

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20359

研究課題名(和文)修復象牙質形成過程におけるオステオポンチンの役割の解明

研究課題名(英文)The role of osteopontin in reparative dentinogenesis

研究代表者

斎藤 浩太郎(SAITO, Kotaro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10733719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：修復象牙質形成過程におけるオステオポンチン(OPN)の役割について、in vivo窩洞形成実験モデルと象牙質・歯髄複合体のin vitro器官培養実験モデルを用いて解析を行った。野生型マウスでは、窩洞形成後14日で修復象牙質が形成されたのに対し、Opn遺伝子欠損マウスでは修復象牙質形成が阻害されており、I型コラーゲン形成が認められなかった。また、器官培養系にて、OPNはI型コラーゲンの形成に關与することが示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the role of OPN during reparative dentinogenesis. In WT mice, reparative dentin formation continued next to the preexisting dentin at the mesial coronal pulp. In contrast, there was no reparative dentin in the Opn KO mice where newly differentiated odontoblast-like cells lacked immunoreaction for type I collagen. The in vitro organ culture demonstrated that the administration of recombinant OPN rescued the type I collagen secretion by odontoblast-like cells in the Opn KO mice. The results suggested that the deposition of OPN at the calcification front is essential for the type I collagen secretion by newly differentiated odontoblast-like cells to form reparative dentin during pulpal healing following cavity preparation.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：象牙芽細胞 オステオポンチン 窩洞形成 修復象牙質 マウス

1. 研究開始当初の背景

歯が外傷によって脱落した場合の再植、あるいは歯周病やう蝕によって欠損した歯のかわりに他の部位の歯を移植する方法は、歯の保存治療の1つとして臨床上重要な位置を占める。しかし、術後の予見性は低く、場合によっては抜歯の適応となったり、歯髄の除去を必要とする。それは歯が顎骨に生着しなかったり骨性癒着(アンキロシス)したりする原因、歯髄内が壊死に陥る原因が明確でなく、それを防御する治療法も確立されていないためである。歯の損傷後、歯髄内に骨組織形成が惹起されると歯根吸収やアンキロシスを起こしやすいことから、将来の歯髄再生療法を実現するのにあたり、歯髄内には修復象牙質形成を誘導することが望ましい。従って、歯の損傷後の治癒パターンを規定するメカニズムや修復象牙質の形成機構を明らかにすることは、臨床上極めて重要である。我々は、歯の再植/移植術の予後の不確定な要素は術後の歯髄治癒機構が解明されていない点に集約されると考えて研究を行ってきた。

歯の再植/移植後の歯髄の治癒パターンには、少なくとも骨形成と修復象牙質形成の2通りが存在する。術後に既存の象牙芽細胞が死滅した後、歯髄・象牙質界面に一過性に樹状細胞が出現し、オステオポンチン(OPN)を分泌すると象牙芽細胞様細胞の分化が誘導され修復象牙質形成が起こることが明らかになっている(J Electron Microsc 52: 581-591, 2003; J Histochem Cytochem, 59 (5), 518-529, 2011)。樹状細胞によるOPNの分泌が歯髄治癒パターンを規定する重要な鍵を握ることが示唆されているが、OPNの機能的意義については明らかにされていない。OPNは接着性骨基質タンパク質として知られているが、近年、インテグリン受容体との結合を介した細胞内シグナル伝達の活性化作用を有することが報告されている(Cytokine & Growth Factor Reviews 19: 333-345, 2008)。

我々の研究室では近年、修復象牙質形成の機序を解析するのに有用な、マウスを用いた臼歯窩洞形成実験モデルを確立した(J Endod.39:1250-1255, 2013)。この系を用いた予備実験として、術後、窩洞直下の歯髄細胞が *Opn* を発現し、その後、窩洞直下には修復象牙質形成が起こることを見出した。このことから、OPNが修復象牙質形成機構に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、本研究課題では、修復象牙質形成機構を明らかにするべく、OPNに焦点を当て研究を行った。

2. 研究の目的

野生型マウスおよび *Opn* 遺伝子欠損(KO)マウスを用いて、*in vivo* 実験系として臼歯窩洞形成実験、*in vitro* 実験系として象牙質・歯髄複合体の器官培養を行い、組織学的解析

を行い、術後の象牙芽細胞様細胞の分化過程および修復象牙質形成過程におけるOPNの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯の発生過程におけるOPNとI型コラーゲンの発現パターンの解析

胎生15.5日齢から生後6週齢の野生型マウスを灌流固定した後、脱灰後に通法に従いパラフィン切片を作製し、抗OPN、抗I型コラーゲン免疫組織化学、*Opn*、*coll1a1* の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

(2) 歯の窩洞形成後の修復象牙質形成過程におけるOPNの役割

生後5週齢の野生型マウスおよび *Opn* KOマウスの上顎第一臼歯近心歯頸部にラウンドバーを用いて溝状の窩洞を形成した。術後1~14日後に灌流固定した後、脱灰後に通法に従いパラフィン切片または凍結切片を作製し、抗nestin、抗OPN、抗DSP、抗Dentin matrix protein 1 (DMP1)、抗Ki67、抗I型コラーゲン、抗integrin $\alpha\beta_3$ 免疫組織化学、TUNEL染色、*Opn*、*coll1a1*、*Dspp* の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。さらに、術後3日の歯髄を取り出し、マイクロアレイにて遺伝子発現を解析した。

(3) 象牙質・歯髄複合体の器官培養系を用いたOPNのI型コラーゲン形成促進効果の検証

生後3週齢の野生型マウスおよび *Opn* KOマウスの上顎第一臼歯を抜去後、サージカルメスで半分に分断した後、リコンビナントOPN(rOPN)を培地に加え、Trowel法にて、象牙質・歯髄複合体の器官培養を行った。培地は2日ごとに交換した。培養開始後1~7日に固定し、抗nestin、抗Ki67、抗I型コラーゲン免疫組織化学、TUNEL染色、*coll1a1* の *in situ* hybridization を行った。

4. 研究成果

(1) 歯の発生過程におけるOPNとI型コラーゲンの発現パターンの解析

野生型マウスにおいて、生後1日から3週まで、象牙芽細胞に強い *coll1a1* 遺伝子発現が認められたが、生後6週以降、歯冠部の象牙芽細胞は *coll1a1* 遺伝子発現が減弱していた。一方、*Opn* 遺伝子発現は胎生15.5日から生後2週の歯髄において認められず、生後3週以降、髄角部歯髄に *Opn* 遺伝子発現が認められた。また、髄角部の象牙細管内にOPN陽性反応が認められた。

(2) 歯の窩洞形成後の修復象牙質形成過程におけるOPNの役割

窩洞を形成していない対照群の *Opn* KOマウスの歯髄には組織学的に明らかな発生

学的異常は認められず、野生型マウスと同様に、歯髄・象牙質界面に nestin 陽性の象牙芽細胞が配列していた。また、象牙芽細胞は OPN 陰性であった。

窩洞形成後 1 日では、野生型および *Opn* KO マウスにおいて、窩洞直下の象牙芽細胞に変性像が認められ、nestin 陽性反応が消失していた。野生型マウスでは、歯髄細胞のあるものに弱い *Opn* 遺伝子発現が認められた。術後 3 日には新たに分化したと思われる象牙芽細胞様細胞が歯髄・象牙質界面に配列し、nestin 陽性反応を示していた。野生型マウスでは、窩洞直下の歯髄細胞に *Opn* を強く発現する細胞が認められ、石灰化前線に OPN 陽性反応が認められた。術後 14 日では、窩洞直下に修復象牙質形成が、髄床底側に反応象牙質形成が認められ、象牙芽細胞様細胞に *Dspp*, *colla1* の発現、DSP、I 型コラーゲン、integrin $\alpha_v\beta_3$ 陽性反応が認められた。また、近心歯髄の *Opn* 発現は減弱したものの、既存の象牙質と修復象牙質との境界に連続的な OPN 陽性反応が認められた(図 1)。一方、KO マウスでは、術後 3 日において、歯髄・象牙質界面に nestin 陽性の象牙芽細胞様細胞が配列していた。また、歯髄の *Dmp1* 遺伝子発現の上昇が認められ、窩洞直下の石灰化前線に DMP1 陽性反応が認められた。術後 14 日において、髄角部で修復象牙質形成が阻害されており、象牙芽細胞様細胞に、*Dspp*/DSP, integrin $\alpha_v\beta_3$ の発現が認められたものの、I 型コラーゲン、*colla1* の発現が認められなかった。一方、髄床底側には反応象牙質が形成されており、象牙芽細胞に *colla1* の発現が認められた(図 2)。



図 1 . 野生型マウス窩洞形成後 14 日の歯髄 (H-E 染色)。

野生型マウスの窩洞直下には、既存の象牙質に連続して修復象牙質が形成されている。

D: 象牙質 DP: 歯髄 TD: 第三象牙質 (修復象牙質)

野生型マウスでは、窩洞形成後 3 日で細胞増殖活性の有意な上昇を示し、術後 5 日で増殖活性は減少した。また、術後 1 日で認められた TUNEL 陽性細胞は術後 3 日には減少した。一方、*Opn* KO マウスでは、窩洞形成後 5 日に細胞増殖活性が亢進し、術後 7 日に減少した。



図 2 . オステオポンチン遺伝子欠損 (*Opn* KO) マウス窩洞形成後 14 日の歯髄 (H-E 染色)。

Opn KO マウスの窩洞直下において、歯髄・象牙質界面に象牙芽細胞様細胞の配列が認められるものの、修復象牙質形成が阻害されている。一方、髄床底側には、反応象牙質が形成されている。

D: 象牙質 DP: 歯髄

(3) 象牙質・歯髄複合体の器官培養系を用いた OPN の I 型コラーゲン形成促進効果の検証

抜去した歯をメスで切断した直後では、歯髄は機械的な力により象牙前質から剥離していた。象牙質・歯髄複合体の器官培養 1 日では、TUNEL 陽性細胞が有意に増加しており、剥離した象牙芽細胞のほとんどは nestin 陽性反応を消失していた。器官培養 5 から 7 日では、Ki67 陽性細胞が有意に増加しており、歯髄・象牙質界面には、nestin 陽性の象牙芽細胞様細胞が配列していた。

器官培養 7 日において、野生型マウスでは、rOPN 非投与群において、象牙芽細胞様細胞に弱い *colla1* 遺伝子発現が認められた。一方、rOPN 投与群においては、象牙芽細胞様細胞の *colla1* の発現が上昇していた。*Opn* KO マウスにおいては、nestin 陽性の象牙芽細胞様細胞の分化は認められるものの、*colla1* の発現が認められなかった。一方、rOPN 投与

群では象牙芽細胞様細胞の *coll1a1* の発現がレスキューされていた。

(4) 結論

以上より、歯の窩洞形成後の歯髄治癒過程において、石灰化前線への OPN の沈着が、新たに分化した象牙芽細胞様細胞の I 型コラーゲン形成、すなわち修復象牙質形成に必須の因子であることが明らかになり、*Opn* KO マウスでは、DMP1 が OPN の機能を代償している可能性が示された。

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 4 件)

Saito K, Ohshima H:
Differentiation capacity and maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in the process of pulpal healing following tooth injuries.
Journal of Oral Biosciences. 59(2): 63-70, 2017
査読有,
DOI:10.1016/j.job.2017.03.001

S Makishi, K Saito, H Ohshima:
Osteopontin-deficiency disturbs direct osteogenesis in the process of achieving osseointegration following immediate placement of endosseous implants.
Clinical Implant Dentistry and Related Research. 19(3): 496-504, 2017
査読有,
DOI: 10.1111/cid.12467

Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H:
Osteopontin is essential for type I collagen secretion in reparative dentin.
Journal of Dental Research. 95(9): 1034-1041, 2016.
査読有,
DOI: 10.1177/0022034516645333

Saito K, Ida-Yonemochi H, Ushiki T, Ohshima H:
Responses of pulp vasculature after cavity preparation in rat molars.
Journal of Oral Biosciences. 57(3): 157-164, 2015.
査読有,
DOI:10.1016/j.job.2015.05.003

[学会発表](計 7 件)

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,
札幌コンベンションセンター,
北海道札幌市,
2016 年 8 月 24-26 日

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,
Porvoo, Finland, 2016. 6. 13-18.

齋藤浩太郎, 大島勇人:
マウス臼歯窩洞形成後の歯髄治癒過程における DMP1 の役割 .
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会,
ビッグパレットふくしま,
福島県郡山市,
2016 年 3 月 28-30 日

齋藤浩太郎:
修復象牙質形成過程におけるオステオポンチンの役割について .
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会・研究集会・懇話会,
ビッグパレットふくしま,
福島県郡山市,
2016 年 3 月 27 日

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,
Narita, Chiba, 2015. 6. 12-15.

齋藤浩太郎, 中富満城, 依田浩子, 大島勇人:
象牙芽細胞分化過程における Dspp の機能的意義 .
第 57 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム,
朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター,
新潟県新潟市,
2015 年 9 月 11-13 日 .
J Oral Biosci Suppl 2015, p.128, 2015.

齋藤浩太郎:
歯の他家移植はマウス歯髄幹細胞/前駆細胞の維持を阻害する .
第 57 回歯科基礎医学会学術大会・歯科基礎医学会学会奨励賞受賞講演,
朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター,
新潟県新潟市,
2015 年 9 月 11-13 日 .
J Oral Biosci Suppl 2015, p.65,2015.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

斎藤 浩太郎 (SAITO, Kotaro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10733719