

論 文 要 旨

Gli1 陽性歯根膜細胞は抜歯窩治癒に関与する

令和4年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

藤井彩貴

【研究目的】

抜歯後の組織治癒過程において、骨芽細胞が出現し抜歯窩を骨に置換することが知られている。しかしながら、治癒の際に現れる骨芽細胞が歯根膜あるいは歯槽骨骨髄のどちらの幹細胞に由来するかは不明である。近年、Sonic hedgehog シグナルの下流因子である Gli1 を発現する細胞は、完成歯の歯根膜において幹細胞特性を示すことが明らかになった。また、マウス頭頂骨において、Gli1 陽性細胞は縫合部の骨膜に限局するが、骨欠損を作製すると Gli1 陽性細胞は増殖し、骨再生部の骨細胞に分化することが報告されている。そこで本研究では、Gli1 を指標として、Gli1 陽性歯根膜細胞の動態および分化機構を解き明かすことを目的とする。

【材料および方法】

タモキシフェンを投与すると Gli1 陽性細胞が Tomato 蛍光を発する Gli1-Cre^{ERT2};Rosa26-loxP-stop-loxP-tdTomato (iGli1/Tomato) マウスを用い、抜歯窩治癒過程における Gli1 陽性細胞の分化能を検討した。4 週齢 iGli1/Tomato マウスに 2 日間タモキシフェンを投与し、上顎第二臼歯を抜歯した。抜歯前および抜歯後 1, 3, 7 日に上顎骨を摘出し 4%パラホルムアルデヒドで化学固定した。試料は脱灰後にパラフィン包埋し、厚さ 4 μm の連続切片を作製した。また、一部の試料は -80°C で凍結包埋し、厚さ 5 μm の非脱灰凍結切片を作製した。作製したパラフィン切片では H-E 染色および免疫組織化学染色 (Osterix, Osteopontin, PCNA) を行った。非脱灰凍結切片では BMP4, Smad4, Runx2, Osterix, Periostin の蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて Gli1/Tomato 陽性細胞との局在を観察した。また、一部のマウスは抜歯後にカルセインを隔日投与し、新生骨を緑色にラベルした状態で同様に検討した。また、タモキシフェン投与により Gli1 陽性細胞が枯渇する Gli1-Cre^{ERT2}/Rosa26-loxP-stop-loxP-tdDTA (iGli1/DTA) マウスを作製し、Gli1 陽性細胞の非存在下における抜歯窩治癒を観察した。4 週齢 iGli1/Tomato マウスと iGli1/DTA マウスの上顎第二臼歯を抜歯し、抜歯窩における新生骨量を比較検討した。

【結果】

抜歯前の 4 週齢 iGli1/Tomato マウス歯根膜は Periostin 陽性であり、歯槽骨およびセメント質から離れた位置に Gli1/Tomato 陽性細胞が局在していた。一方、骨髄は Periostin

陰性であり，Gli1/Tomato 陽性細胞は認められなかった．抜歯 1 日後では，抜歯窩周囲の歯槽骨表面に Periostin 陽性の歯根膜様組織がみられた．また，抜歯窩中央部に好中球を含む炎症性細胞が多数認められた．Gli1/Tomato 陽性細胞は，歯根膜様組織の中でわずかに観察された．3 日後になると，抜歯窩において炎症性細胞はほとんど消失し，PCNA 陽性の増殖細胞が多数観察された．骨芽細胞分化マーカーである Osterix の陽性反応を示す細胞は，抜歯窩辺縁部で散在性に認められた．7 日後，抜歯窩にて既存の歯槽骨から離れた位置に Osteopontin 陽性の新生骨が島状に形成された．この新生骨表面には，多くの Osterix 陽性を示す骨芽細胞が配列していた．Gli1/Tomato 陽性細胞は抜歯窩内で多数認められ，その一部はカルセイン陽性の新生骨表面および内部に局在していた．これらの Gli1/Tomato 陽性細胞の一部は，BMP4, Smad4, Runx2, Osterix の陽性反応を示した．また，抜歯 7 日後における iGli1/Tomato マウスと iGli1/DTA マウスの新生骨量を比較したところ，iGli1/DTA マウスの骨量が有意に少ないことが明らかとなった．

【考察】

本研究において，抜歯後も残存する歯根膜様組織中に Gli1/Tomato 陽性細胞が認められ，抜歯後に増殖することが明らかになった．また，この Gli1 陽性細胞の子孫細胞の一部は BMP シグナル伝達の活性化を示す Smad4 を発現したことから，BMP シグナルを介して骨芽細胞系譜細胞へ分化したと考えられた．その後，Gli1/Tomato 陽性細胞は Runx2 ならびに Osterix 陽性の骨芽細胞へ分化し，既存の歯槽骨から離れた位置に新生骨を形成することが示された．一方，既存の歯槽骨の骨髄に Gli1/Tomato 陽性細胞はほとんど存在せず，抜歯後も増殖は認めなかった．さらに，iGli1/DTA マウスを用いて Gli1/Tomato 陽性細胞を枯渇させると，新生骨の形成量は減少した．以上の結果から，歯根膜に存在する Gli1 陽性細胞は抜歯後に増殖し，抜歯窩における新生骨形成に寄与することが明らかになった．また，その分化には少なくとも BMP シグナル伝達経路が関与することが示唆された．