

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10224

研究課題名(和文) 外傷歯における神経伝達シグナルと人為的血流調節による歯髄静的幹細胞賦活化の試み

研究課題名(英文) Activation of dental pulp stem cells by neurotransmission signals and intentional blood flow regulation in traumatic teeth

研究代表者

大島 邦子(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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小児の歯の外傷では完全脱臼の頻度が高いが、歯根完成歯では再植後の歯髄再生は期待できない。今回、再植時に髄床底部への意図的穿孔形成を行うことで早期の歯髄再生を誘導する新手法を検討した。

深麻酔下で3週齢マウス上顎第一臼歯を抜去後、髄床底に穿孔形成したのちに抜歯窩に再植し、歯髄治癒過程を解析した。その結果、穿孔部から早期の血行回復が起こり、術後3～5日の歯髄内アポトーシスの減少と細胞増殖活性の有意な増加を認め、また、Nestin陽性率および歯冠部の第三象牙質形成が増加した。従って、髄床底部への意図的穿孔形成が早期の血行回復を促し、歯髄静的幹細胞を賦活化し、歯髄治癒を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児は頭部が相対的に大きく、転倒に対する防御能力が低いいため、前歯部外傷の頻度が高いが、骨の柔軟性が高いため、成人に多い歯根破折より完全脱臼の割合が高い。完全脱臼の新鮮例には再植が推奨され、根未完成歯では再植後、歯髄再生が期待できるが、歯根完成歯では歯髄再生は期待できない。また、歯の再植後に歯根吸収やアンキローシスを惹起させないためにも、歯髄内に早期に象牙質形成を誘導することが重要であることから、本研究は、小児の歯の完全脱臼後の再植を成功に導く新規治療法へと発展する可能性が高く、人為的に細胞・基質間相互作用を調節することにより歯髄再生を促す歯髄再生療法の基盤構築にも繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Avulsion is frequent in pediatric dental trauma, and pulp regeneration isn't expected in mature teeth after tooth replantation. In this study, we developed a new technique to induce pulp regeneration after replantation by intentionally perforating the floor of the pulp chamber.

Maxillary first molars of three-week-old mice were extracted, and the floor of the pulp chamber was perforated with a carbide bur before replantation. The results suggest that early establishment of revascularization via the perforation reduced the number of apoptotic cells in the pulp chamber, and that significantly more quiescent stem cells survived in the pulp tissue to actively proliferate. The positive rate of Nestin was significantly increased and the formation of third dentin in the crown was also increased. Thus, the results suggest that intentional perforation of the pulp floor promotes pulpal healing by early restoration of blood circulation and activation of pulpal quiescent stem cells.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯髄幹細胞 歯髄再生 再植 アドレナリン受容体作動薬 GFP

1. 研究開始当初の背景

小児は頭部が相対的に大きく、転倒に対する防御能力が低いため、前歯部外傷の頻度が高いが、骨の柔軟性が高いため、成人に多い歯根破折より完全脱臼の割合が高い。完全脱臼の新鮮例には再植が推奨され、根未完成歯では再植後の歯髄再生が期待できるが、歯根完成歯では残念ながら歯髄再生は期待できず、再植後に抜髄をするのが一般的である。これは、根完成歯では再植時の血行回復が期待出来ないことに起因している。動物実験においても、移植歯に、より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。我々はこれまでの研究で、マウス臼歯の再植前に意図的に歯根を切除すること、および偶発的な部分的歯根破折が血行回復を容易にし、歯髄再生に促進的に働くことを明らかにした。しかし、歯根切除は再植歯の歯根長の短縮をきたすこと、また、根尖部歯髄に存在する幹細胞 SCAP (Stem Cells from Apical Papilla) の喪失が、その予後にマイナスに働くことも明らかとなった。

そこで、歯の再植後、早期の血行回復による歯髄治癒を促進するために、再植時に髓床底部に意図的に穿孔する方法を考案した。

一方、歯髄幹細胞には複数の亜集団が存在し、その中で reservoir/reserve 幹細胞集団と考えられている Thy1 陽性細胞は、成体では活性化の低い静的幹細胞であると考えられている。Paul Sharpe らは、齧歯類切歯を切断すると Thy1 陽性細胞の活性化により切歯成長促進が起こること、さらに 3 アドレナリン受容体作動薬の全身投与で Thy1 陽性細胞賦活化による切歯成長促進が起こることを明らかにしている。しかし、これらの結果はヒトの歯とは異なる常生歯を用いた研究結果であり、ヒトの歯と同様な齧歯類臼歯における知見はない。我々は、齧歯類臼歯においても切歯と同様な歯髄静的幹細胞が存在することを示しており、臼歯においても神経伝達シグナルによる歯髄静的幹細胞活性化調節機構があると考え、外傷歯への 3 アドレナリン受容体作動薬応用の可能性に着目し、本研究計画の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究課題は、歯根形成が完了している 3 週齢マウスを用いて、
歯の再植時の髓床底部への意図的な穿孔形成が早期の血行回復による歯髄治癒促進に寄与する
のか、
再植歯の 3 アドレナリン受容体作動薬溶液への浸漬が歯髄静的幹細胞賦活化に寄与する
のか

を検証し、外傷歯における人為的血流調節と神経伝達シグナル調節による歯髄静的幹細胞活性化機構を解明することを目的とする。

歯の再植後に歯根吸収やアンキロシスを惹起させないためには、歯髄内に早期に象牙質形成を誘導することが重要であることから、本研究は、小児の歯の完全脱臼後の再植を成功に導く新規治療法へと発展する可能性が高く、人為的に細胞・基質間相互作用を調節することにより歯髄再生を促す歯髄再生療法の基盤構築にも繋がることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 髓床底部穿孔形成歯の再植実験

深麻酔下で 3 週齢マウス上顎両側第一臼歯を抜去後、左側 (対照群: CG) は即時再植し、右側 (実験群: EG) は髓床底部に直径 0.5 mm のカーバイドバーで穿孔形成後に抜歯窩に再植した (図 1)。術後 3 日から 8 週まで経時的に 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。μCT 撮影後、10% EDTA 2NA 溶液を用いて 4 週間脱

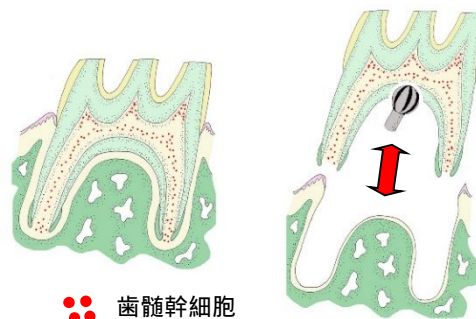


図 1 髓床底部穿孔形成歯の再植実験の模式図
3 週齢マウスの上顎第一臼歯を抜去後、注水下で髓床底部をカーバイドバーで穿孔後、速やかに再植する。

灰し、通法に従い 4 μ m 厚の矢状断パラフィン切片を作製した。切片は HE 染色および免疫染色は、Nestin, CK14, Ki-67 を用い、0.05% メチレンブルーで 対比染色後、顕微鏡で観察した。さらに、TUNEL assay によるアポトーシス解析を行った。

(2) 再植歯の β 3 アドレナリン受容体作動薬溶液への浸漬実験

(1)と同様な方法で穿孔形成を伴わない歯の再植術を施すが、抜去歯を Hanks 液に β 3 アドレナリン受容体作動薬 (イソプロテレノール) を添加した実験群と無添加の対照群に分け、5 分間浸漬後、再植し (図 2) (1)と同様な方法で解析した。イソプロテレノールについては、吸入用気管支拡張剤として医療用医薬品として認可されているアスプール®液 (0.5%イソプロテレノール) を用い、アスプール®液 10mL + Hanks 液 500mL を基準に濃度を变化させて効果を検証した。

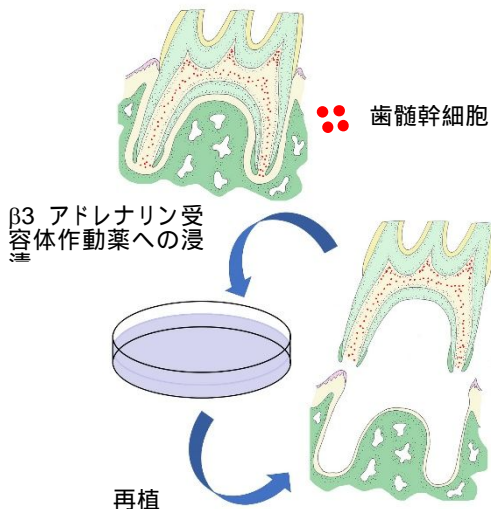


図 2 再植歯の β 3 アドレナリン受容体作動薬溶液浸漬実験の模式図
3 週齢マウスの上顎第一臼歯を抜去後、Hanks 液に β 3 アドレナリン受容体作動薬(イソプロテレノール)添加した溶液に浸漬し、再植する。

4. 研究成果

(1) 髓床底部穿孔形成歯の再植実験

再植後 3 - 7 日の EG (実験群) と対照群 (CG) の H&E および Nestin 染色像を図 3 に示す。

再植後 3 日では、EG と CG 共に歯髓内に存在していた象牙芽細胞は広範に変性しており、Nestin 陽性反応を消失していた。

CG では歯冠部で Nestin 陽性反応は観察されず、歯根部の一部で Nestin 陽性細胞が配列していた (b, c)。

EG では髓角部を含む穿孔形成部位付近に Nestin 陽性細胞が配列していた (e, f)。

術後 5 日になると、CG では、歯冠部の血液再灌流は完了していないが、歯根部では血液再灌流が起こっており Nestin 陽性細胞が配列していた (a - c)。EG では穿孔形成部を介して血液再灌流が歯髓全体に渡って拡大していた (e, f)。

術後 7 日では CG では歯冠部での血液再灌流の進行に伴って Nestin 陽性の象牙芽細胞様の配列が歯冠部にも拡大しているが、髓角部付近での Nestin 陽性反応は一部分に留まっていた (a-c)。EG では歯髓内の血液再灌流はほとんど完了しており、Nestin 陽性細胞も歯髓全体に渡って配列しつつあり、髓角部まで Nestin 陽性細胞が配列していた (d-f)。

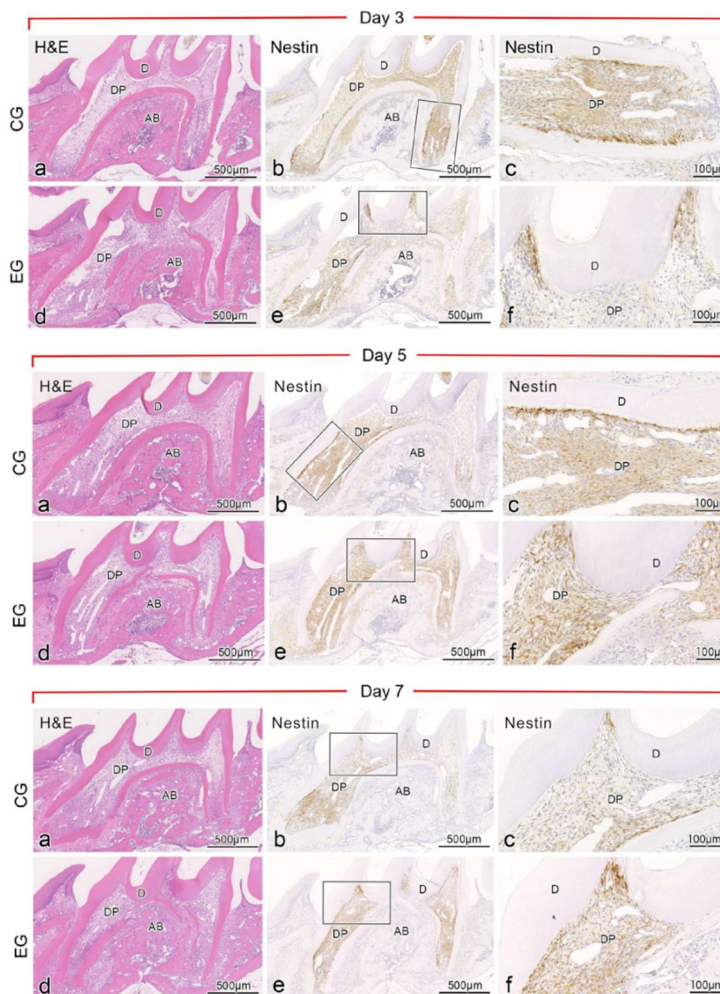


図 3 再植後 3-7 日の H&E、Nestin 染色 (上段 ; 対照群 CG、下段 ; 実験群 EG)

図4に再植後3-7日のEG・CGの歯髄・象牙質界面におけるNestin陽性率(左:近心部、右:遠心部)を示す。EGのNestin陽性率は、術後5日目と7日目で近心部、遠心部ともにCGに比べて高い傾向を示した。EGでは、近心部、遠心部ともに術後3日目と7日目間でNestin陽性率が有意に増加していた(a, b)。

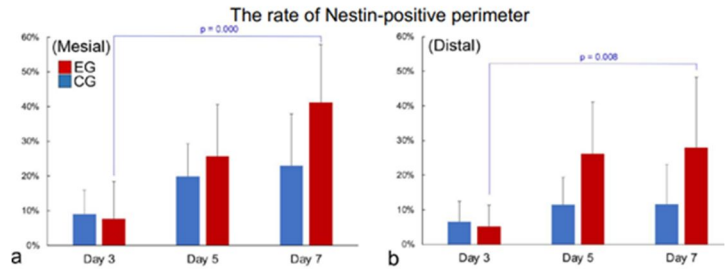


図4 再植後3-7日の歯髄・象牙質界面におけるNestin陽性率(左図:近心、右図:遠心、赤:実験群、青:対照群)

図5に再植後3-7日のKi-67陽性率、図6にTUNEL陽性率(図5, 6ともに左図:近心部、右図:遠心部、上段:歯冠部、下段:歯根部)を示す。

Ki-67陽性率から、対照群に比較して、実験群では再植後により早く、より高い細胞増殖活性率のピークが確認された。

TUNEL assayでは、実験群のTUNEL陽性細胞率が術後3日目と5日目で対照群よりも低く、アポトーシスが抑制されていることが明らかとなった。

(2)再植歯の3アドレナリン受容体作動薬溶液への浸漬実験

Hanks液にイソプロテレノールを5~20%の濃度で添加した溶液に、抜去歯を5分間浸漬後に再植し2週後の治癒過程を解析した。

予備実験では、Hanks液のみの対照群に比較して、10%実験群でNestin陽性率が高い傾向がみられ、歯髄治癒が促進する可能性が示唆されたが、その後の本実験では明らかな差を認めなかった。今回の計画では、抜去後そのまま浸漬したため、作動薬と歯髄の接触面積が小さく、効果を確認できなかったものと考えられ、今後、薬効を確認できる手法を検討する必要があると思われる。

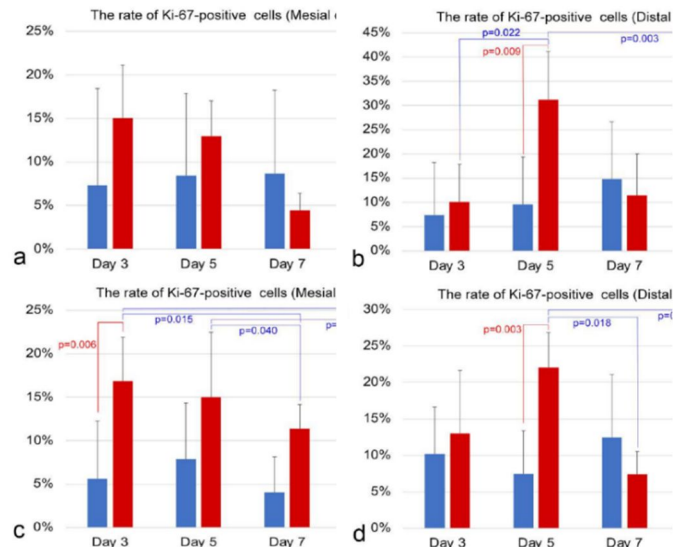


図5 再植後3-7日のKi-67陽性率(左図:近心、右図:遠心、上段:歯冠部、下段:歯根部、赤:実験群、青:対照群)

まとめ

髄床底穿孔群では、対照群に比較して、再植後の血行回復がより早く、高い細胞増殖活性率のピークが早期に確認されるとともに、アポトーシスは対照群よりも抑制されていることが示された。従って、髄床底部への意図的穿孔形成による早期の血行回復が、歯髄静的幹細胞の細胞死を減少させ、歯髄治癒の促進に寄与していることが示唆された。

一方、外傷歯への3アドレナリン受容体作動薬については、今回の実験系ではその効果を確認できなかったが、濃度・浸漬時間または薬効を高める手技について、今後更なる検討が必要である。

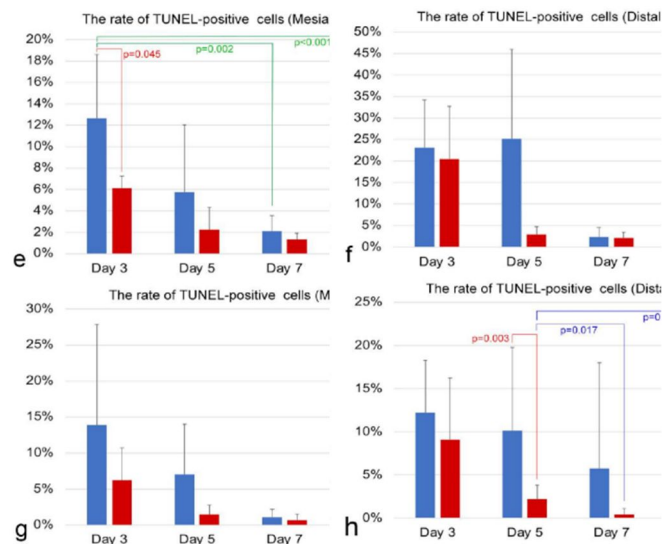


図6 再植後3-7日のTUNEL陽性率(左図:近心、右図:遠心、上段:歯冠部、下段:歯根部、赤:実験群、青:対照群)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Suzuki-Barrera K, Makishi S, Nakatomi M, Saito K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of osteopontin in the process of pulpal healing following tooth replantation in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 460-468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.09.011. eCollection 2022 Dec.	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 -
1. 著者名 Sano H, Nakakura-Ohshima K, Okada Y, Sato T, Ohshima H	4. 巻 65
2. 論文標題 The effect of intentionally perforating the floor of the pulp chamber on pulpal healing after tooth replantation in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Oral Biosci	6. 最初と最後の頁 31-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.01.007. Epub 2023 Feb 1.	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 -
1. 著者名 Lee DJ, Lee SJ, Lee MJ, Kim EJ, Ohshima H, Jung H	4. 巻 26
2. 論文標題 The role of angiogenesis and pulpal healing in tooth replantation and allograft transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 100945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.100945	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 -
1. 著者名 Nakakura-Ohshima K, Quispe-Salcedo A, Sano H, Hayasaki H, Ohshima H	4. 巻 37
2. 論文標題 The effects of reducing the root length by apicoectomy on dental pulp regeneration following tooth replantation in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dent Traumatol	6. 最初と最後の頁 677-690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/edt.12679	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 -

1. 著者名 Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Saito K, Nakatomi M, Ohshima H	4. 巻 2
2. 論文標題 The Sonic hedgehog-Patched-Gli signaling pathway maintains dental epithelial and pulp stem/progenitor cells and regulates the function of odontoblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Dent Med	6. 最初と最後の頁 651334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fdmed.2021.651334	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 -

1. 著者名 Nakakura-Ohshima K, Quispe-Salcedo A, Sano H, Hayasaki H, Ohshima H	4. 巻 11
2. 論文標題 The effects of reducing the root length by apicoectomy on dental pulp regeneration following tooth replantation in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dent Traumatol	6. 最初と最後の頁 Apr 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/edt.12679.	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 -

1. 著者名 Soda M, Saito K, Ida-Yonemochi H, Nakakura-Ohshima K, Kenmotsu S, Ohshima H:	4. 巻 91
2. 論文標題 Reduced enamel epithelium-derived cell niche in the junctional epithelium are maintained for a long time in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Periodont	6. 最初と最後の頁 819-827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.19-0269	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 -

1. 著者名 Saito K, Nakatomi M, Ohshima H	4. 巻 46
2. 論文標題 Dentin matrix protein 1 compensates for lack of osteopontin in regulating odontoblast-like cell differentiation following tooth injury in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Endod	6. 最初と最後の頁 89-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joen.2019.10.002	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 -

1. 著者名 Tohma A, Ohkura N, Yoshiba K, Takeuchi R, Yoshiba N, Edanami N, Shirakashi M, Belal RS, Ohshima H, Noiri Y	4. 巻 46
2. 論文標題 Glucose transporter-2 and 4 are involved in glucose supply during pulpal wound healing following pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Endod	6. 最初と最後の頁 81-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joen.2019.10.003.	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 -

1. 著者名 Takeuchi R, Ohkura N, Yoshiba K, Tohma A, Yoshiba N, Edanami N, Shirakashi M, Belal RS, Ohshima H, Noiri Y	4. 巻 26
2. 論文標題 Immunohistochemistry and gene expression of GLUT1, RUNX2 and MTOR in reparative dentinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Dis	6. 最初と最後の頁 341-349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13230.	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 -

1. 著者名 Quispe-Salcedo A, Sato T, Matsuyama J, Ida-Yonemochi H, Ohshima H	4. 巻 15
2. 論文標題 Responses of oral-microflora-exposed dental pulp to capping with a triple antibiotic paste or calcium hydroxide cement in mouse molars.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 216-225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.10.001	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Angela Quispe-Salcedo, Kiyoko Suzuki, 中富満城, 依田浩子, 大島勇人
2. 発表標題 The interaction between osteopontin and stem/progenitor cells determines the pulpal healing following tooth replantation in mice.
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野拓人, 大島邦子, 岡田康男, 佐藤拓一, 大島 勇人
2. 発表標題 髓床底部への意図的穿孔形成がマウス歯の再植後の歯髄静的幹細胞動態に及ぼす影響.
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野拓人, 大島邦子, 岡田康男, 佐藤拓一, 大島 勇人
2. 発表標題 髓床底部への意図的穿孔形成がマウス白歯再植後の歯髄治癒過程に及ぼす 影響
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki K, Makishi S, Nakatomi M, Saito K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H
2. 発表標題 OPN is necessary for proper inflammation and revascularization to deposit dentin in replanted teeth.
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 依田 浩子, 大島 勇人
2. 発表標題 マウス歯髄組織の発生・再生治癒過程におけるコンドロイチン硫酸の機能発現.
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suzuki K, Makishi S, Nakatomi M, Saito K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H
2. 発表標題 Role of osteopontin in the process of pulpal healing following tooth replantation in mice.
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suzuki Kiyoko, 真喜志佐奈子, 中富満城, 斎藤浩太郎, 依田浩子, 大島勇人
2. 発表標題 Osteopontin and root development stage are essential for pulpal healing following tooth replantation.
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	大島 勇人 (OHSHIMA HAYATO) (70251824)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	早崎 治明 (HAYASAKI HARUAKI) (60238095)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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
---------	---------