺ side population cells from canine adult dental pulp. (A) Flow cytometric analyses of side population (SP) cells. Pulp cells isolated from canine adult pulp tissues identified approximately 2% of the population with relatively low Hoechst 33342 fluorescence (SP cells). (B) Isolation of further distinct populations from canine pulp SP cells using antibodies against CD31. CD31⁺ and CD31⁻ SP cells accounted for 80 and 20% of total SP cells, respectively. The experiment was repeated ten times and results of one representative experiment are presented. (C & D) Fourth passage of cell culture on day 3. (C) CD31⁺/CD146⁻ SP cells showing stellate cells with long processes or spindle-shaped cells. (D) CD31⁺/CD146⁺ SP cells. (E & F) Differentiation of canine pulp-derived CD31⁺/CD146⁻ SP cells into endothelial cells on the Matrigel™. 12 h after seeding. Extensive networks of cords and tube-like structures in (E) CD31⁺/CD146⁻ SP cells. Smaller number of cords in (F) CD31⁺/CD146⁺ SP cells.

Results & discussion

Characterization of CD31⁺/CD146⁺ SP cells from dental pulp

The isolated Hoechst SP cells ranged from 0.5 to 2% of the total canine primary pulp cells (FIGURE 1A). The total SP cells were further subfractionated at the second passage by flow cytometry, and the CD31⁺ subfraction and CD31⁻ subfraction accounted for 80 and 20% of the total SP cells, respectively (FIGURE 1B). Next we determined the optimal growth factors. EBM2 supplemented with 10 ng/ml IGF1, 5 ng/ml EGF and 10% fetal bovine serum was used for CD31⁺ SP cells, and EBM2 with 10 ng/ml basic FGF, 10 ng/ml VEGF, 138 nM hydrocortisone, 0.09 mg/ml heparin, 50 µg/ml ascorbic acid and 10% fetal bovine serum was used for CD31⁻ SP cells. They maintained the phenotype of each of the CD31⁺ and CD31⁻ SP cells, CD31⁺ and CD31⁻, 100 and 95.5%, respectively, at the fifth passage.

The flow cytometric analysis demonstrated that CD31⁺ and CD31⁻ SP cells at the second passage contained CD34, accounting for 28 and 2%, respectively. CD31⁺ and CD31⁻ SP cells, at the third passage, contained CD34 accounting for 68 and 31%, respectively, suggesting that these populations increase the number of CD34⁺ cells during passage of culture (TABLE 2). Bone marrow angioblasts are CD34⁺, and when migrating to the systemic circulation, EPCs gradually lose their progenitor properties and CD34 expression rate [12]. Canine pulp CD31⁺ SP cells contained CD105, another mesenchymal stem cell marker, accounting for 25 and 26.3% at the third and sixth passage of culture (TABLE 2), respectively, indicating no change in phenotype of stem cells. On the other hand, the CD31⁺ and CD31⁻ SP cell population contained a CD146⁺ subfraction of 99.6 and 90%, respectively. At the second passage this was 99.9 and 97%, respectively (TABLE 2). Thus, the phenotype of each population was suggested to be maintained by the optimal growth factors. Both SP subfractions lacked CD14, a macrophage/mononuclear cell marker, indicating that these cells are distinct from the hematopoietic lineage.

CD31⁺/CD146⁺ and CD31⁻/CD146⁺ SP cells, similar to porcine pulp CD31⁺/CD146⁺ SP cells [9], were isolated at the third passage of culture (FIGURE 1C & D) and used for further experiments.

Differentiation of CD31⁺/CD146⁺ SP cells into endothelial cells *in vitro*

We assessed endothelial differentiation potential using the Matrigel assay. CD31⁺/CD146⁺ SP cells readily formed extensive networks of

Table 2. Expression of cell surface markers in CD31⁺ and CD31⁻ side population cells.

	CD34 (%)		CD146 (%)		CD105 (%)	
	2nd	3rd	2nd	3rd	3rd	6th
CD31 ⁺ SP cells	28	68	0.4	0.1	25	26
CD31 ⁻ SP cells	2	31	10	3	15	14

SP: Side population.

cords and capillary-like structures after only 12 h (FIGURE 1E), a phenotype typically associated with endothelial cells. On the other hand, CD31⁻/CD146⁺ SP cells could form few tubules (FIGURE 1F). These results suggested that canine pulp CD31⁺/CD146⁺ SP cells have a highly vasculogenic potential as early angioblasts in bone marrow and EPCs [13].

CD31⁺/CD146⁺ SP cells generate neovascularization & pulp regeneration on amputated pulp

Pulp tissue filled in the cavity on the amputated pulp when CD31⁺/CD146⁺ SP cells were transplanted and capillaries were extended to the surface of tissue (FIGURE 2A & D). Conversely, few capillaries were seen in the cavity on the amputated pulp after transplantation of CD31⁻/CD146⁺ SP cells, despite engraftment of the cells (FIGURE 2B & E). There was no engraftment in the cavity on the amputated pulp after transplantation of only a scaffold (collagen type I and collagen type III, 1:1) without cells (FIGURE 2C). DiI-labeled transplanted CD31⁺/CD146⁺ SP cells were observed in the lower region of the cavity of newly regenerated pulp (FIGURE 2F & TABLE 3), whereas the transplanted CD31⁻/CD146⁺ SP cells were dispersed in the cavity on the amputated pulp (FIGURE 2G & TABLE 3). CD31⁺/CD146⁺ SP cells exhibited high migration activity compared with CD31⁻/CD146⁺ SP cells in a chemotaxis experiment induced by stromal cell-derived factor (SDF)1 [9]. These results suggested the potential capacity of CD31⁺/CD146⁺ SP cells to migrate to the injured site of pulp tissue. Fluorescence microscopic images of DiI-labeled transplanted cells were superimposed with that of endothelial cell staining with anti-CD146, demonstrating no overlapping expression of DiI with CD146 in the regenerated pulp tissue. There were numerous transplanted CD31⁺/CD146⁺ SP cells in the vicinity of the newly formed capillaries. However, they were not incorporated in the regenerated capillaries on the amputated site (FIGURE 2H), implicating a trophic role in neovascularization. The neuronal



Figure 2. Neovascularization and pulp regeneration in the cavity of the amputated pulp of dogs after autogenous transplantation of CD31⁺/CD146⁺ side population cells. (A–J) 14 days after transplantation of a 3D pellet on day 1 of culture with type I and type III collagen (hematoxylin and eosin staining). Amputated sites of dental pulp are indicated by arrows: The established pulp tissue was demarked by dotted lines. (A & D) CD31⁺/CD146⁺ side population (SP) cells. The cavity in the amputated pulp is filled with regenerated pulp tissue. Capillaries extended to the top of the tissue beneath the site of the filling cement. (B & E) CD31⁺/CD146⁺ SP cells. Few capillaries are seen in the cavity on the amputated pulp despite engraftment of the transplanted pellet. (C) Control transplantation with only a scaffold (type I and type III collagen) without cells. There was no engraftment in the cavity on the amputated pulp. (F–H) Fluorescent-microscopic observation of DiI-labeled transplanted cells 14 days after transplantation. (F) CD31⁺/CD146⁺ SP cells seen in the cavity at the bottom of newly regenerated pulp. (G) CD31⁺/CD146⁺ SP cells are dispersed in the cavity. Arrows indicate the amputated site. White lines indicate dentinal walls. (H) Immunostaining of CD146. DiI-labeled CD31⁺/CD146⁺ SP cells (arrows) can be seen close to the newly formed capillaries (V). (H & I) In the regenerated pulp tissue on the amputated site. (J) In the original pulp tissue under the amputated site. (I & J) Immunostaining of neurofilament. (K–N) 60 days after transplantation of CD31⁺/CD146⁺ SP cells. (K) Regenerated pulp tissue in the cavity on the amputated sites (arrows). Note tubular dentin and/or osteodentin only along the dentinal wall. (L) Tubular dentin formation along the dentinal wall in the cavity. A box representing the region from which L originated. (M) Osteodentin formation at the top of the cavity under cement. (N) Regenerated pulp tissue in the cavity. (O) Ratio of newly regenerated area to cavity area on the amputated pulp. Solid line represents transplantation of CD31⁺/CD146⁺ SP cells and dashed line represents transplantation of CD31⁺/CD146⁺ SP cells. Data are means \pm standard deviation of six determinations ($p < 0.01$). Statistical analysis was performed by the unpaired Student's *t*-test.

process, stained by neurofilament antibody in the original pulp tissue under the amputated site (FIGURE 2I), was extended into the newly regenerated pulp (FIGURE 2J). Tubular dentin and/or osteodentin formation along the dentinal wall (FIGURE 2K & L) and osteodentin formation at the top of the cavity under the cement (FIGURE 2M) were seen 60 days after transplantation of CD31⁺/CD146⁺ SP cells, and the rest of the cavity on the amputated pulp was still filled with regenerated pulp tissue (FIGURE 2K & N). Little formation of neuronal processes and dentin and/or osteodentin was observed in CD31⁺/CD146⁺ SP cells on day 14 and 60. The ratio of newly regenerated area to cavity area on the amputated pulp was significantly higher in the case of CD31⁺/CD146⁺ SP cell transplantation than in the case of CD31⁺/CD146⁺ SP cell transplantation on day 60 (FIGURE 2O).

Vasculogenic potential of CD34⁺ pulp stem cells from human adult teeth has been reported in induced bone tissue after subcutaneous transplantation [14] and in myocardial infarction [15]. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth seeded in a biodegradable scaffold within a tooth slice differentiate into both odontoblasts and endothelial-like cells after transplantation into immunodeficient mice, and the resulting tissue within the tooth slice resembles physiologic dental pulp [16]. Transplantation of porcine pulp CD31⁺/CD146⁺ SP cells induced increase in blood flow and neovascularization in mouse hindlimb ischemia [9]. The critical role of vasculature and vasculogenesis in pulp regeneration is well known. Pulp regeneration is a distinct reality by the use of stem/progenitor cells with scaffold and signaling molecules [1]. However, there has been no report on successful pulp regeneration using the triad of tissue engineering in teeth in which root formation is completed. The present study demonstrated, for the first time, that pulp-derived CD31⁺/CD146⁺ SP cells induced a strong vasculogenic response and pulp regeneration in a model of pulp amputation in dogs. The root formation of the canine teeth was completed and remaining pulp tissue had no ability to proliferate and regenerate spontaneously in the cavity on the amputated pulp as demonstrated by the control. Transplantation of CD31⁺/CD146⁺ SP cells also had no effect on pulp regeneration, suggesting that the CD31⁺/CD146⁺ subfraction of SP cells have cell-specific properties. The cavity was filled with regenerated pulp tissue even 60 days after transplantation of the SP cells. The regenerated pulp tissue was physiologically normal since the pulp cells differentiated into odontoblasts only at the periphery of dentin under the influence of morphogen and extracellular

Table 3. Quantification of cell numbers in various regions in the cavity on the amputated pulp in the transplantation of CD31⁺/CD146⁺ and CD31⁺/CD146⁺ side population cells

	CD31 ⁺ SP cells (%)	CD31 ⁺ SP cells (%)
Top	9	38
Middle	45	29
Base	46	33

SP: Side population.

matrix in dentin. Therefore, these results demonstrate that the CD31⁺/CD146⁺ subfraction of SP cells has a potential utility as cell therapy for therapeutic angiogenesis/vasculogenesis and pulp regeneration.

□ Analysis of gene expression *in vitro* & *in vivo*

Real-time RT-PCR analysis showed that the expression levels of *VEGF-A*, *GM-CSF*, *MMP3* and *CXCR4* in CD31⁺/CD146⁺ SP cells were 2.4, 250, 15, and ∞-fold higher, respectively, than those in CD31⁺/CD146⁺ SP cells at the fourth passage of culture (FIGURE 3A). The expression levels of *VEGF-A*, *GM-CSF* and *MMP3* by CD31⁺/CD146⁺ SP cells might explain the observed increase in vascular response by chemotaxis, proliferation and differentiation into endothelial cells of host stem/progenitor cells [9,17–21]. The persistence of Dil-labeled CD31⁺/CD146⁺ SP cells on the amputated site lends credence and support to this argument.

Analysis of gene expression by *in situ* hybridization demonstrated that the transplanted CD31⁺/CD146⁺ SP cells expressed a variety of pro-angiogenic factors and cytokines such as *VEGF-A*, *GM-CSF* and *MMP3* (FIGURE 3B–J). The transplanted cells were in close proximity to the vasculature and expressed several pro-angiogenic factors, as previously shown in an ischemic hindlimb [9], implying critical trophic paracrine functions in promoting neovascularization. They also expressed *CXCR4* and were localized in the immediate vicinity of stromal cells that expressed *SDF1* (FIGURE 3K–P), suggesting an *SDF1/CXCR4* system for migration [22] of pulp CD31⁺/CD146⁺ SP cells to the amputated site.

Conclusion

This study demonstrated for the first time that pulp CD31⁺/CD146⁺ SP cells have a high vasculogenic potential and that they induce angiogenesis/vasculogenesis and pulp regeneration following pulp injury. Expression of pro-angiogenic factors

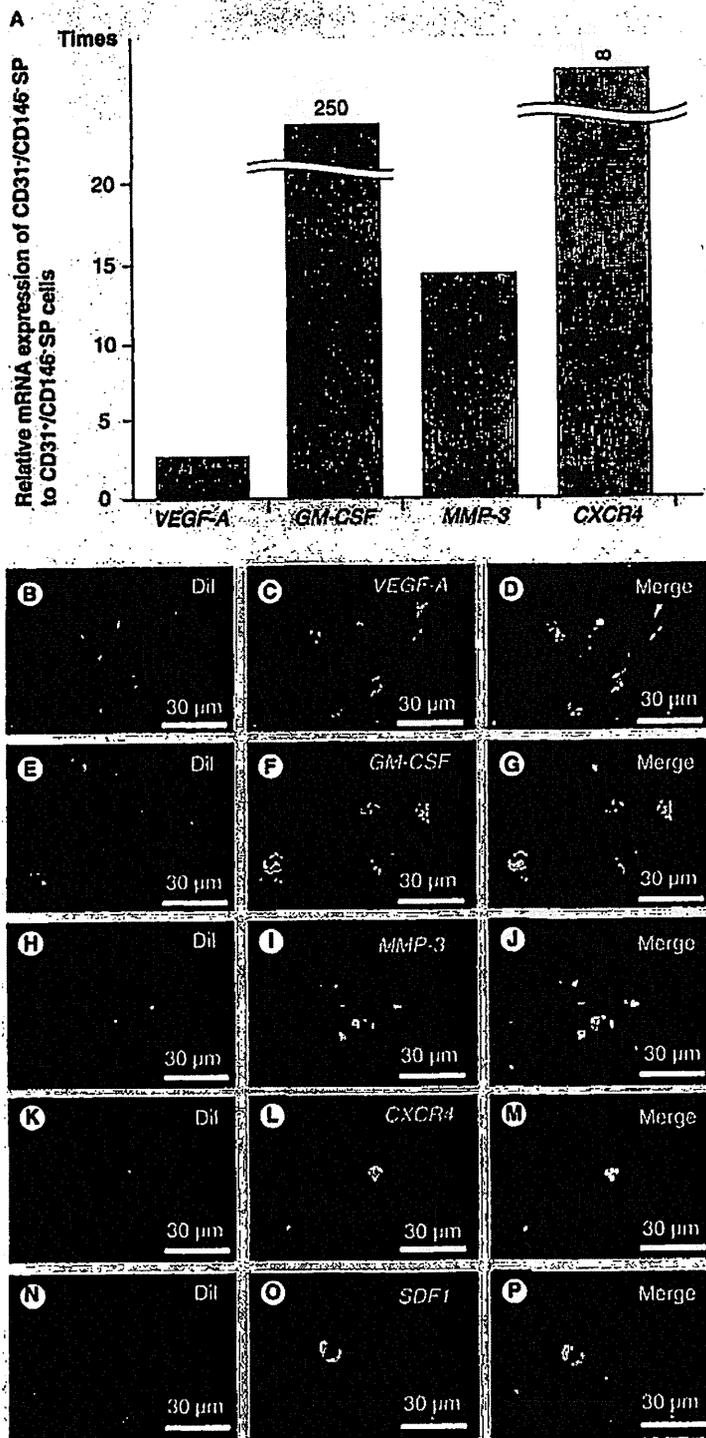


Figure 3. Analysis of gene expression *in vitro* and *in vivo*. (A) Relative mRNA expression analysis of cytokines and enzymes by real-time reverse transcription-PCR in CD31⁺/CD146⁻ side population (SP) cells compared with CD31⁻/CD146⁻ SP cells. (B–P) Confocal microscopic analysis of gene expression by *in situ* hybridization in the amputated pulp 14 days after transplantation. (B–D) VEGF-A, (E–G) GM-CSF, (H–J) MMP3, (K–M) CXCR4 and (N–P) SDF1. Note CXCR4 mRNA is expressed in the Dil-labeled CD31⁺/CD146⁻ SP cells next to SDF1-expressing cells.

and cytokines such as VEGF-A, GM-CSF and MMP3 by the transplanted cells has important implications for their trophic actions on endothelial cells and promotion of neovascularization. Pulp CD31⁺/CD146⁻ SP cells have potential clinical utility in the induction of pulp regeneration by cell therapy.

Future perspective

Endothelial progenitor cells are present in bone marrow, peripheral blood and adipose tissue. These cells, however, are obtained by invasive biopsy, a potentially painful procedure. Autologous pulp tissue is easily available during orthodontic treatment and from discarded teeth after extraction without any ethical issues. In addition, the immunosuppressive properties of the tissue [23] may be useful for allogeneic transplantation. Therefore, autologous pulp tissue has advantages for clinical use. Pulp CD31⁺/CD146⁻ SP cells may be a novel stem-cell source for cell-based therapy of angiogenesis/vasculogenesis during regeneration in other ischemic diseases as well as pulp disease. Isolation of similar pulp SP subfraction from human teeth and comparative experiments on the effects of angiogenesis/vasculogenesis with human endothelial progenitor cells from a variety of tissues such as bone marrow, umbilical cord, adipose tissue and peripheral blood are needed before clinical use.

The vascular contribution to regeneration of a dentin–pulp complex is immense. Isolation of pulp stem cells suitable for angiogenesis/vasculogenesis has been a major challenge in endodontics and dentistry. Therefore, cell therapy harnessing pulp CD31⁺/CD146⁻ SP cells will be very useful for achieving higher rates of pulp preservation and improvement of longevity in teeth. Finally, we have initiated the isolation of trophic factors for angiogenesis/vasculogenesis from the pulp CD31⁺/CD146⁻ SP cells. We are confident that these defined factors will enhance neovascularization and regeneration of damaged pulp.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by grants from the Collaborative Development of Innovative Seeds, Potentiality verification stage from Japan Science and Technology Agency, a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan, #17390509 (M Nakashima), #19659499 (M Nakashima) and #19791418 (K Iohara), the Mitsubishi Pharma Research Foundation (M Nakashima), the Japan Healtb Foundation (M Nakashima) and Aichigakuin University High-Tech Research Center "Project for Private Universities: matching

fund subsidy from MEXT (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscripts apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. All animal experiments were conducted using the strict guidelines of the Animal Protocol Committee, both in the National Center for Geriatrics and Gerontology and Aichigakuin University.

Executive Summary

- We have isolated CD31⁺/CD146⁺ side population (SP) cells from canine dental pulp.
- CD31⁺/CD146⁺ SP cells formed extensive networks of tube-like structures *in vitro*.
- CD31⁺/CD146⁺ SP cells generated neovascularization and pulp regeneration on amputated pulp.
- The transplanted cells were in close proximity to the vasculature and expressed several pro-angiogenic factors.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Nakashima M, Akamine A: The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J. Endod.* 31, 711–718 (2005).
- 2 Schmidt A, Brixius K, Bloch W: Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ. Res.* 101, 125–136 (2007).
- 3 Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM: Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J. Endod.* 33, 377–390 (2007).
- 4 Hargreaves KM, Geisler T, Henry M *et al.*: Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J. Endod.* 34, S51–S56 (2008).
- 5 Asahara T, Murohara T, Sullivan A *et al.*: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–967 (1997).
- 6 Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S *et al.*: Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an *in vitro* model of vasculogenesis. *Blood* 4, 1253–1263 (1999).
- 7 Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D *et al.*: Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952–958 (2000).
- 8 Raffi S, Lyden D: Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.* 9, 702–712 (2003).
- 9 Iohara K, Zheng L, Ito M *et al.*: A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 26, 2408–2418 (2008).
- 10 Iohara K, Zheng L, Ito M *et al.*: Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells* 24, 2493–2503 (2006).
- 11 Nakashima M: Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Endod. Dent. Traumatol.* 5, 279–286 (1989).
- 12 Hristov M, Weber C: Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J. Cell Mol. Med.* 8, 498–508 (2004).
- 13 Baatout S: Endothelial differentiation using Matrigel. *Anticancer Res.* 17, 451–455 (1997).
- 14 d'Aquino R, Granziano A, Sampalesi M *et al.*: Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 14, 1162–1171 (2007).
- 15 Grnadiac C, Arminan A, Gracia-Verdugo JM *et al.*: Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rat with acute myocardial infarction. *Stem Cells* 26, 638–645 (2008).
- 16 Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T *et al.*: Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J. Endod.* 34, 962–969 (2008).
- 17 Matsushita K, Motani R, Sakuta T *et al.*: The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J. Dent. Res.* 79, 1596–1603 (2000).
- 18 Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Cell. Mol. Med.* 9, 777–794 (2005).
- 19 Seiler C, Pohl T, Wustmann K *et al.*: Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 104, 2012–2017 (2001).
- 20 Buschmann IR, Busch HJ, Mies G *et al.*: Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* 108, 610–615 (2003).
- 21 Kim YJ, Kim HK, Cho HH *et al.*: Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell. Physiol. Biochem.* 20, 867–876 (2007).
- 22 Nervi B, Link DC, DiPersio JF: Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J. Cell Biochem.* 99, 690–705 (2006).
- 23 Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M *et al.*: Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 27, 836–842 (2005).

- Shows immunosuppressive properties of dental pulp stem cells.

1 ES細胞の病態解明への応用

国立成育医療センター研究所 阿久津 英憲
国立成育医療センター研究所 梅澤 明弘

1 はじめに

胚性幹(ES)細胞は着床直前の胚である胚盤胞の内部細胞塊またはエピプラストに由来する多能性幹細胞である。体外培養の特定の培養条件下で持続的に自己複製できる能力をもちつつ、身体を構成する全ての細胞を生み出す能力を持った極めて希少な細胞である。ES細胞から初期分化の課程は通常子宮内で起こっている初期発生過程を模倣しているとされ¹⁾、着床期以降の初期胚発生メカニズムを解析する極めて重要な細胞である。さらには、ES細胞を用いた遺伝子相同組換え等の遺伝子ターゲティング法が確立され遺伝子機能解析研究が格段に進歩してきた。マウスES細胞樹立と遺伝子ターゲティング法の確立により、2007年のノーベル医学・生理学賞を獲得している²⁾。1998年にはヒトES細胞樹立も報告され³⁾、再生医療への応用ばかりでなく、それまで研究モデル系がなかったヒト初期胚発生・分化メカニズム解析へのアプローチを可能とし生命科学 research へ大いに貢献すると期待されている。今回は、有効な治療法のない疾患への病態解明アプローチとしてヒトES細胞を用いた疾患モデル解析系の概略と今後の可能性をまとめてみる。

2 病態解明に向けた新たな疾患モデル解析系の必要性

2.1 難治性疾患研究環境の問題点

医学の発展と医療技術の進歩が著しいにもかかわらず、今日なお、有効な治療法がない疾患が多く存在し、病状も慢性的な経過を辿ることから患者自身の苦しみに加え、医療経済的およ

び社会福祉的にも大きな課題となっている。これら疾患のなかで特定の細胞機能低下・不全に関係づけられるような心筋梗塞、糖尿病、脳梗塞、造血系疾患、神経変性疾患、視力低下、脊髄損傷、骨関節疾患、腎不全等は、細胞が本来の機能を失っているか、細胞そのものの損出であり生体内では置き換えられたり、新たに細胞が生み出されたりできない状況にある。

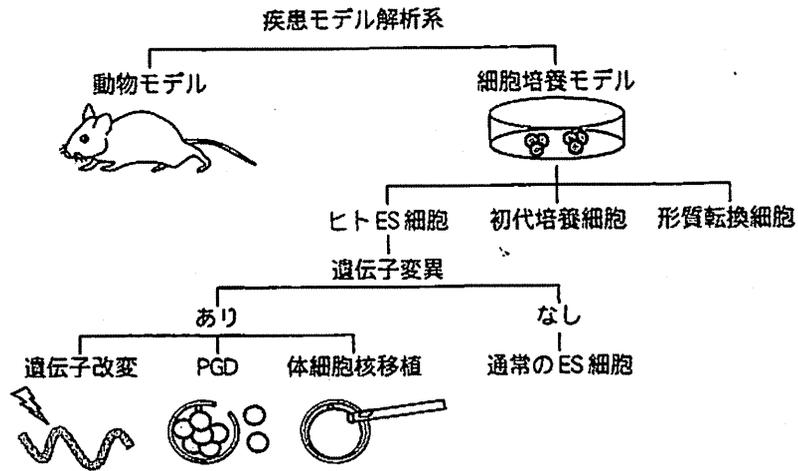
多くの変性疾患は、症状が出て診断されるときには、すでに細胞は変性していて機能を取り戻すことはできず、進行を抑える対症療法が主流となるが完全に病状の進行を止めることはできない。加えて、これら疾患のメカニズムと病因を探るためのよりよい解析系が存在しないことが研究遂行上の重大なリミティング・ファクターとなっている。ヒト遺伝性疾患の研究に使用される細胞株は患者生検組織から得られる初代細胞培養による。このアプローチだと得られる組織は限定した部位からごくわずかなサンプル量が採取され、頻回に得られるようなものではなく、パーキンソン病のように疾患によってはサンプル組織を得ることが極めて不可能な場合も多い。たとえ組織が得られたとしても、ヒトパピローマウイルスガン遺伝子 E6 や E7、テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子等を導入し寿命延長操作をしない限り体細胞では細胞寿命があり体外培養に限界がある。さらには、このような生検細胞では病気の自然史の限定したポイントでしか研究対象にできず、疾病の成立過程を追うことができない。

2.2 ES 細胞による疾患モデルの有用性

疾患モデルの解析系は、大きく分けて実験動物を扱う系と細胞培養による系の2つに分けられる(図1)。実験動物モデル系、特にマウスはゲノム解析や遺伝子改変操作技術も格段に進歩しており、ゲノム情報、遺伝子発現からマイクロRNA、タンパク質に至るあらゆる生命科学情報のデータベースが構築され一般にも公開されている。一方で、実験動物モデルでは埋めることのできない生物学的相異性がヒトとの間に確実に存在する。その欠点を補ううえでも、ヒト組織を用いた体外解析系は重要であり、その基盤となる細胞培養系は生命科学研究のなかで非常に重要な役割を果たしてきている。細胞培養特にヒト組織由来の初代細胞培養は生体内での生理的、生化学的機能の解明や疾患機序解明のため基礎医学研究の根幹をなしてきた。ES細胞はそのユニークな性質を背景に培養ディッシュ内で疾患を再現できる⁹⁾。疾患モデルES細胞はその疾患を引き起こす原因をゲノムに持っており、正常ES細胞と比較して分化動態を詳細に検討することで疾患発症機序を解明し、そのシステム自体が新たな治療薬開発や治療・検査法開発に応用することが期待されている(図2)。

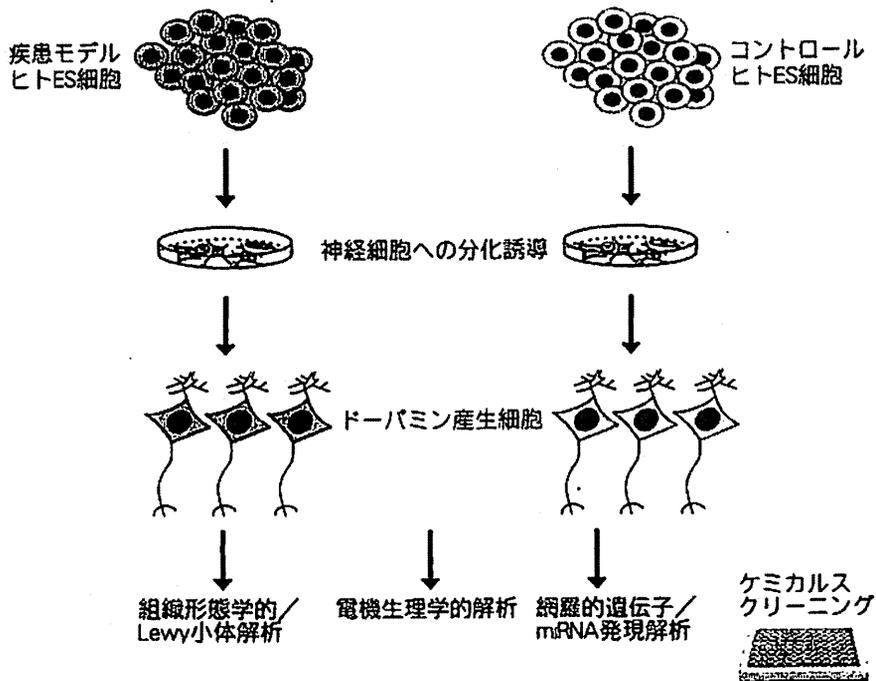
ES細胞を使用することの利点は、全ての細胞になり得る多分化能性を持ち、無限に増殖維持できる正常染色体核型を持つ細胞株であることが背景にある。胚発生原腸形成期間で最も重要なイベントの一つは三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)の成立である。

さらに、ES細胞からの *in vivo* および *in vitro* での分化は初期発生・分化過程を模倣してい



疾患の病態や病因メカニズムの解析には、さまざまな研究システムが構築されている。*in vivo* 解析系では、多くの場合、実験動物マウスが用いられている。一方、ヒトサンプルを対象とすると細胞培養系に限られる。ES細胞は*in vitro*系でヒト胚発生の再現性に優れており、遺伝子改変操作も可能であることからヒト疾患モデル系として非常に有用である。着床前診断(PGD)で診断された単一遺伝子疾患由来のES細胞もすでに樹立されており、難治疾患の貴重な解析系である(文献1)の図1(改変)。

図1 ヒト疾患の実験モデル系



パーキンソン病モデルヒトES細胞から標的細胞であるドーパミン産生細胞を分化誘導する。ヒトES細胞からは、豊富に細胞が得られるため種々の解析系に十分な細胞が獲得できる。神経特異的なマーカーを導入すれば経時的な追跡も明確に行える。ケミカルスクリーニング等の創薬開発にも応用できる。

図2 疾患モデルヒトES細胞による解析(パーキンソン病)

る⁹⁾。したがって、ES細胞は初期発生・分化過程や器官形成過程における遺伝子変異の影響を解析できる幹細胞である。ES細胞は無限に細胞増殖可能であり、生化学的および分子生物学的分析には非常に有用である。1998年にヒトES細胞の樹立が報告され⁹⁾、10年経過したが、マウスES細胞で培われてきた遺伝子改変操作技術もヒトES細胞で応用されるようになってきた。特定の分子をターゲットにして人工的に疾患モデルを作製することが可能であり、着床前診断(PGD)を受けた胚からES細胞を樹立し疾患モデルES細胞を作製することも可能である。

2.3 ヒトES細胞とマウスES細胞疾患モデル

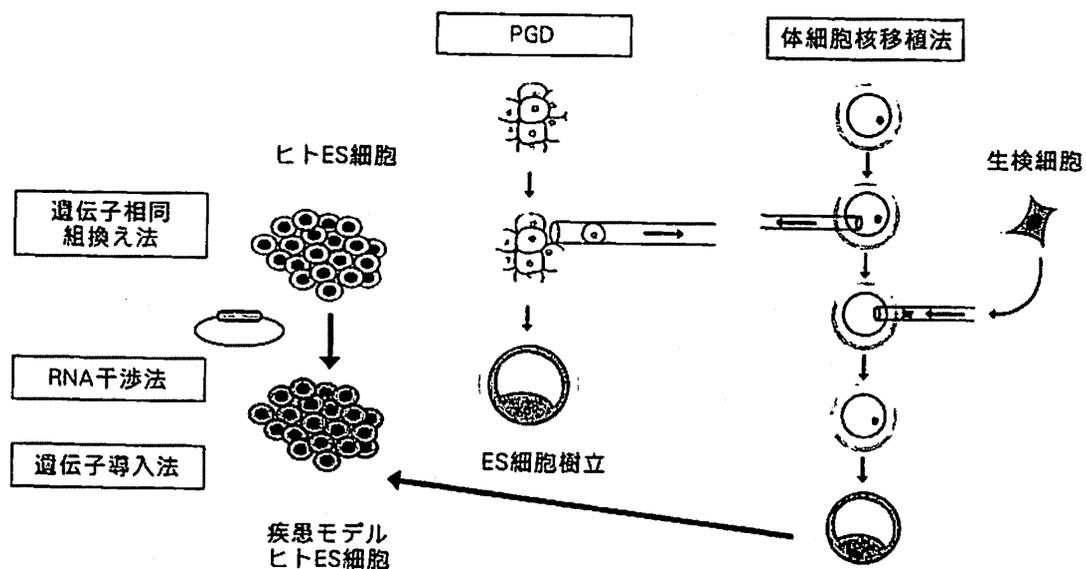
ヒト疾患を動物細胞を用いるよりヒト細胞を用いて研究する利点はヒトと動物間の生化学的、代謝レベルおよび遺伝学的な相異がある点にある。ヒト生命科学の推進に大きく貢献している実験動物マウスでも器官や臓器の増殖、サイズや解剖学的にもヒトとは異なる。ヒトES細胞とマウスES細胞も遺伝子発現や働く遺伝子パスウェイにおいても大きく異なることが報告されている⁹⁾。疾患によってはヒトでの表現型をマウスで示すことができないものも存在する⁹⁾。たとえば筋緊張性ジストロフィー(Myotonic Dystrophy)や脆弱性X症候群(Fragile X)等のような伸張したトリプレットリピート病(the unstable triplet repeat expansion disorders)やヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPR1)遺伝子の変異により引き起こされるレッシュ・ナイハン症候群はマウスモデルが存在していない。尿酸の代謝酵素であるHPR1が働かなく、尿酸が過剰に産生され痛風様症状、腎尿管系結石や精神運動発達遅滞を伴う疾患である。マウス等のげっ歯類ではHPR1の変異が存在しても別代謝経路により代謝されるため尿酸が蓄積しない⁹⁾。マウスが適切な疾患モデルとならないような場合、ヒト疾患に対応する新たな実験モデル系が必要である。生検組織より細胞株を樹立しそのような疾患モデルとして研究対象にしてきたが、体細胞のため限られた細胞寿命があり、特定の細胞のみになり汎用性がない。一方、ヒト細胞株に変異を導入する方法で疾患モデル細胞作製することも可能であり、細胞周期、細胞死のような細胞レベルでの生命現象を探求し疾患メカニズムや創薬開発の系として用いられている⁹⁾。しかし、変異を導入された細胞はすでにトランスフォーム細胞であり、元来の疾患起因細胞とは性質が異なる。加えて、動物試験で全く問題がなく極めて安全な薬とされたが、ヒトで胎児への催奇形性が認められたサリドマイドのような薬剤が存在する。ヒトES細胞の未分化性性質を持つ細胞から分化していく過程は、子宮内の初期発生過程をある程度模倣しているとすれば、これまで妊娠期間中に服用する薬の胎児への影響を検定する非常に貴重な細胞系となる。

3 ゲノム操作によるヒト ES 細胞疾患モデル(図3)

ヒト ES 細胞へ外来遺伝子を導入する方法としてトランスフェクション法やインフェクション法がすでに報告されている^{10),11)}。ヒトの遺伝子変異による疾患では大きく分けて遺伝子の機能欠損型(loss of function mutation)あるいは機能獲得型(gain of function mutation)がある。機能獲得型ではタンパク質の機能異常のため疾患に至る。そのようなモデルでは変異遺伝子の導入により再現できる可能性がある。しかし、多くの疾患では機能欠損型の変異により引き起こされる。機能低下を目的に遺伝子変異を導入する方法がいくつかあるが、大まかに、ランダムに導入する法を使用するかターゲティング法がある。ランダムに導入する場合でも導入部位でのポジションエフェクト等による外来遺伝子不活性化の影響が少ない BAC を用いた遺伝子導入法も報告されている^{12),13)}。

3.1 遺伝子相同組換え法¹⁴⁾

マウス ES 細胞による遺伝子ターゲティング法の確立は、遺伝子機能の解析精度を格段に高め、今日の生命科学における我々の基礎知識を大いに深めてきた。ヒト ES 細胞では、非常に残念ながら、マウス ES 細胞での遺伝子改変に関する技術や知見がそっくりそのままヒト ES 細胞



正常胚より樹立したヒト ES 細胞に対して、疾患誘導変異を遺伝子ターゲティング法により導入する。遺伝子相同組換え法の他に、BAC を導入したりレンチ、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入やより大きな外来遺伝子を導入できるバキュロウイルスベクターを用いる方法が開発されている。PGD で診断を受けた遺伝性疾患の胚や患者からの生検による体細胞核移植(NT)法により胚盤胞を作製し新たに疾患モデル ES 細胞を樹立するアプローチがある。しかし、ヒト NT 法による ES 細胞樹立の報告はない。

図3 疾患モデルヒト ES 細胞の作製

胞へ反映させることはできなかった。最近になってようやくヒト ES 細胞での遺伝子ターゲティング法の応用が可能となってきた。分子レベルでのより詳細な解析が可能となっはじめて幹細胞制御メカニズム、分化動態そして再生医学や創薬への応用展開が可能となると思われる。

ヒト ES 細胞樹立を最初に報告した米国ウイスコンシン大学のグループがヒト ES 細胞による遺伝子相同組換え法をはじめて報告し¹⁵⁾、他のグループも HPRT1 遺伝子の変異をレッシュ・ナイハン症候群のモデルヒト ES 細胞の樹立を報告している¹⁶⁾。X 染色体上にある遺伝子に起因する疾患では、XY 染色体を有する ES 細胞の片側アリル(X 染色体)だけをターゲティングするだけで疾患モデル ES 細胞が獲得可能である。しかし、マウス ES 細胞を用いた遺伝子組換え方法および効率を残念ながらそのままヒト ES 細胞へあてはまることはできない。組換え効率が極めて低く、組換えがうまくいった細胞のクローン化の困難性、細胞増殖スピードがマウス ES 細胞に比し 3 倍以上遅いため全体の手技はマウスより時間が多くかかる等、ヒト ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティング法の大きな足かせとなっていた。ヒト ES 細胞を単離した場合、細胞死が高率に誘導されるなどヒト ES 細胞培養そのものに遺伝子マニピュレーションを非効率的にさせている要因があったが、最近、Sasai らは Rho-associated kinase(ROCK) inhibitor、Y-27632 がヒト ES 細胞の細胞単離時の細胞死を抑制し、クローニング効率を飛躍的に向上することを報告した¹⁷⁾。Y-27632 の使用により飛躍的にヒト ES 細胞による遺伝子ターゲティング法での生存効率を上げた¹⁸⁾。特定遺伝子座への遺伝子導入により有用なヒト ES 細胞の作製に成功した報告もある。血液・血管系細胞の形成過程で起こる発生異常は胚・胎児致死あるいは重篤な疾患を引き起こすが、脊椎動物の造血形成、中胚葉系細胞からヘマンジオブラストそして造血、血管形成へ発生・分化が進む 1 次造血は着床直後の胚発生で極めて初期から起こるとされていて、ヒトでは研究アプローチが極めて困難であった。Stanley らは内・中胚葉初期の分化マーカーである MI XL1 遺伝子に対して、ヒト ES 細胞での遺伝子ターゲティングを行い GFP レポーター遺伝子を導入したヒト ES 細胞によるヒト 1 次造血解析システムを構築している¹⁹⁾。

ヒト ES 細胞での遺伝学的な性質および機能の理解を深めることが今後の遺伝子改変操作技術の進歩に不可欠である。最近、この点に関して極めて興味深い進展が報告された。

●ファージ C31 インテグレース

Thyagarajan らはゲノムの特定配列を認識して染色体修飾を行うことのできる、バクテリアファージ C31 インテグレースを用いてヒト ES 細胞で非常に安定的に導入遺伝子が制御される遺伝子改変システムを構築した¹⁹⁾。

●ジンクフィンガーヌクレアーゼ

カスタマイズした DNA 切断酵素、ジンクフィンガーヌクレアーゼとインテグラーゼ欠損レンチウイルスベクター(IDLV)を組み合わせることでヒト ES 細胞のターゲット部位に遺伝子導入を報告している²⁰⁾。ジンクフィンガーヌクレアーゼはゲノムの特定部位を切り出す作用があ

り、次世代のより安全な遺伝子治療法に高く評価されているが、IDLVを用いることにより組換えを効率良く行うことを可能にしている。

●ヒト ROSA26 遺伝子座

マウス Rosa26 遺伝子座は導入遺伝子がポジションイフェクトを受けにくく遺伝子のサイレンシングが出ないため、細胞の分化状態にかかわらず遺伝子の発現を制御できるということからマウス ES 細胞での遺伝子改変操作に汎用されてきた。Keller らは、ヒトでも ROSA26 遺伝子座が確認され、ヒト ES 細胞を用いたヒト ROSA26 遺伝子座における遺伝子改変操作の有用性が報告された²⁰⁾。ヒト ROSA26 遺伝子座は分化動態にかかわらず、マウス同様常にサイレンシングを受けておらず、広範な遺伝子改変操作が可能である。つまり、疾患モデル作製のための機能欠損型、機能獲得型や細胞の発生・分化動向を追跡することがより簡便になる。

3.2 RNA 干渉法

すでに遺伝子機能解析ツールとして *in vivo* および *in vitro* でもさまざまな実験系に汎用されている RNA 干渉法であるが、ヒト ES 細胞でも遺伝子機能ノックダウン法に有用であることが示されてきた²¹⁾。ヒト ES 細胞による疾患モデル作製にも応用可能である。RNA 干渉法では導入される遺伝子座に無関係であり、導入効率の点では遺伝子相同組換え法より優れている。しかし、遺伝子のノックアウトではなくノックダウン法なので完全に遺伝子発現を抑制することはない。さらに、疾患モデルであればなおさら非特異的なゲノムへの影響であるオフターゲット効果を慎重に検討する必要がある。

4 ゲノム操作によらないヒト ES 細胞疾患モデル

疾患患者由来細胞からの ES 細胞樹立が考えられる。体細胞核移植(NT)法による胚と PGD 胚からのヒト ES 細胞の作製である(表1)。

4.1 体細胞核移植法による作製

マウス疾患モデルを用いた NT 法による疾患 ES 細胞樹立と遺伝子ターゲティング法による治療までの一連のストラテジーが示されている²²⁾。ヒト NT 法による ES 細胞の樹立は、現在米国およびイギリスの一部の機関で行われているが、ヒト NT-ES 細胞樹立の報告はなされていない。ヒト NT 法では、マウス卵子で起こるリプログラミング機構とはまた異なるヒト卵子(あるいは受精卵)のリプログラミング機構が存在し、それに合わせた技術的な革新が必要である²³⁾。

表 1 PGD の対象となった症例

遺伝性疾患	検査数
Cystic Fibrosis	69
β -thalassaemia	53
β -thalassaemia + HLA	8
Spinal muscular atrophy	29
Sickle-cell anaemia	9
Huntington disease	90
Huntington disease exclusion	8
Myotonic dystrophy type1	67
Adenomatous polyposis coli	9
Marfan syndrome	8
Duchenne muscular dystrophy	17
Becker muscular dystrophy	4
Haemophilia	14
Fragile-X syndrome	27
Others	104
Total	516

ヨーロッパ生殖医学会(ESHRE)がまとめた単一遺伝子疾患に対する臨床的な PGD 症例数(期間は 2003 年 1 ~12 月:2006 年 ESHRE 報告)

4.2 着床前診断胚を用いた作製²⁹⁾

人為的に遺伝子改変 ES 細胞を作製する以外に、特定遺伝子の変異を持つ胚より作製して疾患モデルヒト ES 細胞を作製することが可能である。着床前期胚の一部の細胞を用いて遺伝子診断が行われている。PGD では、遺伝性疾患が高い確率(25~50%)で子に起こる可能性のある疾患が対象となり、体外受精(あるいは顕微授精)で得られた胚の 3 日目胚から 1 または 2 個の割球を採取し PCR 法および FISH 法によって診断し問題がなかった胚を胚盤胞期で移植する。日本では、PGD は(株)日本産科婦人科学会でその適応が審査され施行されているが、ごくわずかな症例しか行われておらず、現実的に不可能である。欧米では年間に数百例の PGD が行われており、診断可能な疾患は 200 以上に及ぶ²⁹⁾。対象疾患となるものは脆弱 X 症候群、ドゥシャン型筋ジストロフィー症、嚔胞性線維症、副腎白質ジストロフィーなどで行われている。ヨーロッパ生殖医学会が 2003 年に行われた PGD の症例数と疾患を報告している²⁹⁾(表 2)。脆弱 X 症候群の PGD を受けた胚から ES 細胞が樹立され、その詳細なジェネティックおよびエピジェネティック解析の結果が報告されている²⁹⁾。脆弱 X 症候群は遺伝性の精神発達障害を来す病気で、罹患率が 1,500~2,500 人に 1 人と比較的頻度の高い疾患である。X 染色体上にある、脳の発達に重要な FMR1 遺伝子の伸張した CGG トリプレットリピートにより正常なタンパク質が合成されなくなり、最終的に FMR1 の機能低下が起こり症状を呈する。CGG トリプレットリピートと FMR1 の機能低下にはエピジェネティックな制御機構が働いているが、マウスでは有効な実験モデル系が存在していなかった。脆弱 X 症候群-ヒト ES 細胞疾患モデルでは、着床後早期に起

表2 これまで樹立されたヒト ES 細胞疾患モデル

遺伝子ターゲティング法	報告
Lesh-Nyhan syndrome	文献 15) 文献 16)
PGD	
Fragile X syndrome	文献 28)
Adrenoleukodystrophy	文献 29)
Duchenne muscular dystrophy	文献 29)
Becker muscular dystrophy	文献 29)
Fanconi anemia	文献 29)
Complementation group A	文献 29)
Huntington disease	文献 29)
Marfan syndrome	文献 29)
Myotonic dystrophy	文献 29)
Neurofibromatosis type 1	文献 29)
Thalassaemia	文献 29)
Cystic Fibrosis δ F508	文献 30)
Myotonic dystrophy type 1	文献 31)
Hemophilia A	文献 31)
Cystic Fibrosis 405+1G	文献 31)

この神経系構築を反映した ES 細胞分化とともに FMR1 遺伝子プロモータ領域の DNA メチル化やヒストン修飾、FMR1 遺伝子の発現が低下することなど脆弱 X 症候群のメカニズムを解明するための重要な知見が得られている。この系は、他のトリプレットリピート病でもみられるヒト細胞を用いたトリプレットコードと遺伝子発現抑制のメカニズム解明にも極めて貴重な細胞培養系である。

5 疾患モデルの課題

ヒト ES 細胞は高い多分化能性を持ち、種々の疾患モデルへ対応可能となるが、そこには安定した手法で、効率の良いターゲット細胞への分化誘導法が必要となる。ES 細胞からの分化誘導は①胚様体(EB)の形成、②特定の細胞外基質も用いた 2D 培養系、③間葉系支持細胞を用いた共培養システム、等の分化誘導系最適化をはかる。ES 細胞による疾患モデル構築は、幹細胞生物学と発生生物学を基盤にしたアプローチであり、初期発生過程の組織細胞学と分子レベルでの解明が必須である。ES 細胞から分化誘導が可能な細胞でのアプローチが、疾患モデルの対象となる。逆にいえば、分化誘導効率の低い、再現性の不確かな細胞を標的とした疾患モデルは、たとえ PGD 胚より ES 細胞が樹立されたとしても全体の実験系はなかなか成立しにくいことになる。数多ある難治疾患に対応する標的細胞、組織は異なっており目指す細胞への分化誘導系の確立は必須である。

ヒト ES 細胞の樹立から 10 年が経過しヒト ES 細胞を用いた胚発生メカニズムの理解はますます深まっております、ヒト ES 細胞による病態解明へ向けた研究の展開がより進むと考えられる。

6 今後の可能性

ヒト ES 細胞による疾患モデル解析システムは、変性疾患等でこれまでの研究アプローチが限られた、特に適切なヒトサンプルが使用不可能であった疾患へのアプローチの仕方を変える可能性が大きい。病気を引き起こす原因となる細胞が生み出される過程を再現でき、疾患を培養ディッシュ内で再現可能である。適切な細胞株が確立できれば、数年以内に世界中で疾患特異的細胞を用いた研究展開が可能となり得る。それだけでなく、この解析系は環境因子を研究する新たなアプローチ法を獲得できることになるかもしれない。たとえば、喫煙は肺ガンとの因果関係があるようにこのヒト疾患モデル系を応用すれば糖尿病、アルツハイマー、パーキンソン病などの発症および進行、抑制等に作用する物質の影響を解析することができる。長期的視野で病気の進行を止めたり、抑制する薬剤を作り出す系として非常に有効なツールとなり得る。疾患が診断されたときの観察では、病態は理解できるが、その病態がどのように引き起こされてきたか、特に特定の遺伝子変異が原因と判明していない疾患においては、複数の細胞株を樹立する必要があるだろう。望むべくは、体外培養系で全ての異なる細胞株で同様な変性を示せば、細胞間でのバリエーションに合わせた治療ストラテジーを選択できるかもしれない。

参考・引用文献

- 1) T. Dvash: *Pediatr Res.*, 60, p.111(2006).
- 2) 阿久津英憲: *医学のあゆみ*, 223, p.497(2007).
- 3) J.A. Thomson: *Science*, 282, p.1145(1998).
- 4) F.P. Di Giorgio: *Nat. Neurosci.*, 10, p.608(2007).
- 5) T. Dvash, N. Benvenisty: *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 18, p.929(2004).
- 6) M. Rao: *Dev. Biol.*, 275, p.269(2004).
- 7) I.F. Ben-Num: *Mol. Cellular Endocrinol.*, 252, p.154(2006).
- 8) M.A. Bedell: *Genes Dev.*, 11, p.11(1997).
- 9) K. Zeh: *Assay Drug Dev.*, 1, p.755(2003).
- 10) T.P. Zwaka: *Human Stem Cells*, Wiley, p.357(2007).
- 11) S.R. Braam: *Nat. Methods*, 5, p.389(2008).
- 12) E. Salero, M.E. Hatten: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, p.2997(2007).
- 13) A.J. Washkowitz, D.A. Shaywitz: *Human Stem Cells*, Wiley, p.377(2007).