

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20592394

研究課題名 (和文) 歯の他家移植治療法の基盤となる歯根膜細胞の分化誘導法の確立

研究課題名 (英文) Establishment of the method to induce periodontal tissue cells for the allogenic tooth transplantation in clinical dentistry

研究代表者

大島 邦子 (OHSHIMA KUNIKO)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80213693

研究成果の概要 (和文)：

胎生期 BrdU ラベリング法を歯の他家移植に応用し、歯の移植後の歯髄と歯周組織再生過程における Label-retaining cells (LRCs) の動態を観察した。その結果、歯の移植後にドナーの LRCs が歯髄中央部に維持されると象牙質形成が惹起されることが明らかとなった。また、GFP マウスを用いた実験により、移植歯の歯髄は内皮細胞と遊走性間葉細胞を除きドナーの細胞で構成されており、歯周組織はマラッセの上皮遺残以外はホスト細胞に置き換わっていることも明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

This study aims to clarify the responses of BrdU label-retaining cells during pulpal and periodontal healing following allogenic transplantation in mice using prenatal BrdU-labeling. As a result, it is suggested that the maintenance of BrdU-label-retaining dental pulp cells is the decisive factor for the regeneration of odontoblast-like cells in the process of pulpal healing following tooth transplantation. Tooth transplantation using GFP mice demonstrated that the donor cells constituted the dental pulp of the transplant except for endothelial cells and some migrated cells, and the periodontal tissue was replaced by host-derived cells except for epithelial cell rests of Malassez.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：他家移植、歯髄、歯根膜、BrdU、幹細胞、細胞増殖、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、大学病院小児歯科外来では、小児医療の発達により、これまで生命予後の悪いとされてきた重篤な疾患の患児らの口腔内を

管理する機会が増えている。中でも、乳・幼児期に悪性腫瘍に罹患した小児は、抗がん剤及び放射線療法により、永久歯の歯根形成異常や歯胚欠如を全顎的に認め、学童期から多

数歯欠損の危機にさらされている。歯の自家移植が広く行われるようになってきた現在でも、このような患児では自家移植歯が存在しないため、いまだ有効な治療法はないのが現状である。このような症例を含め、歯の移植を他家移植まで拡大できれば、その適応症は格段に拡大すると考えられるが、これを成功に導くためには、免疫拒絶反応や歯根吸収、アンキローシスの問題を解決しなければならない。

我々はこれまで、やはり小児歯科臨床でよく遭遇する永久歯完全脱臼の際の再植の治療機構を解明するため、動物を用いた基礎的研究を進めてきた。その中で、再植後の歯髄治療過程には、歯髄内に象牙質が形成される場合と、骨組織が形成される場合があることを明らかにした (Cell Tissue Res, 325: 219-229, 2006)。さらに、GaAlAs 半導体レーザーをラットの歯に照射すると、弱い刺激では歯髄腔内に象牙質形成が誘導され、強い刺激では骨組織が惹起されることを示した (Eur J Oral Sci, 114, 50-57, 2006)。すなわち、歯髄組織には骨組織形成能を含めた多分化能をもつ細胞が存在し、これが歯根吸収やアンキローシスを引き起こすものと考えられた。

さらに我々は、その多分化能を持つ細胞を検索する過程で、ネズミ (クローズドコロニーマウス) の歯を他のネズミの抜歯窩へ移植する他家移植実験系を確立することに成功した。この実験では、異腹マウスを用いると、半数のネズミの歯髄腔で免疫拒絶反応が起こり、歯髄組織が消失して骨髄様組織に置換したが、興味深いことに、歯周組織は全例で再生することが明らかとなった。これは、移植歯の存在により、ホストの歯周組織幹細胞から歯周組織が誘導された可能性を示唆しており、他家移植の臨床応用の可能性を示すものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、歯の他家移植において、ホストの細胞を移植歯の歯根膜細胞に分化誘導する方法を確立することを念頭に、予備実験により再生された歯周組織の由来を明らかにし、それがどのような環境によって分化・増殖していくかを検索する。すなわち、我々がすでに確立している他家移植実験と、歯髄及び歯周組織幹細胞のラベル法を組み合わせることにより、各々の幹細胞の分化能を解明するとともに両者の相互作用を明らかにすることを目的としている。実験動物としてはクローズドコロニーマウス (ICR 系マウ

ス) および近交系マウス (GFP 遺伝子導入 B6 マウス) を用い、下記の項目を順次明らかにする。

(1) 歯冠部の舌下部への他家移植実験系における歯髄の治癒過程と組織幹細胞との関連を明らかにする。

(2) 歯の抜歯窩への他家移植実験系における歯髄・歯周組織の治癒過程と組織幹細胞との関連を明らかにする。

歯髄及び歯周組織幹細胞の同定には、下記に示す胎生期プロモデオキシウリジン (BrdU) ラベリング法により行い、幹細胞をラベルしたマウスと非ラベルのマウス間で他家移植を行う。(1)の実験系は歯周組織のない環境で歯髄の分化能を検索する系であり、(2)では、移植床のホスト歯周組織が存在する系における歯髄と歯周組織の分化能について検索する系となる。

3. 研究の方法

我々は、毛包の幹細胞を明らかにした手法 (Nature 438: 1026-1029, 2005) を参考に、歯髄及び歯周組織幹細胞の局在を BrdU 法にて明らかにすることに成功した。幹細胞は非対称分裂する (一方の娘細胞は盛んに細胞増殖をして分化の方向へ進むが、もう一方の娘細胞は分裂せずその場にとどまる) ので、DNA 合成期に核内に取り込まれる BrdU を妊娠マウス (クローズドコロニー ICR 系) 腹腔内に毎日 1 回 (150 mg/kg) 3 日間投与したのち、2 週間以上置くと組織幹細胞のみを BrdU でラベルすることができる (ラベルマウス)。このラベルマウスと、BrdU を投与しない非ラベルマウス間で、2 つの系の家他移植実験を行うことにより、(1)歯周組織のない環境で歯髄の分化能を検索すると共に、(2)移植床のホスト歯周組織が存在する系における歯髄細胞と歯根膜細胞の分化能について検索する。

(1) 歯冠部の舌下部への他家移植実験系

3 週齢のラベルマウスと非ラベルマウス間で、上顎第一臼歯を抜去後、歯根部と髄床底を除去し、歯冠部だけ舌下部へ他家移植した。術後 1~14 日後に動物を固定し、脱灰後通法通りパラフィン切片を作製し、免疫組織化学的手法で歯髄組織幹細胞の反応を検索した。さらに象牙芽細胞の分化マーカーとしてネスチン発現、骨芽細胞のマーカーとしてオステオポンチン (OPN) 発現、細胞増殖マーカーとして Ki67 発現、アポトーシスの評価として TUNEL 染色を用いた解析を行った。

(2) 歯の抜歯窩への他家移植実験系

2週齢のラベルマウスと非ラベルマウス間で、上顎第一臼歯を抜去後、抜歯窩へ他家移植した。術後1~14日後に動物を固定し、脱灰後通法通りパラフィン切片を作製し、免疫組織化学的手法で歯髓組織幹細胞の反応を検索した。さらに象牙芽細胞の分化マーカーとしてネスチン発現、骨芽細胞のマーカーとしてオステオポンチン(OPN)発現、歯根膜のマーカーとしてペリオスチン発現を免疫組織化学およびin situ ハイブリダイゼーション法により解析した。さらに、GFPマウスと野生型マウス間でも他家移植を行い、ドナー・ホスト間相互作用を検索した。

4. 研究成果

(1) 歯冠部の舌下部への他家移植実験系

本研究では、Label-retaining cell (LRC)を含む歯髓固有の細胞が移植後に象牙芽細胞様細胞に分化することが明らかになった。この結果は、新たに分化した象牙芽細胞が移植歯の歯髓に由来することを示した我々の過去の ROSA26 遺伝子改変マウスを用いた研究結果 (J Histochem Cytochem 56:1075-1086, 2008) と一致する。最近我々は歯髓中央部に存在する LRC が STRO-1 や CD146 などの歯髓幹細胞マーカーを発現し、SP 細胞分画と一致するなど、幹細胞の特徴をもつことを明らかにしている。従って、歯根と髓床底を除去後も歯髓幹細胞が維持され、歯髓幹細胞が象牙芽細胞様細胞へ分化したことを示唆している。一方、骨芽細胞系細胞の由来については、ドナー由来 LRC、ホスト由来 LRC、歯髓固有の細胞、骨髄細胞を含む周囲組織の他の細胞群の関与が考えられるが、骨髄細胞の関与については今後 GFP 陽性骨髄キメラマウス等を使った移植実験を行う必要がある。

他家移植後の歯髓治癒過程において、ドナーおよびホスト LRC に劇的な変化が起こることが明らかになった。ドナーおよびホスト LRC は高い細胞増殖活性を保持しており、幹細胞の特徴を示している。興味深いことに、ホスト由来 LRC は歯髓腔に侵入し一過性に増加し、最終的に消失する。この事実は、歯の他家移植後の歯髓治癒過程において、ダイナミックなドナー・ホスト間相互作用が起こっていることを示唆している。今回我々は BrdU・Ki67 二重染色に成功し、一次的増幅細胞と組織幹細胞を区別することに成功した。術後3~5日でドナーおよびホスト LRC は30~50%の一次的増幅細胞を含んでおり、ドナー由来 LRC は象牙芽細胞様細胞分化が

起こると増殖活性を減少させ、術後14日には象牙芽細胞様細胞以外の陽性細胞が消失した。一方、ホスト由来 LRC は術後7日で歯髓腔から消失した。従って、歯の他家移植の環境では、ドナー・ホスト間相互作用により幹細胞ニッチが長期間維持されないことを示している。

歯の他家移植後の歯髓治癒過程において、広範なアポトーシスが起こることが明らかになった。歯の切削後にも歯髓でアポトーシスが惹起されることが報告されており、歯の損傷後に歯髓でアポトーシスが惹起されるのは共通した現象の様である。注目すべき点は、アポトーシスが起こる時期が細胞増殖の時期と一致する点である。今回我々は、BrdU・TUNEL 二重染色に成功し、術後3~5日にドナー由来 LRC の10~15%にアポトーシスが起これ、LRC が象牙芽細胞様細胞に分化すると LRC のアポトーシスの割合が増加することが明らかとなった。従って、ドナー由来 LRC は広範なアポトーシスにより歯髓から排除されることが明らかとなった。

結論として、移植歯の LRC は広範なアポトーシスが起これるにも拘わらずその増殖能と分化能を維持しているのに対し、ホスト由来 LRC は一過性に増加するものの最終的にはアポトーシスにより排除されることが明らかとなった。

(2) 歯の抜歯窩への他家移植実験系

歯の移植は象牙芽細胞層の変性を引き起こし、ネスチン陽性反応が歯髓から消失した。成功した例では、術後5~7日で既存の象牙質に連続して第三象牙質形成が開始し、その直下にネスチン陽性象牙芽細胞様細胞が配列した。BrdU でラベルした移植歯では、濃く染まった LRC が歯髓中央部に維持されており、象牙芽細胞様細胞にコミットされていたのに対し、骨様組織周囲には LRC は観察されなかった。一方、非ラベル移植歯では、実験期間を通して LRC は歯髓内に観察されなかった。LRC が新たに分化した象牙芽細胞様細胞にコミットされたのに対し、骨芽細胞様細胞にはコミットされない事より、歯の移植後の歯髓治癒過程において、LRC の維持が象牙芽細胞様細胞の再生の決定因子であることが明らかになった。この結果はラットを用いた歯の再植後の LRC の反応の結果と一致する。しかしながら、本研究では、術後4週で歯髓から LRC が消失した。このことは、歯の他家移植後には幹細胞ニッチが長期間維持されない事を示している。興味深いことに、第三象牙質形成が持続し、術後8週には歯髓腔を埋め尽くした。歯の再植後には歯髓腔は狭窄するものの歯髓腔が保たれており、歯髓腔の消失も歯の他家移植後のドナー・ホスト間相互作用の結果であると思われる。

本研究では、クローズドコロニー (ICR マウス) と近交系 (B6 マウス) の歯髄治癒パターンの違いも明らかになった。ICR マウスでは 6% に免疫拒絶反応が惹起されたのに対し、B6 マウスでは全く拒絶反応は起こらなかった。歯髄治癒パターンの違いはドナー・ホスト相互作用の結果であると思われる。また、GFP マウスの解析により、移植歯の歯髄は内皮細胞と遊走性間葉細胞を除きドナーの細胞で構成されており、歯周組織はマラッセの上皮遺残以外はホスト細胞に置き換わっていることが明らかとなった。この結果は、移植歯の歯髄内皮細胞はすべて消失し、その後ホストの血管がその他の間葉細胞と共に歯髄内に侵入したことを示している。ホスト由来遊走細胞の存在は、歯周組織や骨髄細胞の様な他の細胞群が歯髄内に侵入したことを示す所見である。一方、歯根膜におけるマラッセの上皮遺残の機能は明らかになっていないが、歯根表面の吸収やアンキローシスを防いだり、歯根膜の幅の維持に関与することが推測されている。マラッセの上皮遺残のは歯周組織の再生にも重要な役割を担っていると思われる。

本研究では、術後 3 日でペリオスチンの発現が消失し、術後 5 日で再発現を開始することから、ペリオスチンの発現パターンが歯周組織の再生過程をモニターするのに優れたマーカーであることが示された。術後 5 日には、ペリオスチン陽性細胞が歯髄腔にも出現することは注目し、血行が回復する時期に歯周組織細胞が歯髄内に侵入することを示している。一方、OPN 陽性細胞も術後 3 ～5 日に歯髄腔に出現し、7 日に数が減少し、既存の象牙質と修復象牙質の界面に OPN の沈着が見られる。我々の過去の研究 (J Histochem Cytochem 59: 518-529, 2011) により、マクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞による GM-CSF と OPN の分泌が樹状細胞の成熟と象牙芽細胞分化に役割を演じていることが明らかになっており、本実験系においても同様な現象が起こっていると推察される。

結論として、歯髄幹細胞と思われる LRC が歯の移植後の歯髄治癒過程における象牙芽細胞様細胞再生の決定因子であることを示唆している。しかしながら、歯の他家移植後のドナー・ホスト間相互作用により幹細胞ニッチは長期間維持されずに、持続的な象牙質形成が起こり歯髄腔が消失することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Kenmotsu S, Ohshima H: The expression of GM-CSF and osteopontin in immunocompetent cells precedes the odontoblast differentiation following allogenic tooth transplantation in mice. J Histochem Cytochem 59(5): 518-529, 2011.
- ② Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Honda MJ, Ishii Y, Watanabe N, Ohshima H: Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. Histochem Cell Biol, 134:227-41, 2010.
- ③ Unno H, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Ohshima H: Pulpal regeneration following allogenic tooth transplantation into mouse maxilla. Anat Rec, 292(4):570-9, 2009.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 斎藤浩太郎, 中富満城, 依田浩子, 大島 勇人: マウス臼歯他家移植後の象牙芽細胞分化過程における GM-CSF およびオステオポンチンの発現. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 2010. 9. 20-22
- ② Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Kenmotsu K, Ohshima H: The expression of GM-CSF and osteopontin in immunocompetent cells precedes the odontoblast differentiation following allogenic tooth transplantation in mice. 10th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, Berlin, Germany, 2010. 9. 1-4.
- ③ Mutoh N, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Nakagawa E, Tani-Ishii N, Ohshima H: Responses of BrdU-label-retaining dental pulp cells to allogenic tooth transplantation into mouse maxilla. 10th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, Berlin, Germany, 2010. 9. 1-4
- ④ 武藤徳子, 石井信之, 大島 勇人: 胎生期 BrdU ラベリング法を用いたマウス顎骨への歯の他家移植後の歯髄・歯周組織再生過程における label-retaining cells の動態について. 神奈川歯科大学学会第 44 回総会, 横須賀, 2009. 12. 5
- ⑤ 中川英蔵, 依田浩子, 吉江弘正, 大島 勇人: マウス顎骨への歯胚他家移植後の歯周組織形成過程について. 第 51 回歯科基

礎医学会学術大会・総会，新潟，2009. 9. 9-11

- ⑥ 大島 勇人，石川裕子，依田浩子，鈴木啓展，監物新一，大島 邦子：マウス舌下部への臼歯および歯冠部の他家移植後の歯髄組織幹細胞の動態と硬組織形成能について．第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会，岡山，2009. 3. 28-30
- ⑦ 大島 勇人，石川裕子，依田浩子，鈴木啓展，監物新一，大島 邦子，本田雅規，石井有実子，渡辺信和：ラット臼歯歯髄に存在する組織幹細胞：BrdU ラベル細胞と SP 細胞との相関について．第 8 回日本再生医療学会総会，東京，2009. 3. 4-6

〔図書〕（計 1 件）

- ① Honda MJ, Ohshima H: Stem cells in tooth development and regeneration. In: (Singh SR ed) Stem cell, regenerative medicine and cancer. Chapter 7. Nova Science Publishers, pp. 185-206. 2010.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 邦子 (OHSHIMA KUNIKO)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80213693

(2)研究分担者

大島 勇人 (OHSHIMA HAYATO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：70251824

三富 智恵 (MITOMI TOMOE)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00313528