

## 最近のトピックス

## BrdU ラベル歯髄細胞の発生過程における局在と歯の損傷後の再生能について

### Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries

<sup>1</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命福祉学講座  
口腔保健学分野

<sup>2</sup>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

石川裕子<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Division of Oral Science for Health Promotion, Department of Oral Health and Welfare, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

<sup>2</sup> 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  
Yuko Ishikawa<sup>1,2</sup>

#### 【はじめに】

象牙質・歯髄複合体は、う蝕、咬耗、磨耗、および窩洞形成などの歯科処置による歯の損傷に対して修復能をもち、第三象牙質を形成する。ラット臼歯における窩洞形成<sup>1)</sup>や歯の再植後<sup>2)</sup>には、急性炎症反応が起こると共に象牙芽細胞が損傷を受けることが知られている。損傷を受けた象牙芽細胞が死滅すると、歯髄間葉細胞が変性細胞に代わり象牙芽細胞様細胞に分化し、修復象牙質を形成する。これらの現象は、歯髄中に象牙芽細胞に分化する能力をもつ前駆細胞もしくは組織幹細胞、すなわち歯髄幹細胞が存在することを示唆している。これまでの研究では、永久歯や乳歯に歯髄幹細胞が存在すること、歯髄幹細胞が間葉系幹細胞マーカーであるSTRO-1やCD146を発現し、自己再生能と多分化能を有することが報告されている<sup>3,4)</sup>。

最近我々は、歯乳頭の細胞増殖が活発な胎生期（ラットでは、E17・E18）にBrdU（5-bromo-2'-deoxyuridine）を一定期間投与することにより歯髄幹細胞をラベルする「胎生期ラベリング法」を確立した<sup>5)</sup>。

幹細胞は①それ自身最終分化段階に達していない、②際限なく細胞分裂する、そして、③細胞分裂によって生じた娘細胞の一方は幹細胞として留まり、他方は一時的

増幅細胞になり活発な細胞増殖を経て分化する（非対称分裂）、という3つの特徴をもつ。BrdUは、DNAを構成するチミジンのアナログであり、細胞周期のS期にDNAに取り込まれる。胎生期ラベリング法では、幹細胞の非対称分裂をする時期にBrdUを腹腔内投与後一定期間放置することにより、核がラベルされない、もしくはラベルの薄まった一時的増幅細胞や分化細胞の中に、ゆっくりと細胞分裂し長期間ラベルされる、核が濃くラベルされた細胞（LRCs）が同定される。

本稿では、この胎生期ラベリング法を用いて、発生におけるLRCsの局在の経時的な変化と歯の再植や窩洞形成等の歯の損傷後のLRCsの分化能を明らかにした我々の研究成果<sup>5)</sup>を紹介する。

#### 【材料と方法】

妊娠Wistar系ラットに2～7日間BrdUを腹腔内投与した。仔ラットを生後1, 2, 4, 8, 14週後にアルデヒド系固定液で灌流固定、EDTA脱灰後、パラフィン切片を作製し、抗ネスチンおよび抗BrdU抗体を用いた免疫染色を行った。また、生後4週で右側上顎第1臼歯（M1）の再植を、14週で左側M1に窩洞形成を行い、術後1日～2週間後に固定した。なお、無処置側をコントロールとした。さらに、4週齢M1歯髄を摘出し、FACSにより幹細胞としての特徴をもつと考えられているside population（SP）細胞をソーティングし、SP細胞とLRCsとの関係を検索すると共に、STRO-1、CD146とLRCsとの関係については蛍光免疫二重染色を施した後、共焦点レーザー顕微鏡にて検索した。

#### 【結果と考察】

##### 1. ラット臼歯発生における歯髄幹細胞の局在

生後1週において、核が濃くラベルされた細胞（dense LRCs）が歯髄中に数多く存在したが、歯の発生の進行に伴い減少し、生後4週以降の成熟歯髄においても残存し、これまでの報告<sup>4)</sup>と同様に、歯髄中央部血管周囲に密に存在していた（図1-a）。一方、顆粒状にラベルされた細胞（granular LRCs）は生後14週まで次第に増加した。以上の結果より、dense LRCsは非対称分裂して幹細胞として留まった歯髄幹細胞であると考えられ、granular LRCsは一時的増幅細胞または前駆細胞であると考えられた。

FACS解析では、4週齢M1歯髄には0.76%未満の

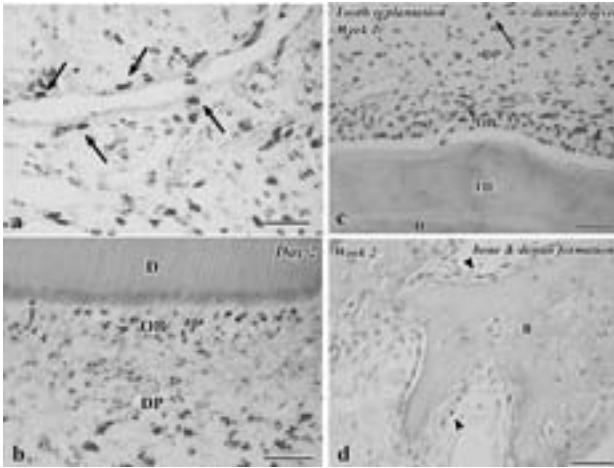


図1 胎生期 BrdU ラベルしたコントロール歯髄 (a) と窩洞形成後 (b) または歯の再植後 (c, d) の歯髄

a. 生後6週における BrdU ラベル歯髄細胞。核が濃くラベルされた細胞 (dense LRCs) が歯髄中央部血管周囲に存在している。b. 窩洞形成後2日。新しく分化した象牙芽細胞様細胞に、核が顆粒状にラベルされた細胞 (granular LRCs) がコミットされている。c, d. 再植後2週。象牙芽細胞様細胞には dense LRCs がコミットされているが (c)、骨芽細胞様細胞にはコミットされていない (d)。(Histochem Cell Biol 134: 227-241, 2010 より改変して引用)

SP細胞が存在することが明らかとなった。dense LRCs は SP 細胞分画に含まれるのに対して、non-SP 細胞分画には、ほとんど含まれていなかった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による検索によって、dense LRCs のあるものは間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 または CD146 を発現した。これらの結果は dense LRCs が歯髄幹細胞であることを示唆している。

## 2. 再植後における歯髄幹細胞の分化能(強い損傷モデル)

歯の再植後には少なくとも象牙質形成と骨組織形成の二つの治癒パターンが起こる<sup>2)</sup>が、dense LRCs は、ネスチン陽性の新しく分化した象牙芽細胞様細胞にコミットされていたが、骨芽細胞様細胞にはコミットされなかった(図1-c,d)。また、再植2週後には granular LRCs は歯髄中に認められなくなった。歯の再植後には、granular LRCs が死滅し、dense LRCs が象牙芽細胞様細胞にコミットされていることから、歯の再植後に象牙芽細胞や前駆細胞が死滅し、歯髄幹細胞が象牙芽細胞様細胞に分化したと考えられた。一方、骨芽細胞はラベルされた細胞と別の細胞群に由来していると考えられた。

## 3. 窩洞形成後における歯髄幹細胞の分化能(弱い損傷モデル)

窩洞形成後には、granular LRCs がネスチン陽性の新しく分化した象牙芽細胞様細胞にコミットされていた(図1-b)。窩洞形成後には、dense LRCs の数は実験終

了まで変化がないが、象牙芽細胞下層の granular LRCs が減少し、象牙細胞様細胞にコミットされていたことより、窩洞形成後に象牙芽細胞が損傷を受け、失われた象牙芽細胞層を補填するために前駆細胞が象牙芽細胞に分化したと考えられた。

## 【おわりに】

本稿では、胎生期ラベリング法を用いて、ラット臼歯発生過程における歯髄幹細胞の局在と歯の損傷後の分化能についての我々の研究成果<sup>5)</sup>を紹介した。我々の研究により、歯髄幹細胞が前駆細胞と協力して、歯の損傷程度によって異なる治癒モードを用いて外的刺激に対する歯髄反応を調整していることが明らかとなった。

今後の研究課題としては、*in vitro* や *ex vivo* 実験を用いて dense LRCs の細胞特性や分化能の更なる解析が必要であると思われる。

## 【参考文献】

- 1) Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H: Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol*, 130: 773-83, 2008.
- 2) Tsukamoto-Tanaka H, Ikegame M, Takagi R, Harada H, Ohshima H: Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation. *Cell Tissue Res*, 325: 219-29, 2006.
- 3) Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey P. G, Shi S: Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81: 531-35, 2002
- 4) Shi S, Gronthos S: Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone and Miner Res*, 18: 696-704, 2003.
- 5) Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Honda MJ, Ishii Y, Watanabe N, Ohshima H: Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. *Histochem Cell Biol*, 134: 227-41, 2010.