

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23593026

研究課題名(和文) 歯胚移植術を用いた歯髄形成過程における歯髄幹細胞とWntシグナルの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of dental pulp stem cells and Wnt signaling during pulpal formation demonstrated by tooth germ transplantation

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、GFPラベルマウスのドナーまたは宿主生後マウスを用いて他家歯牙移植の治癒を明らかにすることである。間欠投与追跡パラダイムにより移植前にラベルされたドナー細胞(ラベル保持細胞LRCs)は、歯髄中央部血管周囲に維持されており、一部のLRCsは象牙芽細胞に取り込まれていた。樹状細胞様細胞と内皮細胞を含む宿主細胞も歯髄組織内に移住したが象牙芽細胞層には寄与しなかった。それゆえに、LRCsすなわち間葉系幹細胞と思われる細胞は移植歯髄内に維持されていた。従って、ダイナミックなドナー・宿主相互作用が発生中の移植歯で起こっており、これらの変化が歯髄の特性に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to characterize the healing of allogenic tooth grafts in an animal model using GFP-labeled donor or host postnatal mice. In addition, the putative stem cells were labeled before transplantation with a pulse-chase paradigm. Transplanted molars formed cusps and roots and erupted into occlusion by 2 wk postoperatively. Donor label-retaining cells (LRCs) were maintained in the center of pulp tissue associating with blood vessels. Dual labeling showed that a proportion of LRCs were incorporated into the odontoblast layer. Host cells, including putative dendritic cells and the endothelium, also immigrated into the pulp tissue but did not contribute to the odontoblast layer. Therefore, LRCs or putative mesenchymal stem cells are retained in the transplanted pulps. Thus, the dynamic donor-host interaction occurred in the developing transplant, suggesting that these changes affect the characteristics of the dental pulp.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯髄幹細胞 BrdU 歯胚移植 象牙質形成 アポトーシス GFPマウス 象牙芽細胞 細胞増殖

## 1. 研究開始当初の背景

日本小児歯科学会学術委員会が行った全国調査では、本邦での永久歯先天欠如者の頻度は10%に及ぶことが報告されており、永久歯の先天欠如は一部の症候群患者にとどまらない問題であることが確認された。欠損補綴として、インプラントは、歯根膜が存在せず、矯正移動ができないこと、十分な骨量が必要なこと、骨切削により神経血管の損傷の危険性があることに加え、成長途上の小児には適応できないことも大きな問題である。

申請者らの研究グループは、これまで、動物を用いた歯の移植・再植実験を行い、その修復過程を詳細に検討してきた。その中で、歯髄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ことを突き止めた。これは、歯髄の由来として神経堤由来細胞に加え他の細胞群の存在が考えられ、歯の発生過程で他の細胞群が歯髄内に侵入して骨形成細胞の供給源になっている可能性が考えられる。また、申請者は、幹細胞の特徴である非対称分裂(細胞分裂後に幹細胞と一時的増幅細胞に分かれる特性)を利用して幹細胞をラベルする胎生期ラベリング法を確立することに成功した。さらに、多分化能を持つ細胞を検索する過程で、ネズミ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、歯の他家移植後に歯髄幹細胞が維持されると象牙質形成が、同細胞が枯渇すると骨組織形成が惹起されることを明らかにした。一方、神経堤由来細胞の生存と分化にはウイント(Wnt)シグナルが重要な役割を担っているが、歯髄形成過程における役割は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

歯の間葉は神経堤(NC)由来細胞または中胚葉由来細胞からなる。マウス胎仔の頭蓋顔面領域では、周皮細胞と血管平滑筋はNC由来であるが、血管の内皮細胞は中胚葉由来である。従って、NC由来と中胚葉由来の血管要素は歯胚の鐘状期にNC由来の歯乳頭内への遊走を開始する。歯髄では、周皮細胞と同じ解剖学的場所に

間葉系幹細胞すなわち歯髄幹細胞(DPSCs)が存在する。一方、治癒過程において、在住DPSCsに対する周囲のホストの歯槽窩からの細胞の寄与については明らかにされていない。

マウスおよびラット臼歯を用いた歯の再植または移植においては、再植または移植歯に少なくとも2種類の治癒パターンを誘導する。象牙質形成または骨形成である。歯冠の舌下部への移植においても、象牙芽細胞と骨芽細胞の分化を誘導する。*LacZ*遺伝子組換えROSA26マウスを用いた他家歯冠移植は、ドナーと宿主双方の間葉細胞が骨芽細胞様細胞に分化することを示している。一方、新しく分化した象牙芽細胞様細胞はもっぱらドナー歯髄細胞に由来する。したがって、萌出歯の歯髄は、象牙芽系細胞および骨芽細胞系細胞の両方を含んでいることが示唆されている。最近我々は、胎生動物にBrdUを間欠投与することで、ゆっくりとした細胞分裂周期の長期ラベル保持細胞(LRCs)の存在を明らかにした。濃くラベルされる細胞は組織幹細胞または前駆細胞であると推測され、一方濃く染まらない顆粒状の核はより早く分裂している一時的増幅細胞であると推測された。BrdUでラベルされた移植歯では、濃く染まるLRCsは、LRCsを含む象牙芽細胞様細胞の下層の歯髄中央部に維持されているのに対し、骨様組織周囲ではLRCsは消失した。これらの所見は、濃く染まるLRCsがNC由来の在住歯乳頭/歯髄細胞である可能性が高く、非ラベル細胞が骨芽細胞様細胞に分化できる他の細胞集団であることを示唆している。従って、本研究はマウスを用いた他家歯胚移植動物モデルを確立し、胎生期BrdUラベリング法とGFPマウスを組み合わせさせてドナー・宿主間相互作用を検索し、歯の発生において歯髄細胞集団(在住歯乳頭・歯髄細胞vs移植細胞)が生後に変化するという仮説を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス胎生期 BrdU ラベリング法に従い BrdU (150 mg/kg) 腹腔内注射を妊娠 C57BL/6J マウスに3回 (胎生 15~17 日齢に1日1回) 与え、生まれた動物の成熟組織におけるゆっくりとした細胞分裂周期の長期ラベル保持細胞 (LRCs) をマッピングした。ラベルされた生後 1~2 日齢のマウスから下顎第一臼歯歯胚を摘出した。一方、2 週齢の非ラベルマウスに対し、抱水クロラル腹腔内注射による深麻酔下で、粘膜フラップを形成し、未萌出の上顎右側第 1 臼歯 (M1) を抜去後、抜歯窩に上記のラベル歯胚を他家移植した。

さらに、GFP トランスジェニックマウスまたは野生型マウスの下顎歯胚 (1~2 日齢) を同様に摘出し、それぞれ野生型または GFP トランスジェニックマウスの上顎 M1 (2 週齢) の歯槽窩に移植した。同じ動物の未処置の上顎左側の M1 をコントロールとして用いた。

試料は、歯胚移植後 3、5、7、14 日の間隔で 3~7 対のラベル群と非ラベル群の動物、および術後 5、7、12、14、18、21 日の間隔で 1~6 対の GFP および野生型動物から採取した。

各ステージにおいて、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。標本の脱灰前に、移植後 14 日の移植歯と対照歯間の形態の違いを検索するため  $\mu$ CT 解析を行った。 $\mu$ CT の設定は、ピクセル・マトリックス 256 x 256 x 256 ; スライス幅、14  $\mu$ m ; 投影数、900 x 32 ; 倍率、6.51 倍 ; 電圧、68 kV ; 電流、100  $\mu$ A とした。ソフトウェアプログラム (NDTView、ソニー株式会社、東京 ; TRI/3D-BON、ラトックシステム工学、東京、日本) を用い、三次元再構成および矢状断の評価をおこなった。

組織学的観察には、10%EDTA 2NA 溶液を用いて 4、2 週間脱灰後、パラフィン包埋し、5  $\mu$ m 厚の矢状断切片に H & E 染色を行った。

免疫染色については、Calbiochen BrdU 免疫組織化学システム (EMD バイオサイエンス、ダルムシュタット、ドイツ) 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、ヘマトキシリンまたは 0.05% メチレン ブルーで 対比染色を行った。BrdU ラベル細胞の色は画像ソフトウェア (Adobe Photoshop CS4 Windows ; アドビ システム株式会社、サンノゼ、カリフォルニア州、米国) により、赤色に変換した。

細胞増殖は 100 倍に希釈したラット抗 Ki-67 モノクローナル抗体 (Dako) を用い、アポトーシスは、ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore、マサチューセッツ、マサチューセッツ州) を用いた TUNEL 染色により定量化した。

各陽性細胞の数は、グリッド [16.5 x 10<sup>3</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>] でカウントし、平均値と標準偏差 (SD) を評価した。経時的変化の統計的有意差は、SPSS (16.0J Windows ; SPSS、東京、日本) を用いてボンフェローニテスト (一方向分散分析 ; ANOVA) で比較検討した。

#### 4 . 研究成果

##### 移植歯の歯髄におけるネスチン免疫反応と歯胚移植に対する LRCs の反応

ネスチン陽性象牙芽細胞様細胞は術後 3 日で歯冠部象牙質下の歯髄・象牙質界面に沿って配列した。咬頭領域では、基質内の細胞残渣を含む病的な象牙質と、エナメル芽細胞分化の乱れを含む異常なエナメル器を呈したが、対照的に歯頸部では、エナメル質形成と象牙質形成が正常に進行した (図 1)。術後 5~7 日では、歯冠象牙質は厚径を増し、基質内に細胞封入のない歯根象牙質形成を開始していた。歯冠および歯根象牙質下の歯髄・象牙質界面に沿ってネスチン陽性象牙芽細胞様細胞が認められた (図 2)。術後 14 日では、 $\mu$ CT による三次元解析により、6 咬頭と 2 根からなる正常の形態と歯の萌出と咬合完了を確認できた。矢状断像では、上顎第二臼歯 (M2) と第三臼歯 (M3) と比較してエナメル質形成不全を呈しており、コントロール (M1) と比較して近遠心径が小さいことが確認された。しかし、矢状断切片からは、歯根形成が正常に進行し、ネスチン陽性象牙芽細胞様細胞が歯髄組織周囲中に配列したことが確認された (図 3)。濃染および顆粒状の LRCs は歯髄に維持されており、歯冠および歯根歯髄において、それらはいくつかの (すべ

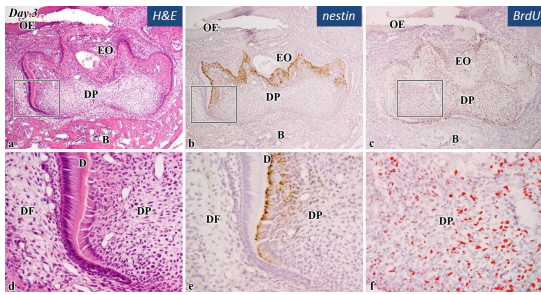


図1 歯胚移植3日後のネスチン免疫組織化学とLRCsの局在

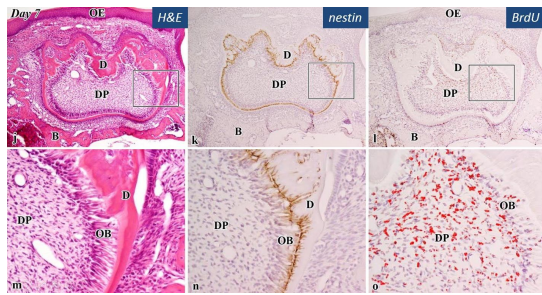


図2 歯胚移植7日後のネスチン免疫組織化学とLRCsの局在

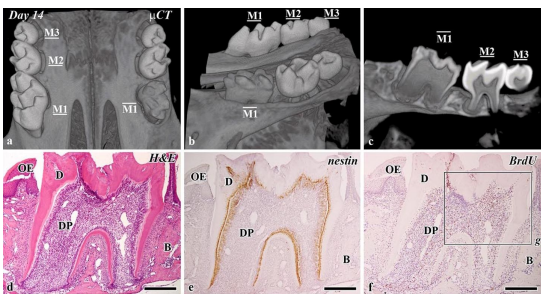


図3 歯胚移植14日後のネスチン免疫組織化学とLRCsの局在とμCT像

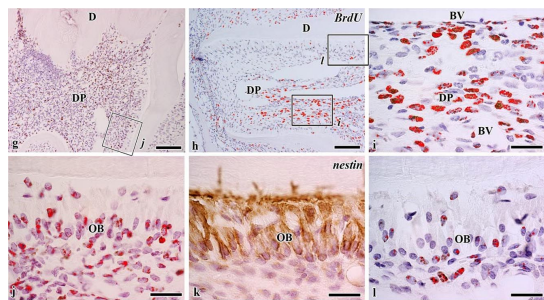


図4 歯胚移植14日後のネスチン免疫組織化学とLRCsの局在

てではないが)新しく分化した象牙芽細胞様細胞にコミットされた。

濃く染まる LRCs の数はほとんど一定であったのに対し、顆粒状の LRCs はやや減少するものの、14日まで比較的高いレベルのままであった(図1-4)。

#### Ki 67 免疫活性による細胞増殖評価と TUNEL 法によるアポトーシス評価

術後3日に比べ、7日と14日では統計学的に有意に低下したものの、術後3~14日の間に多数のKi 67陽性細胞が歯髓腔およびヘルトビッチの上皮鞘と周囲の間葉で観察された。また、プログラムされた細胞死の程度を調べるため TUNEL 評価を行った。各日齢間で統計学的に有意な違いはなかったが、術後3~14日間に多数のアポトーシス細胞が歯髓腔内に現れた。

#### GFP 遺伝子導入および野生型マウス間の歯胚移植

GFP トランスジェニックマウスをドナー、野生型を宿主として用いた歯胚移植において、GFP 陽性細胞は、実験期間中、内皮細胞および遊走した細胞を除いて移植歯の歯髓を構成していた。GFP トランスジェニックマウスを宿主、野生型をドナーとして使用した歯胚移植においては、実験期間を通して歯髓の中に GFP 陽性の内皮細胞および遊走した細胞が見られた。

当初の研究目的である Wnt シグナルについては、TOP-GAL マウスを用いた再植実験を行い、歯髓幹細胞/前駆細胞が存在すると思われる歯髓中央部血管周囲に gal の発現を確認した。特に歯髓再生過程で一過性にその発現が上がることから、歯髓幹細胞ニッチの維持に対する Wnt シグナルの関与も伺われたが、今後さらに検討する必要がある。

#### まとめ

本研究は、初めてマウスを用いた上顎への歯胚移植動物モデルの確立に成功し、細胞レベルでの移植歯胚の経時的变化を明らかにした。移植臼歯は、術後2週までに歯冠および歯根を形成、萌出し咬合をした。ドナーのラベル保持細胞(LRCs)は歯髓中央部血管周囲に維持されていた。二重染色により、一部のLRCsは象牙芽細胞に取り込まれていることが確認された。樹状細胞様細胞と内皮細胞を含む宿主細胞も歯髓組織内に移住したが象牙芽細胞層には寄与しなかった。それゆえ、LRCsすなわち間葉系幹細胞と思われる細胞は移植歯髓内に維持されていた。ヘルトビッチの上皮鞘はバイタルで、上皮LRCsはドナーのサービカルループに存在していた。これら発生中の移植歯で起こっているダイナ

ミックなドナー・ホスト相互作用が歯髄の特性に影響することが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Nakaki T, Ohshima H, et al(6人中6番目): Contribution of Donor and Host Mesenchyme to the Transplanted Tooth Germs. J Dent Res 査読有 94: 112-120, 2015.

Sato T, Kenmotsu S, Nakakura-Ohshima K, Takahashi N, Ohshima H: Pulpal responses to antimicrobials in the infected dental pulp of rat molars. Arch Histol Cytol 査読有 2015 in press.

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.

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.

Tosaka Y, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H et al(9人中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.

Hayasaki H, Nakakura-Ohshima K, et al(18人中1,3番目): Tooth brushing for oral prophylaxis, Japanese Dental Science Review, 査読有 50: 69-77, 2014.

Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Use of a triple antibiotic solution affects the healing process of intentionally delayed replanted teeth in mice. J Oral Biosci 査読有 55: 91-100, 2013.

Saito K, Nakatomi M, Ohshima H: Dynamics of BrdU label-retaining dental pulp cells during pulpal healing following cavity preparation in mice. J Endod 査読有 39: 1250-1255, 2013.

Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H: The relationship between cell proliferation and differentiation and mapping of putative dental pulp stem cells during mouse molar development by chasing BrdU-labeling. Cell Tissue Res 査読有 348: 95-107, 2012.

Inada E, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H, et al(9人中3,8番目): Association

between mouth opening and upper body movement with intake of different-size food pieces during eating. Arch Oral Biol 査読有 57:307-13, 2012.

Saito K, Ohshima H, et al(5人中5番目): The expression of GM-CSF and osteopontin in immunocompetent cells precedes the odontoblast differentiation following allogenic tooth transplantation in mice. J Histochem Cytochem 査読有 59: 518-529, 2011.

Saito K, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H, et al(7人中3.7番目):

Differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells during pulpal healing following allogenic transplantation in mice. Biomed Res. 査読有 32: 247-257, 2011.

Mutoh N, Ohshima H, et al(6人中6番目): Responses of BrdU label-retaining dental pulp cells to allogenic tooth transplantation into mouse maxilla. Histochem Cell Biol 査読有 136: 649-661, 2011.

Iwase Y, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H, et al(9人中4,9番目): Do occlusal contact areas of maximum closing position during gum chewing and intercuspal position coincide? Arch Oral Biol, 査読有 56: 1616-23, 2011.

Hasegawa H, Nakakura-Ohshima K, et al(9人中3番目): Condylar Shape in Relation to Anterior Disk Displacement in young adolescence. Cranio. 査読有 29:100-10, 2011.

〔学会発表〕(計 18 件)

齋藤浩太郎, 大島勇人他: 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, 福岡国際会議場(福岡・博多市), 2014.9.25-27.

Nakajima T, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H et al: 3-D Motion Analysis of Toothbrushing on Molars. The 3rd International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative, Krabi (Thailand), 2013.12.22.

Hanasaki M, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H et al: Comparison of Interproximal Accessibility of Different Toothbrushes Used on Primary Dentition. The 3rd International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative, Krabi (Thailand), 2013.12.22.

Murakami N, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H et al: Observation of Chewing and Food Intake over the Course of a Meal. The 3rd International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative, Krabi (Thailand), 2013.12.22.

Ohshima H: Cell dynamics and stem cell niches in the dental pulp in the regenerative process of dentin-pulp complex. 12th annual meeting of the Korean Basic Dental Science Societies Association, Seoul (Korea), 2013, 11. 28-29.

武藤徳子, 大島勇人他: 歯の再植・他家移植後の歯髄におけるアポトーシスと細胞増殖: BrdU label-retaining cells との関連. 日本歯科保存学会 2013 年度秋季大会, 秋田県総合生活文化会館 (秋田・秋田市), 2013.10.17-18.

Nakakura-Ohshima K, et al: The question of how autistic persons with mental retardation can gain the ability to brush their own teeth. 4-2Academic Conference of Taiwan Association for Disability and Oral Health, Kaohsiung City (Taiwan), 2013.9.14

Ohshima H: Responses of dental pulp stem/progenitor cells to tooth replantation/transplantation and the effect of a triple antibiotic solution on traumatized teeth. The 24th IAPD 2013 Seoul, Seoul (Korea), 2013. 6. 12-15.

Ohshima H: Recipient-donor interaction affects dental pulp regeneration after exogenous stimuli. The 9th World Endodontic Congress IFEA, 東京国際フォーラム(東京都), 2013. 5. 23-26.

Mutoh N, Tani-Ishii N, Ohshima H: Cell dynamics in the process of pulpal healing following tooth transplantation. The 9th World Endodontic Congress IFEA, 東京国際フォーラム (東京都), 2013. 5. 23-26.

Saito K, Ohshima H: Allogenic tooth transplantation inhibits the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in mice. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, La Londe les Maures (France), 2013. 5. 26-31.

Nakaki T, Ohshima H et al: Postnatal changes of pulp cell population demonstrated by allogenic tooth germ transplantation in mice. 11th

International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, La Londe les Maures (France), 2013. 5. 26-31.

Mutoh N, Tani-Ishii N, Ohshima H: Donor-host interaction in the process of pulpal healing following tooth transplantation. 17th Scientific Congress of APEC, Seoul (Korea), 2013. 3. 23-24.

Ohshima H: Postnatal changes of pulp cell population in transplanted tooth germs. International Symposium Frontier Meeting, Seoul/Jeonju 2013 Development, Evolution, Taxonomy, and Genetics of Tooth Structure "Tooth Voyage, Up To Date", Jeonju (Korea), 2013. 2.12-15.

齋藤浩太郎, 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄治癒過程における BrdU ラベル細胞の維持機構について. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 奥羽大学 (福島・郡山市), 2012. 9.14-16.

Quispe-Salcedo A, 大島勇人他: Effectiveness of antimicrobials in the pulpal healing process following intentionally delayed tooth replantation. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 奥羽大学 (福島・郡山市), 2012.9.14-16.

武藤徳子, 大島勇人他: 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. サテライトシンポジウム 5 「歯根・歯周組織 - ユニットのセレンディピティ」. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 奥羽大学 (福島・郡山市), 2012.9.14-16.

齋藤浩太郎, 大島勇人他: マウス他家移植後の歯髄治癒過程における歯髄組織幹細胞の分化能および細胞増殖とアポトーシスとの関連. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 長良川国際会議場 (岐阜・岐阜市), 2011.9.30-10. 2.

## 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

佐野 富子 (SANO, Tomiko)  
新潟大学・歯学総合病院・助教  
研究者番号: 40323977