

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462955

研究課題名(和文)胎生期ラベリング法を用いた歯髄幹細胞の局在と維持機構の解明

研究課題名(英文)The localization of putative dental pulp stem cells and the mechanisms regulating their maintenance demonstrated by the prenatal BrdU-labeling method

研究代表者

石川 裕子 (ISHIKAWA, Yuko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40401757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：切歯では静的幹細胞と考えられるdense LRCsは歯乳頭と形成端の外エナメル上皮側に局在し、Gli1およびPtch1を共発現していた。臼歯では、生後1日で多くのdense LRCsが歯髄中央部に分布し成長に伴い減少し、Gli1陽性細胞は2週以降に歯髄中央部で、Ptch1陽性細胞は3週以降に歯髄中央部に局在した。ソニック・ヘッジホッグ(Shh)のmRNA発現は最初エナメル上皮に、その後、象牙芽細胞と歯髄細胞で発現した。

以上より、歯の静的幹細胞はShhシグナルで調節されており、Shhシグナルは上皮間葉相互作用および象牙質形成において象牙芽細胞の分化と機能発現に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dense LRCs, Gli1 (+)-cells, and Ptch1 (+)-cells were co-localized in the outer enamel epithelium of the apical bud and the apical dental papilla of incisors. In the developing molars, numerous dense LRCs at Day 1 were decreased in number according to the progress of odontogenesis and maintained in the center of pulp tissues. Gli1 (+)-cells were maintained in the pulp horn during the examined stages, and increased in number and maintained in the center of pulp tissue during Wks 2-5. Ptch1 (+)-cells were localized in the pulp horn at Day 1 and increased in number in the center of pulp after Week 3. Shh mRNA were first expressed in the enamel epithelium and shifted to the odontoblasts and the other pulp cells.

The findings suggest that the quiescent dental stem cells are regulated by Shh signaling and that Shh signaling play a crucial role in the differentiation and integrity of odontoblasts during epithelial-mesenchymal interactions and dentinogenesis.

研究分野：歯科衛生士教育

キーワード：歯髄 BrdU 歯髄幹細胞 マウス 発生 ソニック・ヘッジホッグシグナル

1. 研究開始当初の背景

う蝕・咬耗・磨耗・窩洞形成等の損傷が象牙質に及ぶと、歯髄では反応性に象牙質形成が惹起される。一方、永久歯や乳歯の歯髄には組織幹細胞が存在し *in vitro* において歯髄血管周囲で間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 や CD-146 を発現する歯髄組織幹細胞が存在すること、growth/differentiation factor 11 (Gdf11) 転写因子が歯髄幹細胞/前駆細胞分化を促すことが報告されている。また最近では、ヒトの歯髄幹細胞が歯髄再生に必要な高い血管形成能や神経再生能を持つことなど、歯髄幹細胞の多機能性が報告されている。しかし、歯髄幹細胞の存在は、幹細胞マーカーによる単離と生体外での分化能の検証に留まり、生体内での局在とその維持機構については十分に明らかになっていない。

我々はこれまで、毛包の幹細胞を明らかにした手法 (Nature 438: 1026-1029, 2005) を参考に、歯の発生過程において細胞増殖活性が高い時期 (ラット: 胎生 15~19 日、マウス: 胎生 15~17 日) に、ブロモデオキシウリジン (BrdU) を母獣に腹腔内投与することで、仔獣の成熟歯髄における、組織幹細胞と思われる BrdU ラベル細胞 (LRCs) を同定する胎生期ラベリング法の確立に成功している。しかし、この LRCs と Bmi-1、Oct-3/4、Yap など幹細胞マーカーとの関連は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、損傷時に活性化する静的な幹細胞を持つ臼歯と、持続的に増殖細胞を提供する動的な幹細胞を持つ切歯を比較することで、歯髄幹細胞の局在とその維持機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

DNA 合成期に核内に取り込まれる BrdU を妊娠マウス腹腔内に毎日 1 回 (150mg/kg) 3 日間投与した後、一定期間置くと幹細胞をラベルすることができる胎生期ラベリング法を施した ICR 仔マウスを使用して、生後から 5 週齢まで経時的に固定し、臼歯および切歯のパラフィン切片を作製した。

(1) LRCs と Bmi-1、Oct-3/4、Yap、Sox2、Sca1、SSEA1、SSEA3、Gli1 などの幹細胞マーカー、細胞増殖活性として Ki67 抗体を使用して免疫組織化学的に解析をした。また、各陽性細胞数の継時的変化について定量解析を行った。

(2) LRCs と Shh シグナルの関与を調べるために Shh、Ptch1 抗体を使用し免疫組織化学的に解析を行った。さらに、*Shh* および *Ptch1* の mRNA 発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べた。

4. 研究成果

(1) 生後 5 日と 3W 齢マウス口腔粘膜上皮における LRCs と幹細胞マーカー発現

ターンオーバーの速い口腔粘膜上皮では、Sox2、Ki67 は生後 5 日および 3 週ともに発現したが、LRCs は 3 週で消失した。また、Gli1 は細胞外基質に不特異反応を含む弱い反応が見られた。

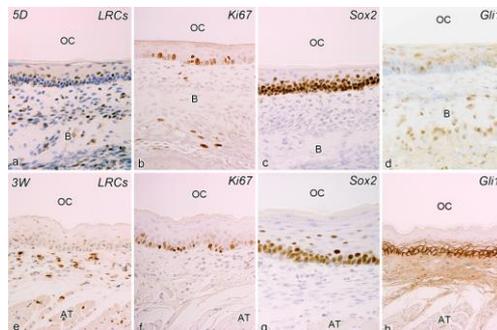


図 1. 生後 5 日、3 週齢マウス口腔粘膜上皮
a: LRCs 染色、b: Ki67 染色、c: Sox2 染色。
D: Gli1 染色。LRCs は 3W では発現が見られない。(OC: 口腔、B: 歯槽骨)

(2) マウス切歯の歯乳頭/歯髄およびエナメル器における LRCs と幹細胞マーカー発現

生後 3 週齢切歯では、Bmi-1、Oct-3/4、Yap の発現が特異的ではなかったが、Gli1 および LRCs は、歯乳頭と形成端外エナメル上皮側に多く発現し、Sox2 は切歯形成端全体に強い反応が見られつつも外エナメル上皮側に強く発現していた。しかし、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞は、内エナメル上皮側に多く局在していた (図 2)。

Bmi-1、Oct3/4、Yap については特異的な発現が見られず、LRCs との関係性を見いだせなかった。

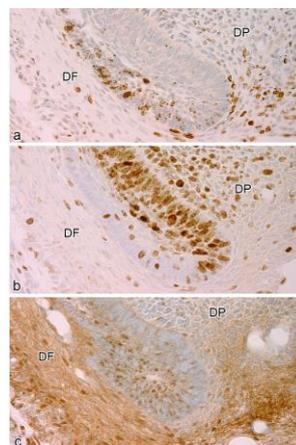


図 2. 3 週齢マウス切歯形成端
a: LRCs 染色、b: Ki67 染色、c: Gli1 染色。
LRCs と Gli1 陽性細胞は外エナメル上皮側に、増殖細胞は内エナメル上皮側に局在している。(DP: 歯髄、DF: 歯小囊)

(3) マウス臼歯発生過程における LRC と幹細胞マーカー発現

LRCs は、生後 1 日～1 週間では歯髄中央部に多く分布していたが、歯の発生に伴い数が減少し、2 週以降になると核が濃く染まる LRCs (dense LRCs) は歯髄中央部血管周囲に局在していた。SSEA3 陽性細胞は、生後 5 日で歯髄全域に分布し、髄角部歯髄で特に強い反応がみられた。また、生後 2～3 週で髄角部の象牙芽細胞下層に強い反応がみられたが、dense LRCs の発現との関係は観察されなかった。

Gli1 陽性細胞は、生後 1 日～1 週間で髄角部歯髄に数多く局在していた。2 週以降になると歯髄中央部で発現が増加し、歯髄中央部血管周囲に強く発現し dense LRCs の発現部位と一致していた (図 3)。また、定量解析では、生後 2 週以降、歯髄中の dense LRCs の細胞数は有意に減少し、Gli1 陽性細胞数は有意に増加していた (図 4)。

Bmi-1、Oct-3/4、Yap、Sox2、Sca1、SSEA1 については特異的な発現がみられなかった。

(2) と (3) 結果より Gli1 陽性細胞と LRCs の発現部位が一致していたこと、生後 2 週以降 dense LRCs の細胞数は有意に減少する半面、Gli1 陽性細胞数は増加していたこと、Gli1 はソニック・ヘッジホッグ (Shh) シグナル伝達に関わる転写因子であることから、静的幹細胞と思われる dense LRCs と Shh シグナルの関与が示唆された。そこで、LRCs と Shh シグナルの関与について調査した。

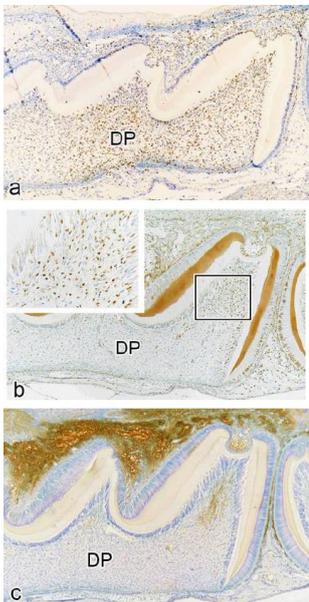


図 3. 1 週齢マウス臼歯
a : 胎生期ラベリング法による LRCs 染色、
b : Gli1 染色、c : Ptch1 染色。髄角部染色
が一致している。(DP : 歯髄)

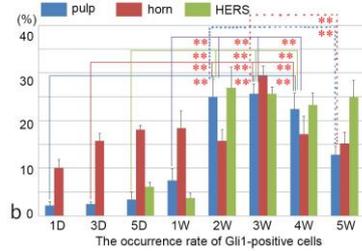
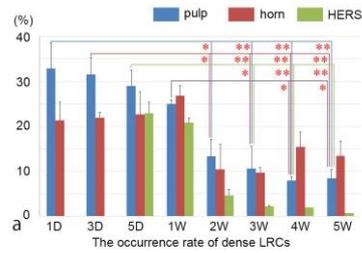


図 4. dense LRCs と Gli1 陽性細胞数の変化
a : dense LRCs、b : Gli1 陽性細胞。2W 以降
で dense LRCs は有意に減少し、Gli1 は有
意に増加している。

(4) マウス切歯および臼歯発生過程における LRCs と Shh シグナルの関係

生後 3 週齢切歯形成端における Shh タンパク質発現は、歯胚上皮や神経・血管束に比較的強い発現がみられ、Shh のレセプターである Ptch1 の陽性部位は、転写因子の Gli1 の陽性反応部位に一致していた。一方、切歯の Shh の mRNA 発現は、形成端近くの内エナメル上皮側に、Ptch1 は上皮と間葉組織に発現が見られた (図 5)。

臼歯発生過程における Shh タンパク質発現は、上皮・間葉にみられ、象牙芽細胞層に強い発現がみられた。Ptch1 タンパク質発現は、生後 1 日で、髄角部歯髄に局在し (図 2)、3 週以降で歯髄中央部血管周囲に発現していた。Shh mRNA 発現は、生後 1～5 日で形成端以外の内エナメル上皮で見られ、生後 3 日から 2 週間で象牙芽細胞と他の歯髄細胞で発現がみられた。Ptch1 mRNA 発現は、生後 1～5 日で上皮と間葉を含む歯胚中で、生後 2～4 週では象牙芽細胞で発現がみられた (図 6)。

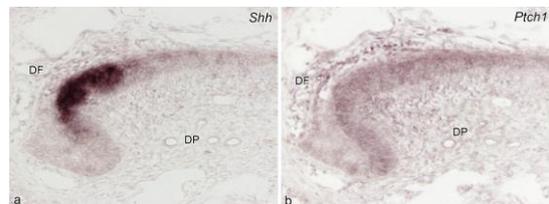


図 5. 3 週齢マウス切歯
a : Shh の mRNA 発現、b : Ptch1 の mRNA 発
現。Shh は内エナメル上皮側に Ptch1 は上
皮と間葉組織に発現がみられる。(DP : 歯
髄)

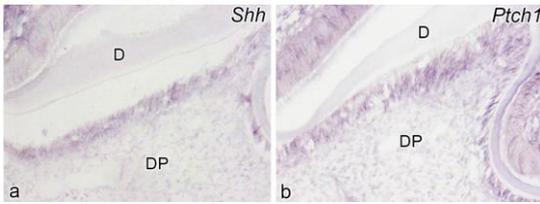


図 6. 生後 5 日齢マウス臼歯髄角部 mRNA 発現
a: *Shh*, b: *Ptch1*。どちらも象牙芽細胞で発現がみられる。(DP: 歯髄)

以上より、切歯では形成端の内エナメル上皮側で *Shh* の産生・分泌が起こり、外エナメル上皮で発現の見られる *Shh* レセプターの *Ptch1* がシグナルを受け取り、外エナメル上皮側にある LRCs の維持を調節していると考えられた。

一方、臼歯では、生後 1 日では dense LRCs は歯髄に多く、*Shh* mRNA は内エナメル上皮で発現し、生後 3 日以降で象牙芽細胞および歯髄にシフトした。また、*Shh* シグナルに関わる転写因子 *Gli1* の数が増加する生後 2 週で、dense LRCs の数は減少した。以上より、歯の静的幹細胞の維持に *Shh* シグナルが関与し、*Shh* シグナルは上皮間葉相互作用および象牙質形成において、象牙質の分化と機能発現に重要な役割を担うことが示唆された。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

歯の幹細胞を静的幹細胞と動的幹細胞という視点から、その維持機構に *Shh* シグナルが関わる事を世界で初めて明らかにした事は特筆される。また、象牙質の石灰化に伴い、*Shh* の転写が上皮から間葉にシフトすることを明らかにしたことも新たな発見と考えられるが、今後 RT-PCR を用いて、歯髄での *Shh* mRNA 発現を確認する必要がある。

(5) 今後の展望

静的幹細胞と *Shh* シグナルの関係性を、器官培養系とドキシサイクリン投与ですべての細胞の GFP 発現がオンになる H2B-GFP 遺伝子改変マウスを用いた機能アッセイ系で解明する予定である。

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 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. Hong Kong, Japan and Korea Knowledge Exchange Sessions 2016, Hong Kong, 2016. 2. 12-13.

② 石川裕子, 中富満城, 大島勇人: マウス切歯 apical bud および切歯・臼歯歯髄における静的幹細胞維持機構について. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 朱鷺メッセ (新潟), 2015 年 9 月 11-13 日. J Oral Biosci Suppl 2015, p.190, 2015.

③ 石川裕子, 大島勇人: マウス切歯 apical bud および臼歯発生過程における BrdU label-retaining cells (LRCs) と幹細胞マーカー発現との関係. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場 (博多), 2014 年 9 月 25-27 日. J Oral Biosci Suppl 2014, p.128, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 裕子 (ISHIKAWA, Yuko)
新潟大学・医歯学・准教授
研究者番号: 40401757

(2) 研究分担者

大島 勇人 (OHSHIMA, Hayato)
新潟大学・医歯学・教授
研究者番号: 70251824

(3) 研究協力者

中富 満城 (NAKATOMI, Mitsushiro)
九州歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 10571771