

学位研究紹介

マウス臼歯他家移植後の免疫細胞による GM-CSF およびオステオポンチンの発現は象牙芽細胞の分化に先立つ The Expression of GM-CSF and Osteopontin in Immunocompetent Cells Precedes the Odontoblast Differentiation Following Allogenic Tooth Transplantation in Mice

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

齋藤浩太郎

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

Kotaro Saito

研究指導者：大島勇人

【緒言】

歯の再植後の歯髄治癒過程において、術後の歯髄内には、骨と象牙質という2種類の硬組織が形成され得る¹⁾。この過程において、歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現すると象牙芽細胞分化が誘導され象牙質形成が起こる²⁾が、破骨細胞が歯髄腔内に出現すると骨芽細胞の分化が誘導される¹⁾ことが明らかになっており、歯髄再生の場の環境変化と細胞集団構成の変化が歯髄治癒過程を規定することが示唆される。しかし、歯の損傷後の免疫細胞の遊走や象牙芽細胞・骨芽細胞分化を調節している機構は不明である。また、歯の発生過程における象牙芽細胞の分化においては、内エナメル上皮の基底膜がシグナル分子のリザーバーとして重要な役割を担っているが、歯の損傷後の歯髄治癒過程では内エナメル上皮も基底膜も存在しないため、代替となる基質や細胞が象牙芽細胞分化に必要不可欠であると考えられる。さらに、歯の移植後の歯髄治癒過程を検索した我々の過去の研究では、既存の象牙質と第三象牙質との境界部には細胞外基質タンパク質の一つであるオステオポンチン (OPN) の沈着が認められることが明らかになっており³⁾、OPN が細胞外基質の足場としての機能を果たすことが示唆されている。一方、骨髄前駆細胞は顆粒球マクロファージ

ロニー刺激因子 (GM-CSF) の存在下では樹状細胞に分化することが知られている⁴⁾が、歯の損傷後の歯髄内における GM-CSF の発現に関する報告はないのが現状である。

【目的】

今回我々は、歯の損傷後の歯髄治癒過程における象牙芽細胞の分化機構を解明することを目的に、樹状細胞分化や象牙芽細胞分化に関わる GM-CSF タンパク質や OPN タンパク質・mRNA 発現と歯髄修復との関連を検索した⁵⁾。

【材料および方法】

深麻酔下で3週齢マウス上顎第一臼歯を抜去後、歯根を髄床底ごと切断し、歯冠部を舌下部へ移植し、術後1日から2週後に灌流固定し、EDTA 脱灰後にパラフィンおよび凍結切片を作製し、抗 OPN および抗 GM-CSF 免疫組織化学を光顕および電顕にて、象牙芽細胞の分化マーカーとしては nestin 免疫組織化学を光顕にて、また、*in situ* ハイブリダイゼーション法にて *Opn* 遺伝子発現を解析した。さらに、免疫細胞との関連を見るために、マクロファージと樹状細胞のマーカーである抗 class II MHC 抗体を用いた免疫染色を同時に行った。なお、無処置群の左側臼歯を対照群とした。

【結果および考察】

対照群では、GM-CSF は歯髄内にて陰性であり、OPN 陽性反応は髄角部の象牙細管内に観察されたが、*Opn* 遺伝子発現は歯髄内には認められなかった。術後1日では、歯髄内は主に炎症性細胞によって占められ、OPN 陽性反応がフィブリンネットワークや歯髄・象牙質界面に認められ、象牙細管内に突起を伸ばす細胞のあるものは GM-CSF 陽性反応を示していた。術後3日では、GM-CSF 陽性反応が象牙細管深くに認められ、また、既存の象牙質の石灰化前線が持続的な OPN 陽性反応を示し、歯髄・象牙質界面に GM-CSF 陽性反応を示す不規則な形態の細胞が現れ、象牙細管内に突起を伸ばしていた。術後5日では、既存の象牙質の石灰化前線が強い OPN 陽性反応を示し、上記の不規則な形態の細胞は歯髄・象牙質界面から消失していた。術後7日では、歯髄・象牙質界面に nestin 陽性の象牙芽細胞様細胞が配列し、

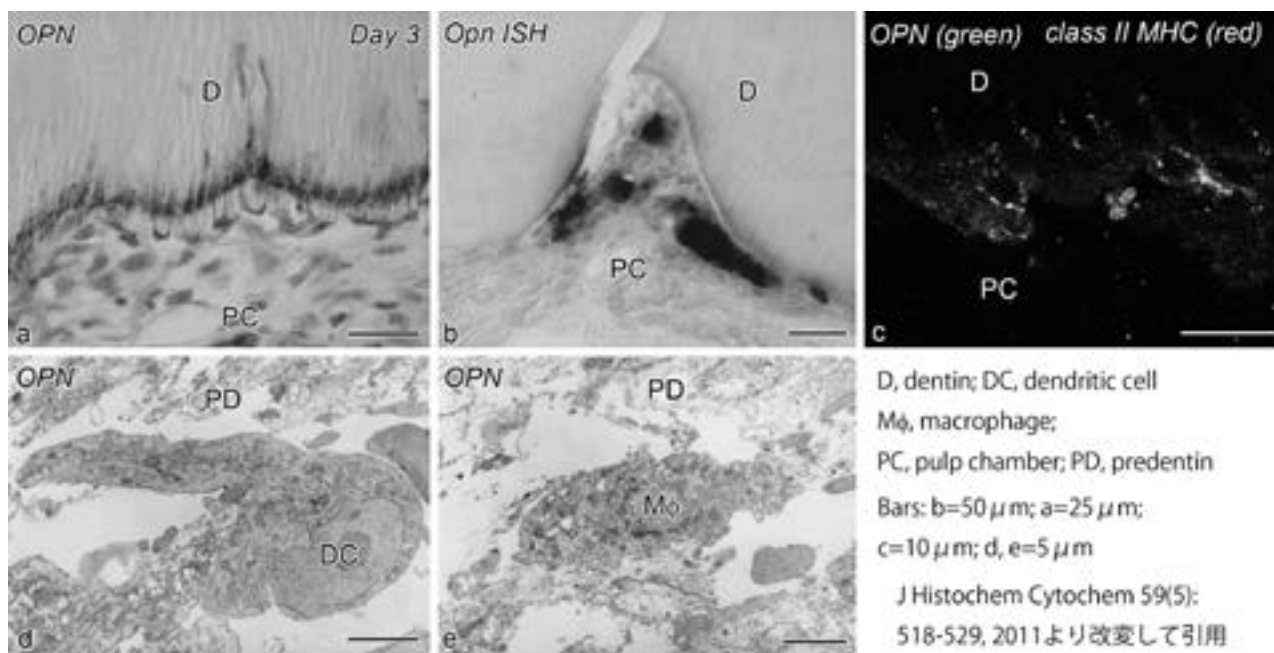


図1 歯冠部移植後3日における歯髄・象牙質界面の光学および電子顕微鏡写真

既存の象牙質に連続して第三象牙質の形成が認められ、その境界には、OPN陽性反応が認められた。一方、GM-CSF発現は象牙芽細胞様細胞の分化が開始すると消失し、象牙芽細胞様細胞の分化が見られない部位にはGM-CSF発現が持続した。術後14日では、既存の象牙質と術後に新たに形成された象牙質との境界にOPN陽性反応が認められた。加えて、歯髄内に骨組織が形成され、OPN陽性を示す骨芽細胞が骨基質を取り囲んでいた。また、術後3日における超薄切片標本では、歯髄・象牙質界面に配列した細胞がOPNおよびGM-CSF陽性反応を示し、あるものは象牙細管内に突起を伸ばしている像が認められた。これらの細胞を電子顕微鏡で観察すると、樹状細胞やマクロファージといった免疫細胞の形態学的特徴を呈していた。加えて、術後の*Opn* mRNAの発現を見てみると、術後3～7日で歯髄・象牙質界面の細胞に*Opn*の発現が認められた。さらにOPNとclass II MHCの免疫二重染色標本では、術後3日において、樹状形態を呈するclass II MHC陽性の細胞が歯髄・象牙質界面に現れ、OPN陽性反応を示していた。以上より、歯の移植後の歯髄治癒過程において、免疫細胞によるGM-CSFおよびOPNの分泌は、樹状細胞の成熟ならびに象牙芽細胞の分化に重要な役割を果たすことが示唆された。

【文 献】

- 1) Hasegawa T, Suzuki H, Yoshie H, Ohshima H: Influence of extended operation time and of occlusal force on determination of pulpal healing pattern in replanted mouse molars. *Cell Tissue Res*, 329: 259-272, 2007
- 2) Nakakura-Ohshima K, Watanabe J, Kenmotsu S, Ohshima H: Possible role of immunocompetent cells and the expression of heat shock protein-25 in the process of pulpal regeneration after tooth injury in rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 52: 581-591, 2003
- 3) Takamori Y, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Cai J, Cho SW, Jung HS, Ohshima H: Capacity of dental pulp differentiation in mouse molars as demonstrated by allogenic tooth transplantation. *J Histochem Cytochem*, 56: 1075-1086, 2008
- 4) Matsuo K, Ray N: Osteoclasts, mononuclear phagocytes, and c-Fos: new insight into osteoimmunology. *Keio J Med*, 53: 78-84, 2004
- 5) Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Kenmotsu S, Ohshima H: The expression of GM-CSF and osteopontin in immunocompetent cells precedes the odontoblast differentiation following allogenic tooth transplantation in mice. *J Histochem Cytochem*, 59: 518-529, 2011