

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18544

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞ニッチ形成の基礎となる血管ネットワークの解明

研究課題名(英文) Vascular network as a basis for dental pulp stem cell niche formation

研究代表者

三友 啓介(MITOMO, KEISUKE)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90844051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄内のTypeH血管は存在するが、その血管量は経年的に減少していくことが明らかとなった。またTypeH血管と硬組織形成との関連性について検討した。野生型のC57BL/6Jマウス(4w・8w・12w)にカルセインラベリングし新生硬組織を標識したうえで、抗Endomucin抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果歯髄・象牙質ではカルセインラベリングされた新生硬組織直下にEndomucin陽性血管を多く認めた。これよりEndomucin血管は歯髄内の硬組織新生に寄与することが示唆された。現在この結果を踏まえて論文を執筆中であり、英論文雑誌に投稿予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果より、歯髄を構成する血管ネットワークは硬組織形成に寄与することが示唆された。これは、象牙質の形成や歯髄幹細胞ニッチ形成を解明するための基礎となると考えている。

研究成果の概要(英文)：It was found that Type H vessels in the pulp exist, but that the amount of these vessels decreases over time. The relationship between Type H blood vessels and hard tissue formation was also examined. Wild-type C57BL/6J mice (4w, 8w, and 12w) were calcein-labeled and labeled with neoplastic hard tissues, which were then immunostained with anti-endomucin antibodies. The results showed that many Endomucin-positive vessels were observed in the pulp and dentin just below the calcein-labeled neocortical tissue. This suggests that Endomucin vessels contribute to hard tissue regeneration in the dental pulp. A paper based on these results is currently being written and will be submitted to an English journal. Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：歯髄

キーワード：歯髄 Type H血管

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨は、骨髄において動脈・静脈・毛細血管を含む血管ネットワークを構成している。その役割は酸素や栄養素などの運搬のみならず、骨の成長や恒常性に寄与している。近年、マウスにおいて血管マーカーである CD31<sup>(high)</sup>Endomucin<sup>(high)</sup>の毛細血管(Type H 毛細血管)が骨形成と血管形成のカップリングを担うことが発見された。そして Type H 毛細血管の近傍には前骨芽細胞ニッチが形成されており、Type H 毛細血管はその前骨芽細胞ニッチの維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

一方、歯髄も骨髄と同様に血管に富んだ組織であり、組織中には歯髄幹細胞が存在する。歯髄幹細胞は象牙芽細胞に分化する能力を持ち、象牙芽細胞から産生される修復象牙質により齶蝕などの外的刺激から歯髄を保護する役割を果たしている。そして骨と同様に歯髄幹細胞も血管周囲に存在していることが明らかとなっている。このように歯髄においても、形態学的位置関係から歯髄幹細胞ニッチを維持するために血管網が何らかの働きをしているのではないかと考えられる。しかし、その血管網が歯髄幹細胞に対してどのような働きをしているのかは明らかにされていない。それ以前に、歯髄血管網にはどのような血管サブタイプが存在し、どのような分布を示しているのかさえわかっていない。そこで本研究では「歯髄にはどのような血管サブタイプが存在するのか？」また「骨と同様に歯髄には CD31<sup>(high)</sup>Endomucin<sup>(high)</sup>の Type H 毛細血管網は存在するのか？」ということの研究課題の核心をなす学術的「問い」と設定した。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず歯髄血管網にはどのようなサブタイプが存在し、歯髄内でどのような分布を示すのかを解明する。更に窩洞形成などの外的刺激に対して血管網にどのような変化が起こるのかを解明する。

そのために次のことを明らかにしていく。

CD31・Endomucin など血管内皮特異的マーカーの蛍光免疫染色による歯髄内血管サブタイプの解析と同定。

歯髄では CD31・Endomucin 共陽性である Type H 血管網が存在するか。

### 3. 研究の方法

#### αSMA、CD31、Endomucin などの内皮細胞特異的マーカーの蛍光免疫染色によるマウス歯髄血管ネットワークの解析

骨では骨幹端や骨内膜に沿って、CD31<sup>(high)</sup>Endomucin<sup>(high)</sup>毛細血管が認められ、その周囲に前骨芽細胞ニッチが確認されている (Kusumbe et al. Nature 2014)。またそれら血管の形成が阻害されると前骨芽細胞ニッチの形成も障害されるといった血管形成と骨形成のカップリングが明らかになっている。それらのマーカーを発現する血管が歯髄にも存在し、歯髄幹細胞において何らかの機能を持っている可能性が考えられる。内皮細胞に発現する CD31・Endomucin、血管平滑筋に発現する αSMA の蛍光免疫染色を行い、歯髄血管網の局在や特徴的な血管サブタイプを同定していく。そして骨と同様に CD31・Endomucin 陽性 (Type H) 毛細血管網が存在するのかを確認する。標本は 1 ~ 12・57 週齢マウス (C57BL/6) 上顎第一臼歯歯髄を用い、4%パラホルムアルデヒド溶液を大動脈より灌流固定を行う。その後、上顎骨を摘出し、通法にしたがい凍結切片作製する。各種免疫染色を施した後、標本の観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM880 Airy NLO カールツァイス社：現有機器) を使用する。蛍光免疫染色の定量化には ImageJ を用いて解析を行った。

#### 4 . 研究成果

野生型の C57BL/6J マウス ( 1w・4w・12w・aged ) の歯髄・歯周組織を用いて凍結切片を作製し、抗 CD31 抗体と抗 Endomucin 抗体による 2 重蛍光免疫染色を行った。その結果、1 w マウス歯髄では豊富な血管 網を認め、CD31・Endomucin 共に強陽性である TypeH 血管は象牙芽細胞層に沿って多く存在することがわかった。4 w マウス歯髄では以前 TypeH 血管は象牙芽細胞 層に沿って存在するもののその局在は歯冠から歯根へ移ったことが示唆された。12W になると、歯髄内の TypeH 血管はほとんど認められず、CD31 陽性血管がそのほ とんどを占めていた。一方歯根膜では、遠心根より近心根の歯根膜に TypeH 血管が多く認めた。また歯髄とは違い経年的変化があまりないことが示唆された。 ImageJ を用いた定量解析でも、歯髄では有意差をもって TypeH 血管は経時的に減少するが、歯根膜では経時的に有意な差はないことがわかった。以上より、歯髄 内の TypeH 血管は存在するが、その血管量は経年的に減少していくことが明らかとなった。また TypeH 血管と硬組織形成との関連性について検討した。野生型の C57BL/6J マウス ( 4w・8w・12w ) にカルセインラベリングし新生硬組織を標識したうえで、抗 Endomucin 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果歯髄・象牙質 ではカルセインラベリングされた新生硬組織直下に Endomucin 陽性血管を多く認めた。これより Endomucin 血管は歯髄内の硬組織新生に寄与することが示唆され た。現在この結果を踏まえて論文を執筆中であり、英論文雑誌に投稿予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三友啓介、駒田朋昭、五十嵐 章智、村松 敬
2. 発表標題 マウス歯髄・歯根膜におけるType H毛細血管の経時的変化
3. 学会等名 第155回日本歯科保存学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三友啓介、西田大輔、溝口利英、村松敬
2. 発表標題 マウス歯髄・歯根膜におけるTypeH毛細血管の局在
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------