博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏　　名　SUZUKI BARRERA KIYOKO NÉLIDA
学　　位　博 士（歯学）
学位記番号　新大院博（歯）第521号
学位授与の日付　令和4年9月20日
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
博士論文名　Role of osteopontin in the process of pulpal healing following tooth replantation in mice
（マウス歯の再植後の歯髄治癒過程におけるオステオポンチンの役割）

論文審査委員　主査　教 授　魚島 勝美
副査　教 授　大島 勇人
副査　教 授　野杁 由一郎

博士論文の要旨

歯髄は極めて高い修復・再生能力をもつ高度に特殊化した間葉組織である．生理的イベントや外傷の際に，象牙芽細胞による基質分泌活性とダイナミックな神経・血管応答間のクロストークが起こる．

歯の再植は，歯髄への神経支配と血管供給が遮断されるため，ほとんどの象牙芽細胞の死滅をきたす重篤な損傷である．再神経支配と血流の再開は多くの要因に影響され，その評価は歯髄の治癒と再生に関する知見を得るために重要である．

基質の石灰化と細胞接着の制御は，オステオポンチン（OPN）のような非コラーゲン性タンパク質の存在に関連している．窩洞形成後の修復象牙質を形成する際，OPN は，新たに分化する象牙芽細胞様細胞がⅠ型コラーゲンを分泌するのに必須である．

しかしながら，歯の再植などの重篤な損傷後における OPN の修復象牙質形成における役割や神経血管反応との相互作用は，未だ十分に解明されていない．本研究では、*Opn* ノックアウト（KO）マウスと野生型（WT）マウスを用い、歯の再植後の再神経支配、血流の再開、異なる歯根形成時期に着目して、修復象牙質形成過程における OPN の役割を明らかにすることを目的とする。

すべての動物実験は，ARRIVE ガイドラインおよび新潟大学実験動物倫理委員会の審査を受け新潟大学長の承認を得た実験計画（SA00780）に従って実施された。

2 週齢および 3 週齢の *Opn* KO および WT マウス（*Opn* KO 2W 群，*Opn* KO 3W 群，WT 2W 群，WT 3W 群）の上顎第一臼歯を再植し（n = 84），手術後 3～56 日後に固定を行った．μCT 解析後、脱灰した試料を Ki67，Nestin，PGP9.5，および CD31 免疫組織化学と *Col1a1* の *in situ* ハイブリダイゼーションに処理した．

本研究の結果は以下の通りである。

Opn KO 2W 群では歯髄治癒が得られたが、*Opn* KO 3W 群では得られなかった．

Opn KO 2W 群では，5 日後に対照歯と再植歯の近心根の長さに有意差が認められた．*Opn* KO 3W 群では，*Opn* KO 2W 群および WT 群と比較して第三象牙質領域が有意に減少し，*Opn* KO 3W 群では重篤な炎症反応が起こり，歯髄の治癒が阻害されることが明らかとなった．

Opn KO 2W 群では，WT 群に加え，新生象牙芽細胞様細胞分化と修復象牙質形成がみられた．

Opn KO 3W 群では，術後 7-14 日目に Nestin 陽性の新たに分化した象牙芽細胞様細胞の割合が有意に低く，修復象牙質形成が阻害された．一方，WT 群および *Opn* KO 2W 群では，Nestin 陽性の新生象牙芽細胞様細胞が修復象牙質下に配列していた。

Opn KO 2W 群では，再植後に歯髄内で細胞増殖が見られた．

Ki67 免疫染色による細胞増殖解析では、*Opn* KO 3W 群は、3 日後で *Opn* KO 2W 群および WT 2W 群、

5 日後で *Opn* KO 2W 群および WT 3W 群と比較して細胞増殖活性が有意に低下し，歯髄が正常に治癒しないことが確認された．
Opn KO 2W 群では、歯髄内に血流再開と再神経支配が確立された．
Opn KO 3W 群では，歯髄の血流再開と再神経支配が起こらず，歯髄治癒が阻害された．*Opn* KO 3W 群では，5 日後で WT 群，7 日後で WT 3W 群，14 日後で *Opn* KO 2W 群および WT 3W 群と比較して，血管の面積が有意に減少した．一方，*Opn* KO 2W 群では，歯髄内の血流再開と再神経支配が達成された．

過去の研究で，歯の再植の際の歯根の短縮は，再植歯の血流の再開を改善し，歯髄治癒を促進することが明らかになっている．また，虚血歯髄の治癒は再神経支配・血流の再開と無菌状態に依存する．*Opn* KO 2W 群と *Opn* KO 3W 群における結果の違いは，歯根長の違いと再植後に歯肉で被覆されているか否かの違いに起因していると考えられた．一方，過去の *Opn* KO マウスを用いた窩洞形成実験で修復象牙質形成が阻害されたのに対し，本研究の *Opn* KO 2W 群では修復象牙質形成は阻害されなかった．修復象牙質形成を担う幹細胞・前駆細胞が窩洞形成の様な局所の（弱い）歯の損傷モデルと歯の再植の様な広範な象牙芽細胞の死滅をきたす（重篤な）歯の損傷モデルで異なる可能性がある．歯の再植では，象牙芽細胞下層と歯髄中央部の幹細胞・前駆細胞が損傷を受け，根尖部歯髄の SCAP（stem cells derived from the apical papilla）と呼ばれる幹細胞が修復象牙質形成に重要な役割を果たすのかも知れない．歯の再植後の修復象牙質形成に関わる幹細胞・前駆細胞については更なる研究が必要である．
歯髄の治癒には再神経支配と血流再開の確立が重要な過程であるので，OPN は歯髄再生に重要な役割を果たす．本研究では，歯根形成が進んだ萌出歯において，歯髄が重篤な損傷を受けた後の修復象牙質形成に,OPN が適切な再神経支配と血流再開の確立に必須であることも明らかにした．したがって，本研究で得られた知見に基づき，OPN はヒトの外傷性脱臼歯に応用できる可能性がある。

審査結果の要旨

歯髄は極めて高い修復・再生能をもつ高度に特殊化した間葉組織である。歯は損傷を受けると、既存の象牙芽細胞もしくは新たに分化した象牙芽細胞様細胞によって第三象牙質が形成される。この過程で、象牙芽細胞もしくは象牙芽細胞様細胞と神経および血管とのダイナミックなクロストークが報告されている。しかしながら、外的侵襲後の歯髄内の第三象牙質形成、再神経支配、血行の回復を調節するメカニズムは十分に分かっていない。

本研究は、歯根形成ステージの異なる週齢のマウス（上顎第一臼歯が歯根形成初期の未萌出歯をもつ 2 週齢マウスと歯根形成が進行した萌出歯をもつ 3 週齢マウス）を用いた歯の再植動物実験モデルとオステオポンチン（*Opn*）遺伝子欠損（KO）マウスを組み合わせて、象牙芽細胞様細胞と神経および血管とのクロストークを解明すること、OPN に注目して、その役割を明らかにすることを目的としている。

歯の再植は重篤な歯の損傷モデルである。歯を抜去すると、根尖部で神経と血管が切断されるため、再植歯歯髄は一過性の神経の変性と血行障害が起こり、象牙芽細胞を含む歯冠部の歯髄細胞が変性するため、生き残った歯髄幹細胞もしくは前駆細胞が増殖し、新たな象牙芽細胞様細胞に分化し、修復象牙質を形成する。最近、歯の再植動物実験モデルで、歯根を 1/2～1/3 切除すると歯髄の血行が早期に回復し、歯髄の治癒が亢進することが報告されている。すなわち、歯の再植後の早期の血行回復が歯髄治癒に大きく影響を与える因子であることが示されているので、歯根形成ステージの異なる週齢のマウスを用いた歯の再植の研究方略は、血行の回復のタイミングの違いの影響を評価できる。また、限局したマイルドな損傷モデルである歯の切削後の歯髄治癒過程において、5～6 週齢の *Opn* KO マウスでは象牙芽細胞様細胞分化が起こるものの I 型コラーゲン形成が阻害され、OPN が象牙芽細胞様細胞の機能発現に必須の因子であることが報告されており、重篤な損傷モデルである歯の再植実験における OPN の機能については解明が待たれる課題であった。

本研究で、3 週齢 *Opn* KO 群では、2 週齢 *Opn* KO 群・野生型群に比べて有意に象牙芽細胞分化

が抑制され、修復象牙質が形成されないことが明らかになった。すなわち歯根形成が進んだ再植歯では、OPN 欠損が象牙芽細胞様細胞分化を阻害することが明らかになった。しかしながら、2 週齢 *Opn* KO 群では、野生型群同様に象牙芽細胞様細胞分化と修復象牙質形成が起こった。この結果は、2 週齢 *Opn* KO マウスを用いた再植と 5～6 週齢 *Opn* KO マウスを用いた歯の切削では、修復象牙質形成に関わる象牙芽細胞様細胞の由来が異なる可能性が示唆される。歯髄幹細胞／前駆細胞は象牙芽細胞下層および歯髄中央部血管周囲に存在すると考えられている。また、歯根形成中の根尖歯髄には SCAP と呼ばれる幹細胞の存在も報告されている。一方、歯の切削後に新たに分化する象牙芽細胞様細胞は象牙芽細胞下層及び歯髄中央部の幹細胞／前駆細胞由来であることが示唆されており、歯の再植後には歯冠部のほとんどの歯髄細胞がアポトーシスを起こすことから、著者らは、歯の再植時に新たに分化する象牙芽細胞様細胞が SCAP に由来する可能性を考察している。すなわち、SCAP 由来の象牙芽細胞様細胞は OPN が欠損していてもその機能発現（Ⅰ型コラーゲンの分泌）には影響しないことを示唆することになり、歯髄の中に異なる特徴をもつ幹細胞／前駆細胞が存在する可能性を示している。幹細胞／前駆細胞の動態については、更なる研究による検証が必要である。

3 週齢 *Opn* KO 群で、再神経支配と血行の回復が阻害される事実も興味深い。OPN は損傷後組織再生時の血管新生に重要な役割を演じ、血行の回復は再神経支配に先立って起こる事象であり、OPN がシュワン細胞を介して再神経支配にもポジティブに働くことが報告されているので、歯の再植後においても、歯根形成が進行した 3 週齢 *Opn* KO 群では、OPN が血行の回復と再神経支配に必須であることが示している。

以上、本研究結果は、歯根形成が進行した萌出歯では、OPN が歯の再植の様な重篤な損傷後の再神経支配と血行の回復を促進し、象牙芽細胞様細胞分化と修復象牙質形成に必須の因子であることを明らかにしており、歯髄生物学研究への貢献度が極めて高いので、学位論文としての価値を認める。