

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17168

研究課題名（和文）抜歯窩の石灰化修復を司る新規の歯根膜幹細胞の同定

研究課題名（英文）Identification of novel periodontal ligament stem cells responsible for the calcification repair of the tooth extraction socket

研究代表者

川上 真奈（Kawakami, Mana）

東京歯科大学・歯学部・臨時教員

研究者番号：70550060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯根膜には間葉系幹細胞が存在し、骨形成細胞への分化を介して抜歯窩修復に寄与する。我々は、既知の歯根膜細胞画分であるAxin2陽性細胞への抜歯窩修復骨への寄与率が低いことを見出した。この所見を基に、抜歯窩修復に寄与する他の幹細胞画分が存在することを想定している。本研究では、新たな歯根膜幹細胞画分の同定を目的とし、以下のことを見出した。(1)抜歯窩修復に寄与する幹細胞は血流に由来しない。(2)Axin2陽性およびGli1陽性細胞は歯根膜全体に局在し、両者の数に有意差は認められない。(3)Gli1陽性歯根膜細胞は、Axin2陽性歯根膜細胞と同様に、抜歯窩修復骨への寄与率は低い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抜歯窩は時間の経過とともに硬組織で満たされ修復される。しかし、糖尿病やステロイド投与患者では、免疫力の低下および創傷治癒不全から抜歯後の骨髄炎の発症リスクが高まることより、より速やかな硬組織の形成が必要になる。本研究により、硬組織修復に寄与する歯根膜幹細胞の同定と制御機構の解明が実現すればより迅速な抜歯窩修復を実現する治療法の開発に繋がる基盤研究の創生が期待できる。また、本研究は幹細胞画分へのヘテロ不均一性を示唆するものであり、組織幹細胞分野にも有意義な情報を提供する。

研究成果の概要（英文）：It is known that the periodontal ligament stem cells contribute to regenerative bone formation in the extraction sockets. We found that the periodontal ligament-derived Axin2-positive cells contribute to extraction socket healing but their contribution was very low. Based on this finding, we expected that there are other stem cell populations that contribute to extraction socket healing. In this study, we aimed to identify a stem cell population that contributes to socket healing, and found the following findings. (1) Stem cells that contribute to extraction socket repair were not derived from the bloodstream. (2) Axin2- and Gli1-positive cells are localized throughout the periodontal ligament, and there is no significant difference in their numbers in root apex, distal root surface, and root furcation. (3) Gli1-positive periodontal ligament cells contribute to tooth extraction socket repair, but their contribution is low, similar to that of Axin2-positive cells.

研究分野：骨代謝

キーワード：歯根膜幹細胞 抜歯窩修復 細胞系譜解析 パラバイオーシス Axin2 Gli1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抜歯窩の石灰化修復には歯根膜に局在する幹細胞が寄与しており、その歯根膜幹細胞は Axin2 タンパク質が陽性であることが報告された (*J Dent Res* 97(7):803-809, 2018)。すなわち、Axin2 陽性歯根膜細胞は、抜歯に伴い、骨芽細胞に分化して修復骨を形成する。しかし我々は、Axin2 陽性歯根膜細胞由来の抜歯窩修復骨中における骨細胞の割合が極めて低いことを見出している。以上の結果は、Axin2 陽性歯根膜細胞の他に抜歯窩修復に精力的に寄与する歯根膜幹細胞が存在することを示唆する。以上の研究背景を基盤とし、抜歯窩の石灰化修復に寄与する歯根膜幹細胞を同定することを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、Cre/LoxP システムを活用した細胞系譜解析により、抜歯窩の石灰化修復に寄与する幹細胞画分を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血流由来細胞の抜歯窩修復骨への寄与の検討

全身の細胞が Tomato 蛍光標識され、成熟骨芽細胞で GFP 蛍光が発現するマウス (*Rosa26-creER; flox-stop-flox-tdTomato(floxed-Tom)*; I 型コラーゲン (*Col1(2.3 kb)-GFP*) を作成した。 *Rosa26-creER; floxed-Tom; Col1(2.3 kb)-GFP* マウスと野生型マウス (両者とも 6 週齢の雌) の血流を繋げるパラバイオーシスを行った。手術の 7 日後からはタモキシフェン含有食 (400 mg/kg/飼料) を与え、CreER の核内移行に伴う細胞の Tom 標識を誘導した。また、手術の 14 日後に、*Rosa26-creER; floxed-Tom; Col1(2.3 kb)-GFP* マウスおよび野生型マウスの上顎第一臼歯を抜歯した。抜歯 14 日後にマウスを安楽死させ、抜歯窩修復組織を回収した。4%パラホルムアルデヒド (PFA) にて、24 時間固定後、40%のモルルス液により、脱灰処理 (24 時間、4 ) を行った。組織を 10%、20%、30%のスクロース液と共に、各 2 時間以上 4 でインキュベートした。川本法により凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡による組織観察を行った。また、*Rosa26-creER; floxed-Tom; Col1(2.3 kb)-GFP* マウスと野生型マウスのパラバイオーシスによる血流の共有を確認するために、手術 14 日および 28 日後に野生型マウスから血液を回収し、フローサイトメーターを用いて、血流中の Tom 陽性細胞を解析した。

#### (2) Gli1 陽性および Axin2 陽性歯根膜細胞の局在比較解析

Gli1 陽性歯根膜細胞は、幹細胞能を有することが報告されている (*Dev Cell* 54:639-654, 2020)。そこで、歯根膜における Gli1 陽性細胞と Axin2 陽性細胞の局在を比較した。*Gli1-creER; floxed-Tom* マウスおよび *Axin2-creER; floxed-Tom* マウスを作成した。4 週齢のタイミングで、タモキシフェン (1 mg/10 g /body weight) を投与して細胞標識を行い、その 1 週間後に上顎第一臼歯を回収した。4%PFA にて、24 時間固定後、上記 (1) の手順で凍結切片を川本法を用いて作成し、共焦点レーザー顕微鏡による組織観察を行った。根分岐部、歯根側面、根尖部の歯根膜に局在する Tom 陽性細胞を数え、GraphPad Prism 8.2.0 (GraphPad Software Inc.) を用いて定量解析を行った。また、全身性に細胞標識が誘導される *Rosa26-creER; floxed-Tom* マウスも上記と同様の方法でタモキシフェン投与による細胞標識を誘導し、歯根膜における標識細胞の組織観察を行った。

#### (3) Gli1 陽性および Axin2 陽性歯根膜細胞に由来する抜歯窩修復骨中の骨細胞の解析

Gli1 陽性および Axin2 陽性歯根膜細胞に由来する抜歯窩修復骨の骨細胞を比較した。*Gli1-creER; floxed-Tom* マウスおよび *Axin2-creER; floxed-Tom* マウスを作成した。全身性に細胞が標識される *Rosa26-creER; floxed-Tom* マウスはポジティブコントロールとして使用した。各遺伝子改変マウスに 4 週齢のタイミングで、タモキシフェン (1 mg/10 g /body weight) を投与して細胞標識を誘導し、1 週間後に上顎第一臼歯の抜歯処置を施した。また、十分量のタモキシフェンを投与し、細胞標識効率を向上させる目的で、各遺伝子改変マウスに 4 週齢のタイミングでタモキシフェン含有食 (400 mg/kg/飼料) を 5 日間与えた。その後、3 日間普通食で飼育した後に上顎第一臼歯の抜歯処置を施した。タモキシフェン投与および飼料の両条件共に、抜歯の 1 週間後に上顎第一臼歯の抜歯窩修復組織を回収した。4%PFA にて、24 時間固定後、上記 (1) の手順で凍結切片を川本法を用いて作成し、共焦点レーザー顕微鏡による組織観察を行った。抜歯窩修復骨における全骨細胞中の Tom 陽性骨細胞の割合を算出し、GraphPad Prism 8.2.0 を用いて定量解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 血流由来細胞の抜歯窩修復骨への寄与の検討

パラバイオーシス後の 14 日および 28 日目の野生型マウスにおける血流中の Tom 陽性細胞を解析した。その結果、14 日後には、 $21.5 \pm 8.4\%$ 、28 日後には  $33.9 \pm 6.7\%$  の血液細胞が Tom

陽性細胞として検出された。以上より、パラバイオーシス処置により、*Rosa26-creER; floxed-Tom; Col1(2.3 kb)-GFP* マウスと野生型マウスの血流が繋がっていることが確認できた。*Rosa26-creER; floxed-Tom; Col1(2.3 kb)-GFP* マウスの抜歯窩修復骨では、殆どの骨細胞が Tom 陽性細胞として観察された。また、それらの細胞は、*Col1(2.3 kb)-GFP* が陽性であった。一方、野生型マウスの抜歯窩修復組織には、多くの Tom 陽性細胞は存在するものの、抜歯窩修復骨中の骨細胞としては認められなかった。さらに、*Col1(2.3 kb)-GFP* 陽性細胞も認められなかった。以上より、抜歯窩修復骨を形成する幹細胞は、血流中には存在しないことが示された。

## (2) *Gli1* 陽性および *Axin2* 陽性歯根膜細胞のイメージング解析

*Gli1-creER* および *Axin2-creER* で標識された Tom 陽性細胞は歯根膜全体に確認された。また、両マウス共に Tom 陽性細胞の殆どは、歯根膜線維芽細胞の形態および局在を示し、僅かな細胞が骨芽細胞および骨細胞として認められた。また、両マウスにおける根分岐部、歯根側面、根尖部の Tom 陽性細胞の数に有意差は認められなかった。一方、全身性に細胞標識が誘導される、*Rosa26-creER; floxed-Tom* マウスでは、根分岐部、歯根側面、根尖部に Tom 陽性細胞が認められ、これらの標識細胞は、歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、骨細胞、セメント芽細胞であることが示唆された。また、*Rosa26-creER; floxed-Tom* マウスでは、全ての領域(根分岐部、歯根側面、根尖部)において、*Gli1-creER; floxed-Tom* および *Axin2-creER; floxed-Tom* マウスよりも有意に多くの細胞が標識された。

## (3) *Gli1* 陽性および *Axin2* 陽性歯根膜細胞に由来する抜歯窩修復骨中の骨細胞の解析

タモキシフェン単回投与実験では、ポジティブコントロールである *Rosa26-creER; floxed-Tom* マウスにおける修復骨中の Tom 陽性の骨細胞は、全体の  $53.2 \pm 7.2\%$  であった。しかしながら、*Gli1-creER; floxed-Tom* マウスおよび *Axin2-creER; floxed-Tom* マウスにおける修復骨中の Tom 陽性骨細胞の割合は、全体の僅か 7%以下 ( $p < 0.0001$ ) であった。一方、タモキシフェン含有食 (400 mg/kg/飼料) による細胞標識では、全体の 60%以上の骨細胞が Tom 陽性細胞として *Rosa26-creER; floxed-Tom* マウスの抜歯窩修復骨中で認められた。しかし、*Gli1-creER; floxed-Tom* マウスおよび *Axin2-creER; floxed-Tom* マウスでは、10%以下 ( $p < 0.0001$ ) であった。また、抜歯窩修復骨における全体の骨細胞中の Tom 陽性細胞の数は、*Gli1-creER; floxed-Tom* マウスおよび *Axin2-creER; floxed-Tom* マウス間で有意差は認められなかった。以上より、歯根膜における *Gli1* および *Axin2* 陽性細胞は、抜歯窩修復を担う骨形成細胞に分化するものの、その寄与率は低いことが明らかになった。したがって、*Gli1* および *Axin2* 陽性細胞画分以外に、抜歯窩修復に精力的に寄与する歯根膜細胞画分の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oka Hirotsugu, Ito Shinichirou, Kawakami Mana, Sasaki Hodaka, Abe Shinichi, Matsunaga Satoru, Morita Sumiharu, Noguchi Taku, Kasahara Norio, Tokuyama Akihide, Kasahara Masataka, Katakura Akira, Yajima Yasutomo, Mizoguchi Toshihide	4. 巻 13
2. 論文標題 Subset of the periodontal ligament expressed leptin receptor contributes to part of hard tissue-forming cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-30446-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------