

令和元年6月23日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17082

研究課題名(和文) SIBLINGタンパクを介した修復象牙質形成機構の解明と誘導法確立への展開

研究課題名(英文) The clarification of mechanism regulating reparative dentin formation via SIBLING proteins

研究代表者

齋藤 浩太郎 (Saito, Kotaro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10733719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスおよびオステオポンチン遺伝子欠損マウス(Opn KO)を用いてin vivo窩洞形成実験、in vitro器官培養実験を行い、Dmp1の発現およびnestin陽性象牙芽細胞様細胞の分化率を比較した。窩洞形成実験モデルでは、術後3から7日において、Opn KOでは野生型と比較してDmp1の発現が上昇していた。また、器官培養系では、Dmp1 siRNA処理群において、有意差は認められなかったものの、Nestin陽性象牙芽細胞の分化率が低下していた。以上より、DMP1は歯の損傷後の象牙芽細胞様細胞の分化過程において重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の損傷後に新たな象牙質を形成する象牙芽細胞の分化機構の解明は、将来の歯髄再生治療を実現するのに必須の課題である。本研究では、オステオポンチンおよびdentin matrix protein 1(DMP1)に着目し、これらを抑制するマウスモデルおよび培養実験系を用いて、象牙芽細胞の分化率を比較検討した。オステオポンチンおよびDMP1のいずれも、抑制した系において、有意差はないものの、象牙芽細胞の分化率が低下する傾向を示した。この結果から、DMP1およびオステオポンチンは歯の損傷後の象牙芽細胞の分化を制御する重要な因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the role of DMP1 and OPN in regulating odontoblast-like cell differentiation following tooth injury. Once preexisting odontoblasts died, Nestin-positive newly differentiated odontoblast-like cells were arranged along the pulp-dentin border and began to express DMP1/Dmp1. In Opn KO mice, the expression of DMP1/Dmp1 was upregulated compared to that of wild-type mice. In vitro assay demonstrated that the gene suppression of Dmp1 by siRNA showed a tendency to decrease the differentiation rate of odontoblast-like cells from 70.1% to 52.2% in wild-type teeth. In addition, the suppression of Dmp1 in Opn KO teeth tended to lead to the inhibition of odontoblast-like cell differentiation. These results suggest that the expression of Dmp1 is upregulated in Opn KO mice both in vivo and in vitro and DMP1 compensate for lack of OPN in regulating odontoblast-like cell differentiation following tooth injury.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：象牙芽細胞 オステオポンチン 窩洞形成 マウス 器官培養 DMP1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯の摩耗や咬耗、う蝕、歯の切削などの刺激に応じて、歯髄内に局所的に第三象牙質が形成される。反応の開始の原因となる外来刺激の強さに応じて、第三象牙質はさらに反応象牙質と修復象牙質に分類される。反応象牙質が適度な刺激に反応して生き残った象牙芽細胞によって形成されるのに対して、修復象牙質は既存の象牙芽細胞の死後、新たに分化した象牙芽細胞により形成される。歯の発生過程において象牙質を形成する象牙芽細胞と、歯の損傷後に新たに分化する象牙芽細胞の両者における細胞機能や分化メカニズムの違いは未だ十分明らかにされていない。

近年、組織幹細胞を用いた再生療法の確立へ向けて、幹細胞ソースとして歯髄の生物学的特性が注目されている。幹細胞から象牙芽細胞への効率的な分化誘導を図るには、歯の発生過程における象牙芽細胞の分化機構のみならず、修復象牙質形成過程における象牙芽細胞の分化機構の理解が必要である。

歯の発生過程では、内エナメル上皮とその基底膜が象牙芽細胞の分化の足場およびシグナル分子のリザーバーとして機能する (Oral anatomy, histology, and embryology, 4th ed., 2009) が、歯の損傷後の歯髄治癒過程では内エナメル上皮と基底膜は存在しないため、新たな象牙芽細胞の分化には、その代替となる足場が必須であると考えられる。しかし、象牙芽細胞分化に必要な足場となる因子の特定は未解決の問題である。

申請者は最近、歯の損傷後の新たな象牙芽細胞の分化機構を解析するのに有用な、マウスを用いた臼歯窩洞形成実験モデルを確立した (J Endod.39:1250-1255, 2013)。この系を用いたノックアウトマウスの解析から、接着性骨基質タンパク質の1つであるオステオポンチン(OPN)が、新たに分化した象牙芽細胞のI型コラーゲン形成(修復象牙質形成)に必須であることを明らかにした (J Dent Res. 95(9): 1034-1041, 2016)。また、OPNは細胞接着活性を持つRGD配列を有し、新たに分化した象牙芽細胞はOPNの受容体の1つである integrin  $\alpha_v\beta_3$  を発現していることを示した。一方、*Opn* 遺伝子欠損(KO)マウスにおいて、歯の窩洞形成後、修復象牙質形成は認められないものの、新たな象牙芽細胞の分化そのものは認められた。申請者の予備実験において、新たな象牙芽細胞の分化のタイミングと一致して dentin matrix protein 1 (DMP1)の発現が上昇していることを見出し、DMP1は象牙芽細胞分化の足場としてのOPNの役割を代償している可能性が示唆された。OPNとDMP1は、BSP、DSPP、MEPEとともに、骨と象牙質の細胞外基質の構成タンパク質群である small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein (SIBLING)ファミリーに属し、骨形成や象牙質形成において、石灰化やシグナル伝達を介した細胞の機能成熟に働くことが明らかにされている (J Endocrinol. 214(3): 241-255, 2012)。そこで、本研究課題では、象牙芽細胞の分化機構を明らかにするべく、OPNやDMP1などのSIBLINGファミリーに焦点を当て研究を行った。

### 2. 研究の目的

野生型マウスおよび *Opn* 遺伝子欠損(KO)マウス、TetOP-H2B-GFPマウスを用いて、*in vivo* 実験系として臼歯窩洞形成実験および舌下部移植実験、*in vitro* 実験系として象牙質・歯髄複合体の器官培養を行い、OPNおよびDMP1などのSIBLINGファミリータンパク質の象牙芽細胞様細胞分化過程における役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯の発生過程における発現パターン解析

生後1日齢から4週齢の野生型マウスを灌流固定した後、脱灰後に通法に従いパラフィン切片を作製し、抗DMP1、抗IGF binding protein 5 (IGFBP5)、抗IGFBP3免疫組織化学、*Dmp1*、*Igfbp5*の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

#### (2) 歯の窩洞形成後の象牙芽細胞分化過程におけるOPNとDMP1の役割

生後5週齢の野生型マウスおよび *Opn* KOマウスの上顎第一臼歯近心歯頸部にラウンドバーを用いて溝状の窩洞を形成した。術後1~7日後に灌流固定した後、脱灰後に通法に従いパラフィン切片を作製し、抗Nestin、抗DSP、抗DMP1免疫組織化学、*Dmp1*の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

#### (3) 歯冠部舌下移植後の歯髄幹細胞のIGFBP5の発現解析

doxycycline 依存性に H2B-GFP 発現を誘導でき細胞の分裂頻度に応じてラベリング可能な TetOP-H2B-GFP マウスを用いて、生後3週齢にて上顎第一臼歯を抜去後、サージカルメスで歯根を割断した後、舌下部に移植した。術後1~7日後に灌流固定した後、脱灰後に通法に従いパラフィン切片または凍結切片を作製し、抗GFP、抗IGFBP5免疫組織化学、TUNEL染色、*Igfbp5*の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

#### (4) 象牙質・歯髄複合体の器官培養系を用いたOPNおよびDMP1の象牙芽細胞分化過程における役割の解析

生後3週齢の野生型マウスおよび *Opn* KOマウスの上顎第一臼歯を抜去後、サージカルメス

で半分に分断した後、*Dmp1* の small interfering RNA ( siRNA ) を培地に加え、Trowel 法にて、象牙質・歯髄複合体の器官培養を行った。培地は 2 日ごとに交換した。培養開始後 7 日に固定し、抗 Nestin、免疫組織化学、*Dmp1* の *in situ* hybridization を行った。象牙質・歯髄界面における Nestin 陽性率を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯の発生過程における発現パターン解析

野生型マウスの臼歯歯胚において、Nestin 陽性反応は、前象牙芽細胞以降、分化した象牙芽細胞に持続的に認められた。*DMP1* 陽性反応もまた、前象牙芽細胞以降、分化した象牙芽細胞に持続的に認められる。また、生後 2 週齢では、歯髄広範に *DMP1* 陽性反応が認められた。*Dmp1* の発現は、生後 1 日において、前象牙芽細胞および幼若象牙芽細胞に強く認められたが、生後 3 日において、象牙芽細胞の成熟にしたがってその発現が減弱していた ( 図 1 )。また、骨細胞および骨芽細胞にも *Dmp1* の発現が認められた。生後 2 週齢では、歯冠部の象牙芽細胞はほとんど *Dmp1* を発現しておらず、髄床底部や歯根部の未熟な象牙芽細胞においてその発現が認められた。

生後 1 日齢から生後 1 週齢の臼歯歯胚において、髄角部に一部強い *Igfbp5* の発現が認められ、歯髄中央部も弱く発現が認められた。IGFBP5 の免疫組織化学では陽性反応が核に局在しており、IGF1 とは独立して作用することが示唆された。IGFBP5 の発現は生後 4 週齢では象牙芽細胞の発現は減弱し、歯髄の前駆細胞/幹細胞が局在すると考えられている象牙芽細胞下層と歯髄中央部に強い発現が認められた。

生後 4 週齢の切歯において、前象牙芽細胞に強い IGFBP3 の一過性の発現が認められ、幼若象牙芽細胞へと分化が進行するにつれてその発現が減弱しており、IGFBP3 は IGF-1 の細胞増殖作用を制御し、分化を方向付ける役割を担うことが示唆された。

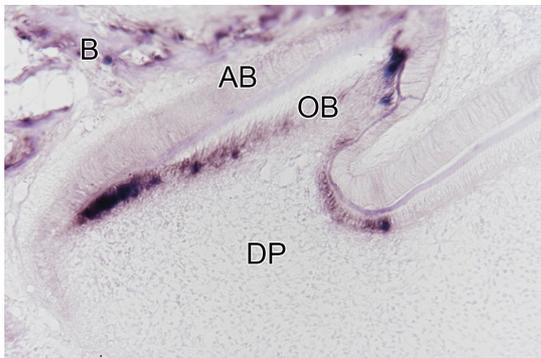


図 1. 野生型マウスにおける臼歯歯胚 ( 生後 3 日 ) の *Dmp1* の発現 ( *in situ* ハイブリダイゼーション ).  
AB: エナメル芽細胞 B: 骨  
D: 象牙質 DP: 歯乳頭

##### (2) 歯の窩洞形成後の象牙芽細胞分化過程における OPN と *DMP1* の役割

窩洞を形成していない対照群の *Opn* KO マウスの歯髄には組織学的に明らかな発生学的異常は認められず、野生型マウスと同様に、歯髄・象牙質界面に Nestin 陽性の象牙芽細胞が配列していた。また、象牙芽細胞は OPN 陰性であった。

窩洞形成後 1 日では、野生型および *Opn* KO マウスにおいて、窩洞直下の象牙芽細胞は変性し、Nestin 陽性反応および *DMP1* の発現が消失していた。術後 3 日において、野生型、*Opn* KO マウスともに、窩洞直下の歯髄象牙境に Nestin 陽性の象牙芽細胞様細胞の配列が認められた。*DMP1/Dmp1* の発現は、分化した象牙芽細胞様細胞に認められたが、野生型マウスより KO マウスにおいてその発現が強く認められた ( 図 2 )。術後 7 日において、野生型マウスでは新たに分化した象牙芽細胞の *DMP1* の発現は減弱していたが、一方、*Opn* KO マウスでは持続的に *DMP1* の発現が認められた。

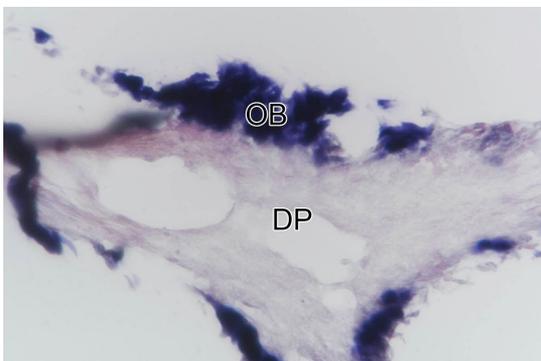


図 2. *Opn* KO マウスにおける窩洞形成後 3 日の象牙芽細胞様細胞の *Dmp1* の発現 ( *in situ* ハイブリダイゼーション ).  
新たに分化した象牙芽細胞様細胞に強い *Dmp1* の発現が認められる。  
DP: 歯乳頭 OB: 象牙芽細胞様細胞

##### (3) 歯冠部舌下移植後の歯髄幹細胞の IGFBP5 の発現解析

TetOP-H2B-GFP マウスを用いた歯冠部の舌下部移植後 3 日では、既存の象牙芽細胞と象牙芽細胞下層の細胞のアポトーシスが有意に亢進しており、それに伴い H2B-GFP ラベル細胞の

数も有意に増加していた。一方、歯髄中央部ではアポトーシスは亢進しておらず、ラベル細胞が維持されていた。歯髄中央部に局在していた H2B-GFP ラベル細胞の 70~80%が IGFBP5 陽性を示し、*Igfbp5* の *in situ* ハイブリダイゼーションの所見においてもその発現はラベル細胞の局在と一致していた。一方、歯髄中央部における H2B-GFP ラベル細胞は TUNEL 共陽性を示さず、アポトーシスを生じることなく維持されていることが示唆された。RT-PCR の所見も、歯髄細胞が IGFBP5 を発現していることを裏付けていた。術後 7 日では、歯髄内のアポトーシスは減弱していた。新たに分化した象牙芽細胞様細胞のあるものにはラベル細胞がコミットしており、ラベル細胞が象牙芽細胞様細胞に分化したことが示唆された。また、歯髄内広範に IGFBP5 の発現が認められた。以上より、IGFBP5 は損傷後の歯髄治癒過程において、IGF-independent な作用を介して歯髄幹細胞/前駆細胞の生存・維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### (4) 象牙質・歯髄複合体の器官培養系を用いた OPN および DMP1 の象牙芽細胞分化過程における役割の解析

まず、野生型マウス器官培養系において、コントロール siRNA および *Dmp1* siRNA 処理下における象牙芽細胞分化率を比較した。培養 7 日において、コントロール siRNA 処理群では、新しく分化した象牙芽細胞様細胞に強い *Dmp1* の発現が認められ、歯髄象牙境全体の約 70.1%の部位において、Nestin 陽性象牙芽細胞様細胞の分化が認められた(図 3)。

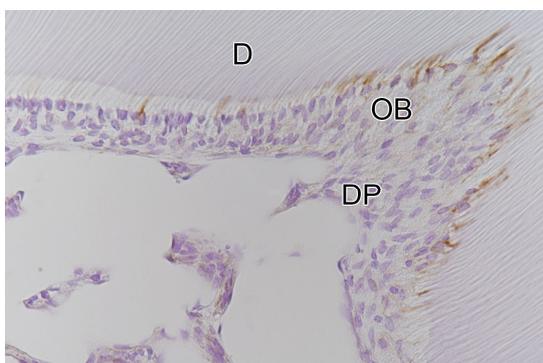


図 3 .野生型マウスにおけるコントロール siRNA 処理下における象牙質・歯髄複合体の器官培養 7 日の象牙芽細胞分化 (Nestin 免疫組織化学).  
歯髄象牙境全体の約 70.1%の部位において、Nestin 陽性象牙芽細胞様細胞の分化が認められた。  
D: 象牙質 DP: 歯髄 OB: 象牙芽細胞

一方、*Dmp1* siRNA 処理群では、real-time PCR と *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から *Dmp1* の発現減少が認められ、歯髄象牙境全体の約 52.2%の部位において、Nestin 陽性象牙芽細胞様細胞の分化が認められ、有意差は無いものの、象牙芽細胞の分化が抑制される傾向が示された。

次に、*Opn* KO マウス器官培養系において、コントロール siRNA および *Dmp1* siRNA 処理下における象牙芽細胞分化率を比較した。培養 7 日において、コントロール siRNA 投与群では、歯髄象牙境全体の約 67.1%の部位において、Nestin 陽性象牙芽細胞様細胞の分化が認められた。real-time PCR の結果から、野生型と比較して *Opn* KO では歯髄の *Dmp1* の発現が上昇しており、OPN の欠損を代償していると考えられた。一方、*Dmp1* siRNA 投与群では、real-time PCR と *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から *Dmp1* の発現減少が認められ、歯髄象牙境全体の約 42.8%の部位において、Nestin 陽性象牙芽細胞様細胞の分化が認められ、有意差は無いものの、*Dmp1* と *Opn* の発現抑制により象牙芽細胞様細胞の分化がさらに阻害される傾向が示された(図 4)。

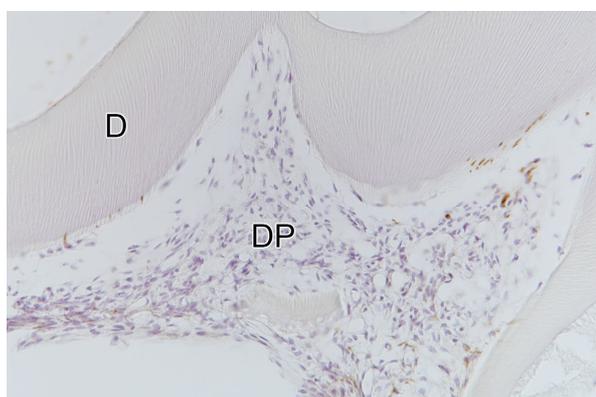


図 4 .オステオポンチン遺伝子欠損(*Opn* KO)マウスの *Dmp1* siRNA 処理下における象牙質・歯髄複合体の器官培養 7 日の象牙芽細胞分化 (Nestin 免疫組織化学).  
歯髄象牙境全体の約 42.8%の部位において、Nestin 陽性象牙芽細胞様細胞の分化が認められ、対照群と比較して象牙芽細胞様細胞の分化率が低下する傾向が示された。D: 象牙質 DP: 歯髄

#### (5) 結論

以上の結果から、IGFBP5 は損傷後の歯髄治癒過程において、IGF-independent な作用を介して歯髄幹細胞/前駆細胞の生存・維持に重要な役割を担っていることが示唆された。また、IGFBP3 は IGF-1 の細胞増殖作用を制御し、分化を方向付ける役割を担うことが示唆された。

そして DMP1 は歯の損傷後の象牙芽細胞の分化過程において、OPN の足場としての作用を代償し、その分化の制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Nakatomi C, Saito K, Kenmotsu S, Maas RL, Ohshima H:

*Msx2 prevents stratified squamous epithelium formation in the enamel organ.*

*J Dent Res* 97(12): 1355-1364, 2018

査読有,

DOI: 10.1177/0022034518777746

Nakaki T, Nakakura-Ohshima K, Nakagawa E, Ishikawa Y, Saito K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H:

*Donor-host tissue interaction in the allogenic transplanted tooth germ with special reference to periodontal tissue.*

*Journal of Oral Biosciences.* 60(1): 21-30, 2018

査読有,

DOI: 10.1016/j.job.2018.02.002

Saito K, Ohshima H:

*Differentiation capacity and maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in the process of pulpal healing following tooth injuries.*

*Journal of Oral Biosciences.* 59(2): 63-70, 2017

査読有,

DOI: 10.1016/j.job.2017.03.001

〔学会発表〕(計 8 件)

相澤知里, 齋藤浩太郎, 大島勇人:

マウス象牙芽細胞分化過程における IGFBP3 を介した IGF-I の制御 .

第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会,

朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター

新潟,

2019 年 3 月 27-29 日

今井千尋, 佐野拓人, 齋藤浩太郎, 中富満城, 依田浩子, 岡野栄之, 大島勇人:

マウス臼歯切削後の象牙芽細胞再生過程における象牙芽細胞下層の役割 .

第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会,

朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター

新潟,

2019 年 3 月 27-29 日

石川裕子, 依田浩子, 齋藤浩太郎, 中富満城, 大島勇人:

マウス臼歯・臼歯の静的幹細胞維持に関わる Shh シグナルの役割 .

第 60 回歯科基礎医学会学術大会,

九州大学医学部百年講堂

博多,

2018 年 9 月 5-7 日

真喜志佐奈子, 渡辺泰典, 齋藤浩太郎, 大島勇人:

インプラント表面のハイドロキシアパタイトはオステオポンチン沈着に影響を与え直接性骨形成を促進する .

第 60 回歯科基礎医学会学術大会,

九州大学医学部百年講堂

博多,

2018 年 9 月 5-7 日

齋藤浩太郎, 依田浩子, 大島邦子, 大島勇人:

マウス歯肉接合上皮細胞の由来と動態について .

第 60 回歯科基礎医学会学術大会，  
九州大学医学部百年講堂  
博多，  
2018 年 9 月 5-7 日

Ohshima H, Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H: The role of subodontoblastic layer for pulpal healing after tooth injuries.  
6th Tripartite Conference on Tooth and Bone in Development & Regeneration,  
香港，  
2018 年 8 月 17-20 日。

真喜志佐奈子，齋藤浩太郎，山崎智彦，大島勇人：  
Direct osteogenesis is promoted by Osteopontin protein coated on the implant surface.  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会，  
日本獣医生命科学大学・日本医科大学武蔵野キャンパス  
武蔵野，  
2018 年 3 月 28-30 日

齋藤浩太郎，大島勇人：  
歯の発生・創傷治癒過程における歯髄恒常性維持に関わる IGF binding protein 5 の役割。  
第 59 回歯科基礎医学会学術大会，  
松本歯科大学キャンパス，  
長野県塩尻市，  
2017 年 9 月 16-18 日

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。