

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792043

研究課題名(和文) 歯髄再生過程における象牙質形成とWntシグナルの役割解明に関する研究

研究課題名(英文) Clarification of dentinogenesis and its relationship with Wnt signaling during pulpal regeneration

研究代表者

武藤 徳子 (MUTO, NORIKO)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40510433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯の再植・移植後には殆どの象牙芽細胞がアポトーシスにより死滅し、歯髄広範にわたる細胞増殖の後に歯髄幹細胞が象牙芽細胞に分化し、歯髄幹細胞が死滅すると歯髄内に骨組織が惹起されるが示唆された。また、歯の損傷後の歯髄には非歯髄固有細胞が歯髄内に侵入すること、歯髄幹細胞が存在すると思われる歯髄中央部血管周囲に古典的Wntシグナルが一過性に発現が上がることから、歯髄幹細胞ニッチの維持へのWntシグナルの関与が見られた。以上より、歯の再植・移植後の歯髄では、ダイナミックなドナー・ホスト間または歯髄・歯周組織間相互作用が起こり、歯髄構成細胞が大きく変化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study clarified that tooth replantation/transplantation induced the apoptosis of odontoblasts and the subsequent differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs) into the odontoblasts following active cell proliferation, whereas bone formation occurred if the DPSCs degenerated. Due to the migration of non-inherent pulpal cells into the pulp chamber and the transient increase of Wnt signaling in the perivascular niche of the center of pulp tissue, suggesting the involvement of Wnt signal for the maintenance of DPSCs. Thus, dynamic donor-host or pulp-periodontal tissue interactions induce the drastic changes in pulp cell populations following tooth replantation/transplantation.

研究分野：歯内療法学

キーワード：Wnt 歯髄 歯学 免疫学 シグナル伝達 発生学

## 1. 研究開始当初の背景

歯の再植・移植後の歯髄治癒過程では、歯髄内に象牙質が形成される場合に加え歯髄が骨組織に置換する場合がある。申請者は、幹細胞/前駆細胞をラベルする胎生期ラベリング法を歯の損傷後の歯髄治癒過程に応用し、歯髄固有の幹細胞(歯髄幹細胞)に加え、血行性に歯髄へ到達する骨髄由来細胞の関与の可能性を示唆しており、歯髄再生の場の環境変化と細胞集団構成の変化が歯髄治癒過程を規定していると考えられる。歯髄内には骨組織形成が惹起されると歯根吸収やアンキロシス(骨性癒着)を起こしやすいことから、将来の歯髄幹細胞を用いた歯髄再生療法を実現するのにあたり、歯髄内には象牙質形成を誘導しなければならない。従って、歯の損傷後の歯髄治癒過程における治癒パターンを規定するメカニズムや歯髄固有の幹細胞(歯髄幹細胞)と骨髄由来細胞との相互作用を明らかにすることは、臨床上極めて重要な問題である。

## 2. 研究の目的

歯の損傷後の歯髄治癒過程では、歯髄内に象牙質が形成される場合に加え歯髄が骨組織に置換する場合がある。これまで申請者は、幹細胞/前駆細胞をラベルする胎生期ラベリング法を歯の損傷後の歯髄治癒過程に応用し、歯髄固有の幹細胞(歯髄幹細胞)に加え、血行性に歯髄へ到達する骨髄由来細胞の関与の可能性を示唆している。本研究課題では、歯の損傷後の歯髄治癒過程において、象牙質形成と骨組織形成に働く環境因子を特定し、象牙質形成と骨組織形成に関わる歯髄細胞集団の違いについて解明する。さらに、歯髄治癒過程に関わる細胞集団構成を規定するホスト・ドナー相互作用と Wnt シグナルの関与を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス臼歯他家移植実験にマイクロダイセクション法とマイクロアレイを応用して、象牙質形成と骨組織形成に働く環境因子を特定する。

(2) *in situ* ハイブリダイゼーション法・免疫組織化学を用いて(1)で明らかになった環境因子を発現している細胞を明らかにする。

(3) 胎生期ラベリング法で歯髄幹細胞/前駆細胞をラベルしたマウス、非ラベルマウスを用いて、マウス臼歯の再植・他家移植後の歯髄治癒過程における BrdU ラベル細胞と歯髄内細胞増殖活性・アポトーシスとの関係を検索する。

(4) Wnt シグナルの活性化を可視化できる TOP/GAL マウスを用いて歯の再植・他家移植後の歯髄治癒過程における Wnt シグナルの関与を検索する。

## 4. 研究成果

歯の損傷後の BrdU ラベル細胞と細胞増殖活性・アポトーシスとの関連を調べるために、胎生期ラベリング法によりラベルした2週齢マウス第一臼歯を抜去後、ラベルマウス・非ラベルマウス間、GFP マウス・野生型マウス間での他家移植を行った結果、(1)歯の移植後3日で歯髄広範なアポトーシスが惹起されたが、7日後以降にアポトーシス細胞数は減少した。一方、術後7日に歯髄広範にアポトーシスが持続する標本が観察された。(2)歯の移植後5~7日で歯髄広範な細胞増殖が観察されたが、術後14日には細胞増殖が減少した。一方、術後14日に歯髄内で細胞増殖が亢進している標本が観察された。(3)歯の移植後に歯髄内にオステオポンチン陽性細胞およびペリオスチン陽性細胞が出現した。(4)GFP マウスと野生型マウス間での他家移植を行った結果、移植歯の歯髄にはホスト由来間葉細胞と血管内皮細胞の侵入が

見られた。以上より、歯の移植後にホスト・ドナー相互作用により歯髄の治癒パターンが規定されることが明らかとなった。

歯の他家移植後には歯髄腔が象牙質または骨組織で閉塞される (Histochem Cell Biol 136: 649-661, 2011) のに対し、歯の再植後には長期間歯髄腔が維持される (Cell Tissue Res 325: 219-229, 2006) ことから、他家移植と再植では、ホスト・ドナー相互作用に起因する幹細胞ニッチ維持機構が異なることが予想される。

続いて、胎生期ラベリング法で歯髄幹細胞 / 前駆細胞をラベルしたマウスと非ラベルマウスを用いて、マウス臼歯の再植・他家移植後の歯髄治癒過程における BrdU ラベル細胞と歯髄内細胞増殖活性・アポトーシスとの関係の検索と Wnt シグナルの活性化を可視化できる TOP/GAL マウスを用いて歯の再植後の歯髄治癒過程における Wnt シグナルの関与を検索した。結果をまとめると、歯の再植・移植後には殆どの象牙芽細胞がアポトーシスにより死滅し、歯髄幹細胞が象牙芽細胞に分化すると考えられた。歯の再植・移植後に歯髄幹細胞が死滅すると歯髄内に骨組織が惹起されるが示唆された。歯の再植後には歯髄広範にわたる細胞増殖の後に象牙芽細胞分化が起こることが明らかになった。

歯の移植後の歯髄には非歯髄固有細胞が歯髄内に侵入することが明らかになった。

歯の移植後の歯髄には、歯根膜マーカーであるペリオスチン陽性細胞が歯髄内に出現することが明らかになった。以上より、歯の再植・移植後の歯髄では、ダイナミックなドナー・ホスト間または歯髄・歯周組織間相互作用が起こり、歯髄構成細胞が大きく変化し、その結果、歯髄分化能にも影響を及ぼすことが示唆された。カテニンを介する古典的な Wnt シグナルの活性化を可視化できる Wnt シグナルレポーター (TOP/GAL) マウスを用いて、同様な実験を実施した結果、再植後に歯

髄幹細胞 / 前駆細胞が存在すると思われる歯髄中央部血管周囲に X-Gal 染色陽性を示し、歯髄治癒過程で一過性に発現が上がることから、歯髄幹細胞ニッチの維持への Wnt シグナルの関与が見られた。

#### 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0件)

[学会発表](計3件)

1. 武藤徳子,石井信之,大島勇人:サテライトシンポジウム 5 歯の再植・移植後の歯髄治癒過程における歯髄 - 歯周組織相互作用. 第 54 回歯科基礎医学会, 福島, 2012.9.14-16.

2. Noriko Mutoh, Nobuyuki Tani-Ishii, Hayato Ohshima: Cell dynamics in the process of pulpal healing following tooth transplantation. The 9th World Endodontic Congress. Tokyo Japan. 2013.5.25

3. Noriko Mutoh, Nobuyuki Tani-Ishii: Donor-host interaction in the process of pulpal healing following tooth transplantation. The 17th Scientific Congress Asian Pacific Endodontics Confederation & 2013 Spring Scientific Meeting (the 42nd ) of Korean Academy of Endodontics, Seoul Korea, 2013. 3. 23-24.

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤徳子 (MUTO noriko)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号 40510433

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：