

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463111

研究課題名(和文)意図的歯根切除と抗菌性薬剤が歯の再植後の歯髄・歯根膜治癒過程に及ぼす影響について

研究課題名(英文) Effects of root resection and antibacterial drugs on the pulpal and periodontal tissue healing following tooth replantation

研究代表者

大島 邦子 (NAKAKURA-OHSHIMA, KUNIKO)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80213693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスの歯の再植、GFPマウスをホストまたはドナーとする歯の他家移植を行い、歯根切除が再植歯の歯髄治癒パターンおよび移植歯のドナー・ホスト相互作用に及ぼす影響を検索した。その結果、意図的歯根切除が歯髄再生を促すこと、すなわち、歯の移植後にドナー細胞が象牙芽細胞に分化するとともに、ホスト由来細胞も移植歯の歯髄に侵入するが、歯根切除群では、血管進入およびその近傍の象牙芽細胞分化がより早期に起こる傾向が認められた。意図的歯根切除により、早期に血行が回復し、歯髄幹細胞の維持を図れば、骨組織形成や炎症性歯根吸収など異常な治癒経過に抑制的に働くことが考えられ、外傷歯の歯髄再生を促すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze the effects of the enlarged apical foramina on the pulpal healing process using a model for tooth replantation/transplantation. After the extraction of ICR or GFP mouse teeth, the tooth roots from the experimental group were shortened before replantation/transplantation, whereas in the control group the teeth were immediately replanted. The occurrence of abundant tertiary dentin formation was observed in the resected teeth, whereas, divergent healing patterns including dentin, bone, and fibrous tissues were observed in the control group. Tooth transplantation using GFP or wild-type mice demonstrated that the root resection accelerated the revascularization and donor-derived odontoblast-like cell differentiation, resulting in the rapid pulpal healing. In conclusion, the root resection accelerates the dental pulp regeneration following tooth replantation/transplantation due to the better environment for revascularization in the replants.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯髄幹細胞 再生 歯根切除 GFP 他家移植

1. 研究開始当初の背景

歯の再植や移植後に、歯髄内には象牙質に加え、骨組織が形成される場合がある。この過程において、申請者らの研究グループは破骨細胞が歯髄腔内に出現すると骨芽細胞分化が誘導される (Cell Tissue Res 325: 219-229, 2006) のに対し、歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現すると象牙芽細胞分化が誘導されることを発見し (Cell Tissue Res 302: 221-233, 2000)、歯の損傷後に歯髄内に現れる細胞の種類が、歯髄治癒パターンの決定に重要な鍵を握っていることを明らかにした。さらに、我々は歯の移植後に歯髄幹細胞/前駆細胞が歯髄腔に維持されると象牙質形成が惹起されることを明らかにしている。

一方、抗菌性薬剤である Ciprofloxacin、Metronidazole、Minocycline (または Cefaclor) の三種混合薬剤 (3Mix) は、う蝕病巣を無菌化することで再石灰化を促すことから臨床応用されているが、申請者の最近の研究でこの抗菌性薬剤が樹状細胞を活性化することを明らかにしている。さらに、歯の再植の際に抜去歯を抗菌性薬剤の溶液に浸してから抜歯窩へ戻すと歯髄再生が促進されることも見出した。しかしながら、抗菌性薬剤を歯の再植に適応すると、薬液が直接作用する歯根膜に対し、歯髄の場合は狭い根尖孔を通して薬液が浸透するため、効率的に薬液を作用させる方策が必要であることも明らかになっている。

歯の再植後に歯髄腔内に骨組織が惹起されると、歯根吸収やアンキローシスが起り易くなることから、歯の損傷後の歯髄治癒過程では歯髄内に象牙質形成を促すことが望ましい。従って、歯の損傷後の歯髄治癒過程において、意図的歯根切除により、早期の血行回復を促し、抗菌性薬剤等種々の因子が歯髄に到達しやすいような形態をつくることにより樹状細胞及び歯髄幹細胞の活性化を引き起こすことができれば、象牙芽細胞分化を促進することが可能になると推測されたため、本研究計画の立案に至った。

2. 研究の目的

近年、う蝕の減少に反して、小児の外傷は増加していることが小児歯科学会でも

問題視されている。外傷に伴う歯の不完全または完全脱臼も例外ではなく、特に幼若永久歯の完全脱臼においては再植が第一選択となる。根未完成歯の場合は、再植歯の歯髄再生が期待されるが、根完成歯では再植後に抜髄をするのが一般的である。これは、根完成歯では再植後の血行回復が期待できないことに起因している。動物を用いた移植実験においても、若い動物の根未完成歯をドナーに用いることで歯髄再生が促進されることが証明されている。従って、再植時に意図的に歯根を切除することが、血行回復を容易にし、歯髄再生に促進的に働くことが予想される。実際、ICRマウスを用いた予備実験において、通常の再植では多様な治癒パターンが起こるのに対し、意図的歯根切除を行うと歯髄再生が容易に起こることが明らかになっている。本研究は、意図的歯根切除による外傷歯歯髄の血行回復と、ドナー・ホスト相互作用を検証し、そのメカニズムを解明することを目的とする。本研究は歯髄再生を循環・幹細胞生物学的な側面から捉える独創的な試みであり、その成果は外傷歯の歯髄再生を促す新規治療法の開発に繋がることが予想される。

3. 研究の方法

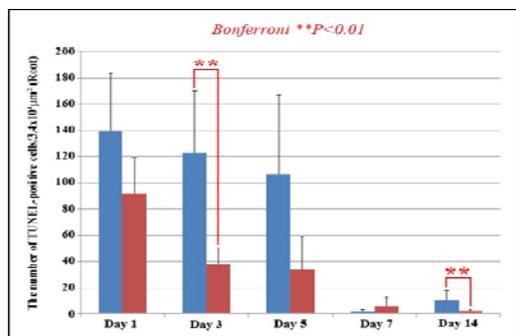
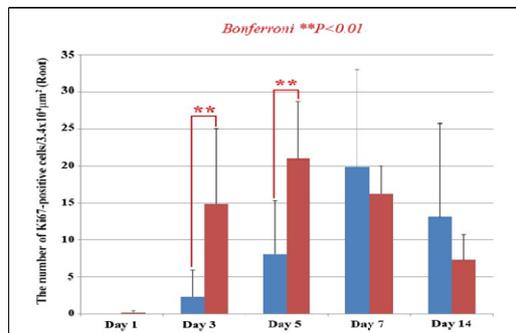
深麻酔下で3週齢のICRマウス、GFPトランスジェニックマウスまたは野生型マウス (Black6) 上顎第一臼歯を抜去後、実験群では歯の再植/移植前に歯根を1/2~1/3切除しICRマウスに再植、または野生型マウスまたはGFPマウス抜歯窩へ他家移植した。一方、対照群では抜去歯をICRマウスにそのまま再植、野生型マウスまたはGFPマウス歯槽窩にそのまま他家移植した。術後1、3、5日、1、2、4、8週後に深麻酔下にて4%パラホルムアルデヒド0.1Mリン酸バッファー溶液で灌流固定後、上顎を一塊として摘出し、12時間、同固定液にて浸漬した。試料は10%EDTA 2NA溶液を用いて4℃、2週間脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、5μm厚の矢状断切片を作製し、

HE 染色にて歯髄・歯周組織治癒過程を解析した。免疫染色については、1000 倍に希釈したウサギ抗 GFP 抗体および 500 倍に希釈したマウス抗ネスチンモノクローナル抗体（ケミコン国際、テメキュラ、カリフォルニア州、米国）を用いた EnVision 法（DAKO 日本、東京）で処理し、0.05% メチレンブルーで 対比染色を行った。再植実験では Ki-67 および TUNEL assay により細胞分裂/アポトーシス活性も併せて検索した。

4. 研究成果

意図的歯根切除を伴う歯の再植実験 (ICR マウス)

下図に示すように、意図的に歯根切除してから再植した群は歯根部歯髄内でアポトーシスを起こす細胞数が再植後急激に減少し、逆に活発な細胞分裂が早期に確認された。すなわち、歯根切除することが、血行回復を容易にし、歯髄再生に促進的に働いたと考えられた。その結果、通常の再植では多様な治癒パターンが起こるのに対し、意図的歯根切除群では歯髄再生が容易に起こることが明らかになった。



■ Immediate replantation ■ Root resection

治癒パターン	象牙質形成	象牙質+骨組織の混合	硬組織形成+炎症反応の遅延
再植	3例	1例	2例
意図的歯根切除	6例	0例	0例

他家移植歯の歯髄におけるネスチン免疫反応 (象牙芽細胞分化) とドナー宿主相互作用 (GFP マウス-野生型マウス)

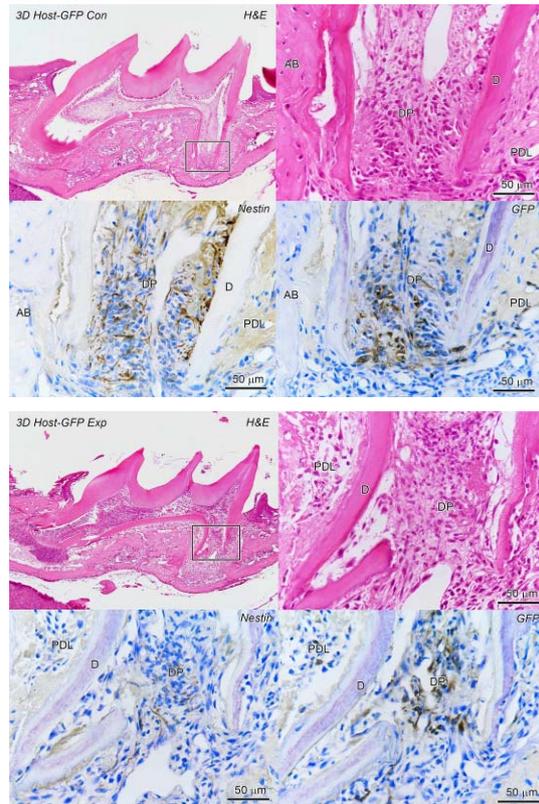


図1 移植3日後の H&E およびネスチン、GFP 陽性反応(上:対照群、下:根切群)

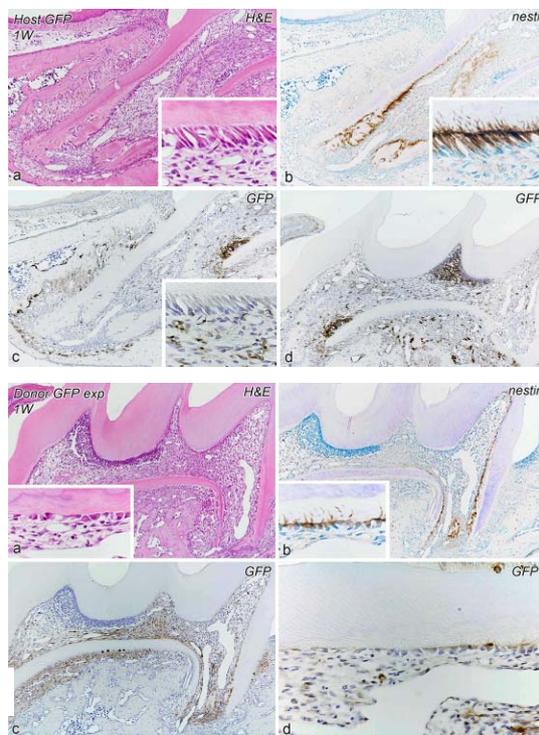


図2 移植1週後の H&E およびネスチン、GFP 陽性反応(上:対照群、下:根切群)

他家移植直後の3日では、すでにドナー細胞が象牙芽細胞に分化するとともに、ホスト由来細胞が根尖または根切部から移植歯歯髄へ多数進入していることが確認された(図1)。しかし、ICRマウスの再植実験に比し、GFPトランスジェニックマウスを用いた他家移植実験は、炎症反応が強く、歯髄治癒が著しく悪かった。そのため、初期治癒過程におけるドナー細胞の動態をモニターすることが難しく、歯冠部細胞の生存パターンを検索することは困難であった。これは、マウスのバックグラウンドがBlack6とICRで異なること、また、再植と他家移植の違いが影響していることが考えられた。

術後1週では、髄角部にはホスト由来の炎症性細胞浸潤を認めるものの、歯根部ではドナー由来の細胞がネスチン陽性を示し、象牙芽細胞様細胞に分化したと考えられた。また、根切群では、炎症性細胞の残存は認めるものの、血管の進入とその近傍の象牙芽細胞様細胞の分化がより早期に起こる傾向が認められた。(図2)

術後2週になると、炎症が残存しているものも認められたが、歯冠部および歯根部に不

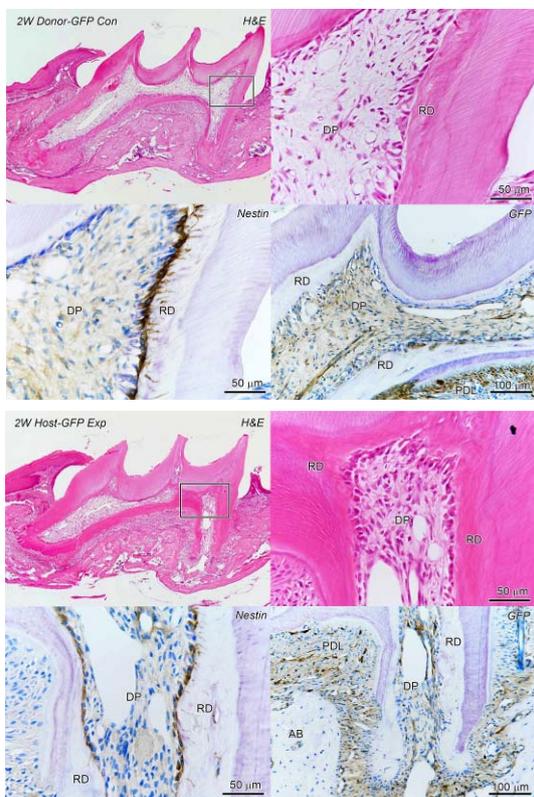


図3 移植2週後のH&Eおよびネスチン、GFP陽性反応(上:対照群、下:根切群)

規則な第三象牙質を形成するもの(図3)、象牙質・骨混在型、骨形成および歯根吸収など多様な治癒パターンを示した。特に根切群では第三象牙質が形成される割合が高かった。

術後4週では象牙質形成が進行し(図4)、術後8週になると、対照群・根切群ともに歯髄腔の狭窄が起こったが、象牙芽細胞を含む歯髄組織は保持されており、ICRマウス他家移植で観察される歯冠歯髄の完全閉塞は認められなかった(図5)。

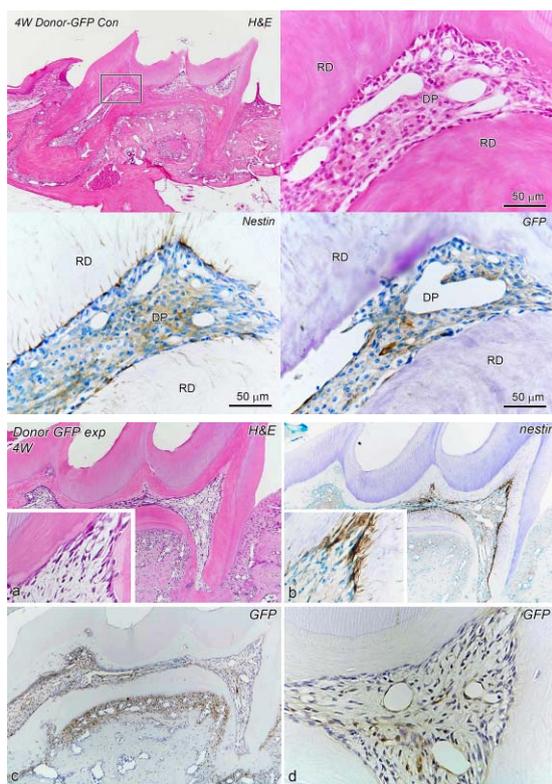


図4 移植4週後のH&Eおよびネスチン、GFP陽性反応(上:対照群、下:根切群)

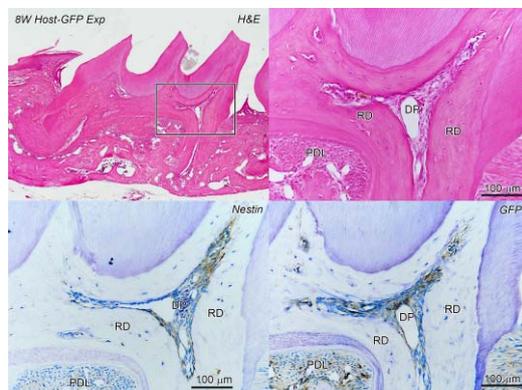


図5 移植8週後のH&Eおよびネスチン、GFP陽性反応(根切群)

まとめ

歯の再植・移植後には歯冠部幹細胞が消失し、髄床底部および歯根部幹細胞の増殖と遊走がおこり、歯髄が治癒すると考えられている。また、歯髄幹細胞が消失すると骨様組織が形成されるが、早期の血行回復は歯髄治癒を促進し、歯髄内に象牙質形成を誘導する確率が上昇する。意図的歯根切除により、早期に血行が回復し、歯髄幹細胞の維持を図れば、骨組織形成や炎症性歯根吸収など異常な治癒経過に抑制的に働くことが考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① 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. *J Oral Biosci* 査読有 60: 21-30, 2018.
- ② Saito K, Ohshima H: Differentiation capacity and maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in the process of pulpal healing following tooth injuries. *J Oral Biosci* 査読有 59:63-70, 2017.
- ③ Murakami T, Saitoh I, Sato M, Inada E, Soda M, Oda M, Domon H, Iwase Y, Sawami T, Matsueda K, Terao Y, Ohshima H, Noguchi H, Hayasaki H: Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1 promoter-driven selection markers. *Arch Oral Biol* 査読有 81: 110-120, 2017.
- ④ Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Osteopontin is essential for type I collagen secretion in reparative dentin. *J Dent Res* 査読有 95: 1034-1041, 2016.
- ⑤ Ida-Yonemochi H, Otsu K, Ohshima H, Harada H: The glycogen metabolism via Akt signalling is an important for the secretion of enamel matrix in amelogenesis. *Mech Dev* 査読有 139: 18-30, 2016.
- ⑥ Shigetani Y, Ohshima H, Okiji T (他 4 名, 4 番目): GaAlAs laser-induced pulp mineralization involves DMP1 and osteopontin expression. *Oral Dis* 査読有 22(5): 399-405, 2016.
- ⑦ Goto N, Ohshima H, (他 8 名, 5 番目): Role of MSX1 in osteogenic differentiation of human dental pulp cells. *Stem Cells Int* 査読有 2016: 8035759.
- ⑧ Saitoh I, Ohshima H, Hayasaki H (他 6 名, 7・8 番目): Tissue-specific stem cells obtained by reprogramming of non-obese diabetic (NOD) mouse-derived pancreatic cells confer insulin production in response to glucose. *PLoS One*. 査読有 11(9): e0163580, 2016.
- ⑨ Nakaki T, Ohshima H (他 5 名, 6 番目): Contribution of Donor and Host Mesenchyme to the Transplanted Tooth Germs. *J Dent Res* 査読有 94: 112-120, 2015.
- ⑩ Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: The effects of enzymatically synthesized glycogen on the pulpal healing process of teeth with intentionally delayed replantation in mice. *J Oral Biosci* 査読有 57:124-130, 2015.
- ⑪ Saito K, Ida-Yonemochi H, Ushiki T, Ohshima H: Responses of pulp vasculature to cavity preparation in rat molars. *J Oral Biosci* 査読有 57: 157-164, 2015.
- ⑫ Shigetani Y, Ohshima H, (他 5 名, 6 番目): Temporospatial localisation of dentine matrix protein 1 following direct pulp capping with calcium hydroxide in rat molars. *Int Endod J* 査読有 48: 573-581, 2015.
- ⑬ Saitoh I, Hayasaki H, Sato M (他 11 名, 13 番目): Choice of feeders is important for the preparation of iPSC cells from primarily cultured human deciduous tooth dental pulp cells. *Cell Med* 査読有 8: 9-23, 2015.
- ⑭ Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Ohshima H, Terao Y, Okiji T: Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. *PLoS One* 査読有 10:e0116647, 2015.
- ⑮ Saito K, Kenmotsu S, Nakatomi M, Ohshima H: Allogenic tooth transplantation inhibits the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in mice. *Cell Tissue Res* 査読有 356: 357-367, 2014.
- ⑯ Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Effects of a triple antibiotic solution on pulpal dynamics following intentionally delayed tooth replantation in mice. *J. Endod* 査読有 40: 1566-1572, 2014.
- ⑰ Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Ohshima

H: Establishment of in vitro culture system for evaluating dentin-pulp complex regeneration with special reference to the differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells. *Histochem Cell Biol* 査読有 142: 323-333, 2014.

- ⑱ Tosaka Y, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H (他6名, 2, 9番目): Analysis of tooth brushing cycles. *Clin Oral Investig* 査読有 18:2045-53, 2014. doi:10.1007/s00784-013-1172-3.
- ⑲ Hayasaki H, Nakakura-Ohshima K (他16名, 1, 3番目): Tooth brushing for oral prophylaxis, *Japanese Dental Science Review*, 査読有 50: 69-77, 2014.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 大島 勇人: 外的侵襲後の歯髄修復メカニズムと再生医学への展開. 第17回日本外傷歯学会総会・学術大会, 2017.
- ② 大島 勇人: 歯の外的侵襲後の歯髄修復機構と歯髄幹細胞の特性. 第59回歯科基礎医学会学術大会日韓シンポジウム, 2017.
- ③ 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, 2017.
- ④ 中木哲朗, 大島 邦子, 石川裕子, 齋藤浩太郎, 依田浩子, 大島 勇人: 他家歯胚移植におけるドナー・ホスト相互作用: 歯周組織に着目して. 平成29年度新潟歯学会第2回例会, 2017.
- ⑤ Ishikawa Y, Nakatomi M, Ohshima H: Mechanisms maintaining quiescent stem cells in the apical bud of incisors and the dental pulp of growing incisors and developing molars of mice. *Japan and Korea Knowledge Exchange Sessions*, 2016.
- ⑥ Ida-Yonemochi H, Harada H, Ohshima H: Functional significance of sodium-dependent glucose transporters during murine ameloblast differentiation. *12th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD)*, 2016.
- ⑦ Ishikawa Y, Nakatomi M, Ohshima H: Quiescent adult stem cells in murine teeth are regulated by Shh signaling. *12th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD)*, 2016.
- ⑧ Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Interplay of osteopontin and dentin matrix protein 1 in reparative dentinogenesis. *12th*

International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD), 2016.

- ⑨ 齋藤浩太郎, 大島 勇人: マウス臼歯舌下移植後の歯髄治癒過程における IGF binding protein 5 の役割について. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016.
- ⑩ 中富満城, Quispe-Salcedo Angela, 依田浩子, 大島 勇人: 象牙芽細胞における Nestin 遺伝子の発現制御機構. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016.
- ⑪ Saito K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Osteopontin is essential for reparative dentinogenesis. *The 93rd General Session & Exhibition of the IADR*, 2015.
- ⑫ Saito K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Osteopontin promotes type I collagen synthesis in reparative dentinogenesis. *2015 4th Tripartite Conference on Tooth and Bone Development & Regeneration*, 2015.
- ⑬ Quispe-Salcedo A, 大島 勇人, 武藤徳子, 石井信之: 三種混合抗菌性薬剤と水酸化カルシウムセメント覆髄に対する感染歯髄の反応. *神奈川歯科大学学会第146回例会*, 2015.
- ⑭ 齋藤浩太郎, 大島 勇人: マウス臼歯歯胚移植後の歯髄発生過程におけるホスト・ドナー相互作用について. 第56回歯科基礎医学会学術大会, 2014.
- ⑮ Quispe-Salcedo A, Ohshima H: Root resection accelerates the dental pulp regeneration following tooth replantation. *第119回日本解剖学会総会・全国学術集会*, 2014.
- ⑯ Quispe-Salcedo A, 佐藤拓一, 松山順子, 大島 勇人: マウス臼歯における三種混合抗菌性薬剤と水酸化カルシウムセメント覆髄に対する感染歯髄の反応. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 邦子 (NAKAKURA-OHSHIMA, Kuniko)
新潟大学・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・歯学系・教授
研究者番号: 70251824

早崎 治明 (HAYASAKI, Haruaki)
新潟大学・歯学系・教授
研究者番号: 60238095