

最近のトピックス

歯髄細胞の由来に関する最近の知見 Recent topics on the lineage of dental pulp

新潟大学 大学院医歯学総合研究科
顎顔面再建学講座 硬組織形態学分野
大島 勇人

Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue,
Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Niigata
University Graduate School of Medical and Dental Sciences
Hayato Ohshima

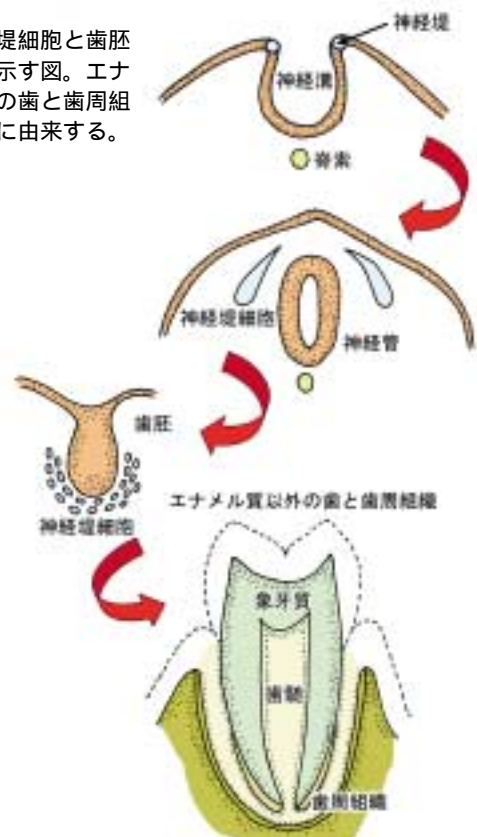
1. はじめに

象牙質に囲まれた歯髄は外界とは根尖孔で交通するという一種の閉鎖空間に近い特殊な環境に置かれており、各種の外來刺激により炎症が惹起されると内圧の増加をきたしやすく、重篤な歯髄炎に移行しやすいという特徴がある。一方、歯髄は栄養や感覚だけでなく修復能力ももつ。歯が磨り減ったり、う蝕や治療で削れたりすると、歯髄内では局所的に象牙質が形成される。歯の再植後の歯髄治癒過程では、歯髄内に象牙質が形成される場合に加え歯髄が骨組織に置換する場合があります、後者の治癒経過を辿る場合が多い¹⁾。現在両者の治癒機転を規定するメカニズムは明らかになっていないが、局所に存在する細胞の分化能と再生の場やシグナル分子が重要であると予想される。この様に、歯髄は骨組織形成能を含めた多分化能をもつ可能性も考えられる。歯髄の特性の解明は治療法の選択にも影響を及ぼすと考えられ、歯髄組織の多分化能に関する知見は歯科臨床においても重要な問題である。

2006年9月21日に第48回歯科基礎医学会学術大会・総会サテライトシンポジウム「発生学的見地から考える細胞分化の多能性と再生医学」が開催された²⁾。このシンポジウムでは、上記のような歯髄特有の現象を明らかにするために、発生学的な見地、すなわち歯髄に存在する細胞の由来について活発な議論が交わされた。歯髄は歯乳頭に由来する間葉組織であり、歯根膜・セメント質・歯槽骨などの歯周組織細胞に分化すると考えられている歯小嚢細胞と由来を同じくする。これらの組織は、脳や脊髄などの中枢神経の原基（神経管）が造られる時に、上皮から間葉にこぼれ落ちた細胞群（神経堤細胞）が歯

の発生する領域（主に第1鰓弓）に遊走し、歯胚上皮との相互作用を経て象牙芽細胞や歯髄細胞に分化すると考えられている（図1）。しかし、元々そこに存在する中胚葉細胞や血管や神経の歯髄内への進入に伴う中胚葉組織からの細胞の移動なども由来の一つであると考えられる。また、歯髄内に存在が確認された多能性（注：発生生物学では totipotent [全能性], pluripotent [多能性], multipotent [複能性] を使い分けているが、本稿では multipotent に対しても多能性という語を用いている）の間葉系幹細胞の表現型が骨髄の間葉系幹細胞のマーカーとほとんど一致していることなどから³⁾、歯髄組織の由来に関して再考が必要になってきた。さらに、近年の分子生物学・細胞生物学の進展により、神経堤細胞や中胚葉細胞のマーカーを用いた検索が可能になり、それらを用いた実験的検証が可能となった。そこで、本稿では、サテライトシンポジウム の話題にもなった歯髄組織の発生学的由来にスポットを当て、歯髄組織を構成する細胞の由来についての最新の知見を紹介すると共に、私たちの実験データにより明らかになった外的刺激に対する歯髄反応の特殊性から歯髄を構成する細胞の由来について考察を加えたい。

図1 神経堤細胞と歯胚との関係を示す図。エナメル質以外の歯と歯周組織は神経堤に由来する。



2. Yang Chai 論文の衝撃

2000年4月南カリフォルニア大学のYang Chai博士らが発生生物学分野における権威ある雑誌Developmentに衝撃的な論文を発表した⁴⁾。“Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis”と題されたこの論文において、*Wnt1* シグナルが、神経堤細胞が出現する時期の神経管で発現を開始し、それ以降胎生期を通じて中枢神経系以外の組織には発現しないことに着目して、これにROSA26のコンディショナルレポーターマウスを組み合わせることで、頭部神経堤細胞をLacZにて標識する遺伝子改変マウスを作製し、頭部神経堤に由来する細胞・組織を明らかにした。この結果はこれまで報告されてきたウズラとニワトリのキメラ実験やDilトレーサー実験の結果を確認することになったが、歯胚の間葉組織の中にはLacZで標識されない非頭部神経堤細胞の存在も明らかとなった。

神経堤に由来する細胞をLacZ陽性細胞として特異的に標識できる上記のマウスを用いて、器官形成に関する神経堤細胞の存在時期や部位、分化能について検討すると、歯の間葉には胎生期のみならず出生後も多数の神経堤由来細胞が存在し、これらは象牙芽細胞のみならず、軟骨細胞、骨芽細胞や色素細胞等の様々な細胞に分化できることが明かとなった⁵⁾。また、歯胚の間葉細胞の中に、LacZ陽性のみならずLacZ陰性の細胞も存在し、骨芽細胞や軟骨細胞に分化できる細胞が、両者からなることも明らかになった²⁾。一方、中胚葉マーカーとして*Mesp1* 遺伝子を利用した遺伝子改変マウスを用いて中胚葉細胞の運命を検索すると、帽状期歯胚の歯乳頭に中胚葉細胞が進入することも明らかになっている²⁾。これらの結果は、歯乳頭細胞が神経堤細胞と中胚葉細胞の二種類からなり、両者に由来する細胞が歯髄に存在する可能性を示唆する結果となった。

3. 歯髄細胞とその役割

歯髄は従来神経堤由来と考えられていたが、上記のようにYang Chai論文発表以来、神経堤細胞に加え、歯胚の周囲に存在していた中胚葉の関与もあるとする考えが受け入れられつつある⁶⁾。ここで、歯髄構成細胞とその役割について簡単に触れておく。成熟歯髄では、未石灰化細胞外マトリックスの形成とターンオーバーが起こっており、それを担っているのが線維芽細胞であるが、線維芽細胞と(線維芽細胞や象牙芽細胞に分化する能力をもった)未分化間葉細胞(神経堤由来細胞または中胚葉由来細胞)とをその外観で区別することは難しい。歯髄

の組織標本を観察すると、歯髄周辺部に細胞が高密度に分布しているのが分かる。これにより歯髄は次の4つに層分けすることが出来る。すなわち、象牙芽細胞層odontoblast layer、細胞希薄層cell-free zone、細胞稠密層cell-rich zone、歯髄中心部の4層である。象牙芽細胞層は文字通り象牙芽細胞からなるが、細胞間には接着複合体が発達し、血行性の組織液が容易に象牙前質へ拡散しない生体バリアとしての機能を果たす。また、象牙芽細胞と下層の間葉細胞間、もしくはそれぞれの細胞同士はギャップ結合を発達させており、歯髄構成細胞は細胞間の連絡をもち、機能ユニットとして働いていることが示唆されている。

その他の細胞としては、樹状細胞やマクロファージなどの防御細胞が歯髄に存在する。数は少ないがリンパ球も存在すると考えられているが、Bリンパ球は健全な歯髄には存在しないと言われる。防御細胞のほとんどは免疫応答に重要な役割を果たす、細胞膜にクラス主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex: MHC)分子をもつ抗原提示細胞である。これらの細胞は外的侵襲を受けやすい歯髄周辺部に密に分布しており、免疫監視細胞として機能している。抗原提示細胞は象牙芽細胞層・象牙前質にも存在し複数の象牙芽細胞突起と接触しており、象牙芽細胞の恒常性への関与も推測されている¹⁾。歯髄における多様な細胞集団の相互作用が歯髄細胞のダイナミクスに重要な役割を担っていると考えられる。

4. 歯の再植後の歯髄反応

私たちはこれまで、ネズミ(ラット)を用いた動物実験モデルにより歯の再植後の歯髄治癒過程を検索してきた¹⁾。歯の再植後の歯髄では、根尖で神経と血管が切断されるので、歯髄内の血行が遮断されることになる。血行の遮断により歯髄細胞への酸素供給が低下し、象牙芽細胞は酸素不足で死んでいくことになる。低酸素状態を強いられた象牙芽細胞が生き残るか否かは血行回復までの時間にかかっていると思われるが、影響を与える因子として抜歯から歯の再植までにかかった時間や歯髄の機械的な傷害程度が考えられ、対合歯による咬合性外傷も大きなファクターであるようである。髄床底部では(髄管を通過して)早期に血行が回復し象牙芽細胞が生き残る割合が高いようで、血行の回復に時間がかかる髄角部では多くの象牙芽細胞は死んでしまうようである。

象牙芽細胞が死んでしまうと、死んだ象牙芽細胞に代わり歯髄間葉細胞が新しい象牙芽細胞に分化する。低酸素状態により象牙芽細胞が死滅し、局所の掃除が終わると歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現し、その細胞突起を象牙細管内に深く侵入させ、新しく分化した象牙芽細

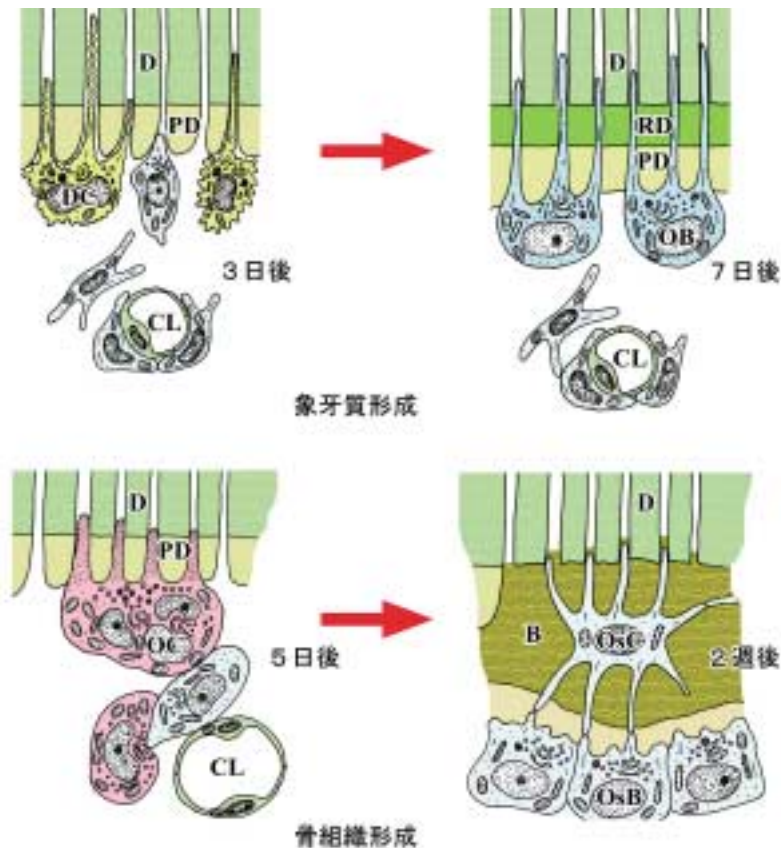


図2 歯の再植後の治癒過程における歯髄・象牙質界面を示す図。樹状細胞と破骨細胞系細胞の出現が治癒パターン決定の鍵となる。B：骨組織，CL：血管，D：象牙質，DC：樹状細胞，OB：象牙芽細胞，OC：破骨細胞系細胞，OsB：骨芽細胞，OsC：骨細胞，PD：象牙前質，RD：修復象牙質

胞が配列すると、その後歯髄・象牙質界面から姿を消す。歯の切削後の歯髄治癒過程においても同様な現象が確認されており、歯の切削であれ、歯の再植後であれ、歯髄の治癒過程において、樹状細胞の出現から象牙芽細胞の分化までの時間は変わらない（約2日間）ことが明らかになっている（図2）¹⁾。

歯の再植後には、歯髄内に象牙質が形成される場合と歯髄が骨組織に置換する場合があります、後者の治癒経過を辿る場合が多いことは先に述べた（図3）¹⁾。また、骨や歯を吸収する破骨細胞系細胞が歯髄腔内に出現すると、この骨組織形成が惹起されることも明らかとなった（図2）⁷⁾。そして、歯髄が骨組織に置換したものは、歯根吸収やアンキロシスを起こしやすく、標本によっては、歯冠部を除き、歯が周囲の歯槽骨と一体化したのも観察される（図3）。一方、歯髄内に象牙質が形成される場合は、象牙質の部分的吸収を受けたとしてもア

ンキロシスを起こすことはない。また、乳歯の歯根吸収メカニズムについても十分にわかっていないが、乳歯が歯根吸収を受ける前には象牙芽細胞が消失してしまうことを考え合わせると、『象牙芽細胞は単なる象牙質を形成する細胞という以外に、歯髄内における存在自体が歯髄組織の維持に何らかの役割を担っている』と考えられるのではないだろうか¹⁾。

GaAlAs 半導体レーザーをネズミ（ラット）の歯に照射して、歯髄に起こる変化について検索すると、レーザー照射後に歯を表面から見ただけでは変化がないが、歯髄内硬組織形成が誘導されることが明らかとなった⁸⁾。すなわち、弱い刺激では象牙質形成が誘導され、レーザーの出力が増加すると、象牙芽細胞が不可逆的な変化を受けて、歯髄内に骨組織が惹起された。また、レーザー照射部位に近いほど歯髄の損傷や歯髄内硬組織形成の割合



図3 歯の再植後(左)と半導体レーザー照射後(右)の歯髄治癒パターンを示す図。両者とも歯髄腔内に骨組織形成が惹起される。矢印は歯根吸収、矢じりはアンキロシスを示す。

が大きくなることも分かり、適度な半導体レーザー照射が歯髄内に象牙質形成を誘導するのに対し、過度な出力により歯髄内に骨組織が誘導されることが明らかとなった(図3)。この結果は、歯髄中には象牙芽細胞系細胞と骨芽細胞系細胞が存在し、レーザー照射などの歯の損傷に対する抵抗性が両者で違うことを示唆していると言える。

5. 歯髄組織の多分化能

私たちの歯の移植実験においても興味深い知見が得られている⁹⁾。ネズミ(マウス)の歯を抜いて、歯冠部だけを軟組織に移植すると、歯髄内には象牙質に加え、骨形成が確認できた。興味深いことに、既存の象牙質に連続して象牙質が造られているが、象牙質から離れた部位では骨が形成されている。さらに、歯の再植後の歯髄治癒過程と同様に歯髄内における破骨細胞系細胞の出現が骨形成と関係があることも示された。また、既存の象牙質表面においても、この破骨細胞系細胞が出現すると骨組織が誘導される。この事実は象牙芽細胞の分化には、象牙質などの細胞外基質の足場が必要であると共に、局所の細胞間相互作用が硬組織形成に重要であることを示していると言えよう。歯の切削の場合は、局所で象牙芽細胞が死ぬと、そこに新しい象牙芽細胞が供給され修復象牙質形成が惹起される。一方、歯の再植の場合は、歯髄が広範な損傷を受けるために象牙芽細胞と骨芽細胞に分化する能力のある二つの細胞群のバランス、もしくは両者の分化をコントロールしているシグナルのバランスがくずれ、場合によっては歯髄が完全に骨に置換してしまう場合も起こりうると考えられる(図2, 3)。それに対して正常歯髄では、骨芽細胞への分化を抑制する何らかのメカニズムが働いているのかもしれない⁷⁾。さらに、ROSA26 トランスジェニックマウスを用いてこの骨形成細胞の由来を調べると、歯髄の中に骨芽細胞系細胞が存在することも明らかになっている(論文未発表データ)¹⁰⁾。

以上の様に、私たちが確立した歯の再植・移植および歯へのレーザー照射に関する動物実験データは歯髄の中には象牙芽細胞系細胞と骨芽細胞系細胞の二種類の細胞群が存在することを示してきたが、歯の損傷後の歯髄修復機構を考えるにあたって、局所に存在する歯髄細胞の由来や硬組織形成能について考慮する必要がある。すなわち、神経堤由来細胞が生き残り、象牙芽細胞が存在する環境が「歯としての identity」を維持した状態であり、これらの細胞が枯渇した場合には、歯髄内での他の細胞群(例えば中胚葉由来細胞)が優位になり、「歯としての identity」を失って骨組織を造ると考えられるのではなかろうか¹¹⁾。

6. おわりに

第48回歯科基礎医学会学会大会・総会サテライトシンポジウムでは、先に紹介した「発生学的見地から考える細胞分化の多能性と再生医学」に先立ち、「細胞分化と可塑性-組織再生」というテーマも取り上げられ¹²⁾、両者のシンポジストを交え総合討論の時間も設けられた。シンポジウムの成果の一部は先に述べたが(「2. Yang Chai 論文の衝撃」の後半部分)、討論時間では、歯髄組織の由来に関し活発な意見が交わされた。このシンポジウムを通し、歯髄幹細胞 dental pulp stem cells(注:歯髄に存在する体性幹細胞[組織幹細胞] adult stem cellsのこと)と神経堤由来細胞や中胚葉由来細胞との関連、歯髄幹細胞と骨髄幹細胞との異同、歯髄幹細胞の多分化能、歯髄内硬組織形成と神経との関係、歯乳頭における神経堤由来細胞と中胚葉由来細胞との比率とその分化能、歯乳頭細胞と歯小嚢細胞との関連、歯胚と神経・血管との関係など多角的な視点で歯髄という組織を捉える必要があることが認識できた。歯髄組織を形成する細胞の由来の解明は、歯髄反応の特殊性を解明する糸口になり、歯髄内硬組織形成に関わる細胞をキャラクタライズすることは、歯髄組織を用いた歯科再生医療の実現にも繋がる重要な問題であると考えられる。本シンポジウムでの成果をインテグレートすることは極めて重要であり、これらの成果を土台に、今後の益々の研究の進展が期待される。

- 1) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄修復過程と象牙質・歯髄複合体の生物学的特性. 新潟歯学会雑誌, 34: 165-177, 2004.
- 2) 原田英光, 野中和明: サテライトシンポジウム「発生学的見地から考える細胞分化の多能性と再生医学」, シンポジスト: 野中和明「Overview: ゴードン・リサーチコンファレンスの話題から歯髄研究の

- 展開について」; 大島勇人「外的刺激に対する歯髄反応の特殊性と再生」; 山崎英俊「神経堤細胞と歯の間葉細胞」; 井関祥子「哺乳類頭蓋顎顔面間葉の由来組織の局在」, 第48回歯科基礎医学会学術大会・総会, 鶴見, 2006. 9. 21-23, *J Oral Biosci*, 48 (Suppl): 84-86, 2006.
- 3) Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 13625-13630, 2000.
- 4) Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM: Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127: 1671-1679, 2000.
- 5) Yamazaki H, Tsuneto M, Yoshino M, Yamamura K, Hayashi S: Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells*, 2006 in press.
- 6) Goldberg M, Smith AJ: Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15: 13-27, 2004.
- 7) Tsukamoto-Tanaka H, Ikegame M, Takagi R, Harada H, Ohshima H: Histochemical and immunocytochemical study on hard tissue formation in dental pulp during the healing process after tooth replantation in rat molars. *Cell Tissue Res*, 325: 219-229, 2006.
- 8) Tate Y, Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M, Okiji T, Ohshima H: Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25-immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci*, 114, 50-57, 2006.
- 9) Ogawa R, Saito C, Jung HS, Ohshima H: Capacity of dental pulp differentiation after tooth transplantation. *Cell Tissue Res*, 326: 715-724, 2006.
- 10) 大島勇人, 高森泰彦, 石川裕子, 大島邦子, 監物新一, Han-Sung Jung: 歯髄には象牙芽細胞および骨芽細胞への分化能をもつ細胞群が存在する. 第48回歯科基礎医学会学術大会・総会, 鶴見, 2006. 9. 21-23, *J Oral Biosci*, 48 (Suppl): 117, 2006.
- 11) 大島勇人: 歯髄の創傷治癒を生物学的見地から考える. *日本歯内療法学会雑誌*, 26: 103-107, 2005.
- 12) 井出吉信, 佐藤哲二: サテライトシンポジウム「顎口腔領域の組織再生研究と今後の展望 第一部 細胞分化と可塑性 - 組織再生」, シンポジスト: 各務秀明「体性幹細胞の分化誘導と再生医療への応用」; 原田英光, 鍵谷忠慶, 藤原尚樹, 石関清人「組織幹細胞の多分化能から歯科再生医療を考える」; 阿部伸一, 井出吉信「筋の可塑性 - 骨格筋の肥大と再生」; 佐藤哲二「細胞分化と可塑性 - 歯髄幹細胞 - 」, 第48回歯科基礎医学会学術大会・総会, 鶴見, 2006. 9. 21-23, *J Oral Biosci*, 48 (Suppl): 82-84, 2006.