

# 歯髓組織幹細胞の探索と歯髓修復機構の解明

(課題番号16390523)

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成19年5月

新潟大学附属図書館



2080002577

研究代表者 大 島 勇 人  
(新潟大学医歯学系教授)

## はしがき

歯は、古くから、他の臓器とは異なり、人工物と生体の共存の観点から研究が進められてきた。より生体親和性の高い修復材料や歯髄治癒を促す薬剤に関する研究が中心になり、歯髄反応を細胞生物学的な観点から捉えた研究が殆どないのが現状である。本来、我々のからだは、外傷や切歯などの物理的損傷に対しての治癒能力を備えており、その傷を受けた場所に応じて修復し、元通りに再生する。この様な再生現象において、細胞が作り出されるかなめの部分には組織幹細胞が存在する。歯科領域においても、歯の切削や再植・移植等の歯の損傷に対して、歯髄は再生能力を有しており、象牙芽細胞が変性を来たしても、成功例では新たな象牙芽細胞が分化し象牙質基質が分泌されることが知られている。しかしながら、その成否を規定するメカニズムは明らかになっていない。

我々は、これまで歯の損傷後の歯髄治癒過程を検索してきたが、このような歯髄治癒過程において、象牙芽細胞に高濃度に発現しているストレスタンパク質 heat-shock protein (HSP)-25 や、生体の防御機能に関わる免疫担当細胞が重要な役割を果たす事を明らかにしてきた。しかしながら、上皮細胞が存在しない系での歯髄治癒過程における成長因子やサイトカインの役割、歯髄の組織幹細胞の局在や動態について、十分に解っていないのが現状である。

本研究の目的は、ネズミ切歯・臼歯の発生過程および歯の切削・再植・移植後の歯髄修復過程に着目し、分裂細胞をラベルするブロデオキシウリジン(BrdU)や分裂細胞のマーカーKi67を用いて、発生過程および歯の損傷後の歯髄治癒過程における細胞のダイナミクスを検索すると共に、歯髄組織幹細胞を探索し、歯髄修復機構を解明することにある。

歯の損傷モデルにおける歯髄組織幹細胞の象牙芽細胞への分化機構が明らかになれば、成長

因子が効果的に作用する足場からなる修復材料を応用して、局所で働く成長因子やサイトカイン発現を人為的に増幅することにより、歯髄修復をコントロールする歯科再生治療の可能性が考えられる。また、歯髄には骨様組織形成に関わる間葉系幹細胞の存在も示唆されており、骨髄と同様に多能性のある組織幹細胞が存在する可能性が高い。歯髄組織幹細胞の本態が解明されれば、様々な組織の再生医療の生体材料として利用できることが期待される。

分裂細胞をラベルするマーカーである BrdU を歯の発生過程や歯の損傷後の治癒過程に投与すると、細胞の分裂・増殖のパターンを観察することが可能となる。すなわち、一度分裂するとほとんど分裂活性を失う細胞群と、盛んに分裂し続ける細胞群を染め分ける事が可能となる。前者は組織幹細胞に相当する細胞で、細胞が分裂するとその娘細胞は幹細胞として自己複製される。一方後者は分化細胞として組織の修復に寄与する。歯の発生過程や、我々が確立しているネズミの歯を用いた窩洞形成や歯の再植・移植実験後の歯髄治癒過程に細胞増殖活性の検索や BrdU などを用いたラベリング追跡実験を行い、象牙芽細胞の分化マーカーである HSP-25 発現と比較することにより、歯髄の組織幹細胞の本態が解明されることが予想される。

BrdU などを用いたラベリング追跡実験を、歯髄組織幹細胞の検索に応用している研究者は殆どいないのが現状であり、歯の損傷後の歯髄修復過程における成長因子に関する研究は象牙質基質に存在する TGFβ スーパーファミリーの関与についての報告があるだけで、局所での炎症性細胞や歯髄組織幹細胞との関与は殆ど分かっていない。また、ネズミなどの小動物を用いた窩洞形成や歯の再植・移植後の歯髄修復過程を細胞レベルでシステムティックに検索している研究グループは、我々を除いて殆どいないのが現状である。

## 研究組織

研究代表者: 大 島 勇 人	(新潟大学 医歯学系 教授)
研究分担者: 大 島 邦 子	(新潟大学 医歯学総合病院 講師)
研究分担者: 鈴 木 啓 展	(新潟大学 医歯学系 助手)
研究分担者: 原 田 英 光	(岩手医科大学 歯学部 教授)
研究協力者: Han-Sung Jung	(延世大学校 歯科大学 助教授)
研究協力者: 監 物 新 一	(新潟大学 歯学部 技術専門職員)

## 交付決定額(配分額)

(金額単位: 千円)

	直 接 経 費	間 接 経 費	合 計
平成16年度	8, 500	0	8, 500
平成17年度	2, 700	0	2, 700
平成18年度	2, 000	0	2, 000
総 計	13, 200	0	13, 200

## 研究発表

### 1. 学会誌等

#### (1) 総説

- 1) Harada H, Ohshima H: New perspectives on tooth development and dental stem cell niche. Arch Histol Cytol 67(1): 1-11, 2004.
- 2) 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(2): 1-13, 2004.
- 3) 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(2): 103-107, 2005.
- 4) 原田英光: 歯と歯周組織再生に向けた上皮-間葉相互作用の人工的細胞構築. 日本再生医療学会雑誌 4: 63-68, 2005.
- 5) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄修復機構. 歯科臨床研究 4(1): 49-57, 2007.

## (2) 原著

- 1) Suzuki T, Nomura S, Maeda T, **Ohshima H**: An immunocytochemical study of pulpal responses to cavity preparation by laser ablation in rat molars by using antibodies to heat shock protein (Hsp) 25 and class II MHC antigen. *Cell Tissue Res* 315(3): 311-319, 2004.
- 2) Asawa Y, Aoki K, Ohya K, **Ohshima H**, Takano Y: Appearance of electron-dense segments: indication of possible conformational changes of pre-mineralizing collagen fibrils in the osteoid of rat bones. *J Electron Microsc* 53(4): 423-433, 2004.
- 3) **Suzuki H**, Amizuka N, Kii I, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Suzuki A, Yoshie H, Kudo A, Maeda T: Immunohistochemical localization of periostin in tooth and its surrounding tissues in mouse mandibles during development. *Anat Rec*, 281A(2):1264-1275, 2004.
- 4) **Ohshima H**, Nakasone N, Hashimoto E, Sakai H, **Nakakura-Ohshima K**, **Harada H**: The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch Oral Biol* 50(2): 153-157, 2005.
- 5) Masuyama T, Miyajima K, **Ohshima H**, Osawa M, Yokoi N, Oikawa T, Taniguchi K: A novel autosomal recessive mutation *whitish chalk-like teeth* (*wclt*) resembling amelogenesis imperfecta maps to rat chromosome 14 corresponding to human 4q21. *Eur J Oral Sci* 113(6): 451-456, 2005.
- 6) **Suzuki H**, Amizuka N, Oda K, Li M, Yoshie H, **Ohshima H**, Noda M, Maeda T: Histological evidences on altered distribution of osteocytes and bone matrix synthesis in *klotho*-deficient mice. *Arch Histol Cytol* 68(5): 371-381, 2005.
- 7) **Harada H**: Cell dynamics in the growth and differentiation of dental epithelium during tooth development: the lineage of stratum intermedium. *J Hard Tissue Biol* 14(2): 172-173, 2005.
- 8) **Ohshima H**: Cell dynamics in the process of pulpal healing following tooth injuries. *J Hard Tissue Biol* 14(2): 174-175, 2005.
- 9) Okuda K, Tai H, Tanabe K, **Suzuki H**, Sato T, Kawase T, Saito Y, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *J Periodontol*, 76(6): 890-898, 2005.
- 10) Kawase T, Okuda K, Saito, Y, Amizuka N, **Suzuki H**, Yoshie H: Platelet-rich plasma (PRP) provides nucleus for mineralization in cultures of partially differentiated periodontal ligament cells. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, 41(5): 171-176, 2005.
- 11) Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, **Harada H**, Noguchi T, Toyoda M, Sato S, Teranaka S: Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Mineral Res* 20(1): 50-57, 2005.
- 12) Morotomi T, Kawano S, Toyono T, Kitamura C, Terashita M, Uchida T, Toyoshima K, **Harada H**: In vitro differentiation of dental epithelial progenitor cells through epithelial-mesenchymal interactions. *Arch Oral Biol* 50(8): 695-705, 2005.

- 13) 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(1): 50-57, 2006.
- 14) **Harada H**, Ichimori Y, Yokohama-Tamaki T, **Ohshima H**, Kawano S, Katsube K, Wakisaka S: Stratum intermedium lineage diverges from ameloblast lineage via Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 340(2): 611-616, 2006.
- 15) Yokohama-Tamaki T, **Ohshima H**, Fujiwara N, Takada Y, Ichimori Y, Wakisaka S, Ohuchi H, **Harada H**: Cessation of Fgf-10 signaling leads to the transition from crown to root formation due to a defective dental epithelial stem cell compartment. *Development* 133(7): 1359-1366, 2006.
- 16) Kajiya H, Ito M, **Ohshima H**, Kenmotsu S, Ries W, Benjamin I, Reddy S: RANK ligand expression in Heat shock factor-2 deficient mouse marrow stromal/preosteoblast cells. *J Cell Biochem* 97(6): 1362-1369, 2006.
- 17) Nakasone N, Yoshie H, **Ohshima H**: An immunohistochemical study of the expression of heat-shock protein-25 and cell proliferation in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in rat molars. *Arch Oral Biol* 51(5): 378-386, 2006.
- 18) 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(2): 219-229, 2006.
- 19) Kim JY, Cha YG, Cho SW, Kim EJ, Lee MJ, Lee JM, Cai J, **Ohshima H**, Jung HS: Inhibition of apoptosis alters tooth shape and size: implications for macrodontia. *J Dent Res* 85(6): 530-535, 2006.
- 20) Kim E, Cho SW, Yang JY, Cai JL, Lee SJ, **Ohshima H**, Jung HS: Tooth survival and periodontal tissues healing of allo-transplanted teeth in the mice. *Oral Diseases* 12(4): 395-401, 2006.
- 21) Nakasone N, Yoshie H, **Ohshima H**: The relationship between the termination of cell proliferation and expression of heat-shock protein-25 in the rat developing tooth germ. *Eur J Oral Sci* 114(4): 302-309, 2006.
- 22) Kawagishi E, **Nakakura-Ohshima K**, Nomura S, **Ohshima H**: Pulpal responses to cavity preparation in aged rat molars. *Cell Tissue Res* 326(1): 111-122, 2006.
- 23) Ogawa R, Saito C, Jung HS, **Ohshima H**: Capacity of dental pulp differentiation after tooth transplantation. *Cell Tissue Res* 326(3): 715-724, 2006.
- 24) **Suzuki H**, Amizuka N, Noda M, Amano O, Maeda T: Histological and immunohistochemical changes in the submandibular gland in klotho-deficient mice. *Arch Histol Cytol* 69(2): 119-128, 2006.
- 25) Xu L, **Harada H**, Yokohama-Tamaki T, Matsumoto S, Tanaka J, Taniguchi A: Reuptake of extracellular amelogenin by dental epithelial cells results in increased levels of amelogenin mRNA through enhanced mRNA stabilization. *J Biol Chem* 281(4): 2257-2262, 2006.
- 26) Iwatsuki S, Honda MJ, **Harada H**, Ueda M: Cell proliferation in teeth reconstructed from dispersed cells of embryonic tooth germs in a three-dimensional scaffold. *Eur J Oral Sci* 114(4): 1-9, 2006.

- 27) Xu L, **Harada H**, Taniguchi A: The exon 6ABC region of amelogenin mRNA contribute to increased levels of amelogenin mRNA through amelogenin protein-enhanced mRNA stabilization. *J Biol Chem* 281(43): 32439-32444, 2006.
- 28) Ishizeki K, Kagiya T, Fujiwara N, **Harada H**: In vitro adipocytic conversion in Meckel's chondrocytes in response to a fatty acid-containing medium. *Arch Histol Cytol* 69(3): 163-171, 2006.
- 29) 鈴木啓展, 金子進, 佐藤隆, 熊西敏郎, 竹内幸美, 吉江弘正: 骨粗鬆症を伴う要介護高齢者に対するアレンドロネート長期投与による歯周組織変化. *日本歯科保存学会誌* 49 (3): 448-457, 2006.
- 30) Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, Tsubakimoto T, **Harada H**, Eto K, Noguchi T, Teranaka T: Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res* 327(2): 301-11, 2007.
- 31) Cho KW, Cho SW, Oh CO, Ryu YK, **Ohshima H**, Jung HS: The effect of cortical activation on orthodontic tooth movement. *Oral Diseases* 13(3): 314-319, 2007.
- 32) Cho SW, Lee HA, Cai J, Lee MJ, **Ohshima H**, Jung HS: The primary enamel knot determines the position of the first buccal cusp in developing mice molars. *Differentiation* 2007 in press.
- 33) 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* 2007 in press.

### (3) その他

- 1) 大島勇人: 歯の発生研究の展望と歯の幹細胞ニッチェ: 常生歯形成端を示す新用語apical budの提唱, 「最近のトピックス」, *新潟歯学会雑誌* 34(1): 53-55, 2004.
- 2) 大島勇人: My Cell 象牙づくりの職人 象牙芽細胞の生涯に迫る. *ミクروسコピア* 21(3): 182-189, 2004.
- 3) 大島勇人: 歯の再植後の歯髄治癒過程からみる象牙質・歯髄複合体の生物学的特性. *日本歯科評論* 64(10): 93-100, 2004.
- 4) 原田英光: 歯科の再生医療. *日本皮膚科学会生涯教育研修講習会テキスト*, 日本皮膚科学会生涯教育刊 p. 1-8, 2005.
- 5) 原田英光: 歯と歯周組織再生に向けた組織幹細胞研究とその展開. *第50回日本顕微鏡学会シンポジウム抄録集* 2006.
- 6) 鈴木啓展, 大島勇人, 織田公光, 李 敏啓, 網塚憲生, 吉江弘正, 野田政樹, 前田健康, 小澤英浩: Klotho遺伝子欠損が骨の細胞および骨基質に及ぼす影響. *The Bone* 20(4): 395-399, 2006.
- 7) 大島勇人: 最近のトピックス: 歯髄細胞の由来に関する最近の知見. *新潟歯学会雑誌* 36(2): 249-253, 2006.
- 8) 大島勇人: ビデオ・オン・デマンド教材を用いた効果的な学習方略の開発. *大学教育研究年報第12号* (新潟大学教育開発研究センター) 2007 in press.

## 2. 口頭発表

## (1) 国際学会発表

- 1) **Ohshima H**, Nakasone N, Hashimoto E, **Nakakura-Ohshima K**, **Harada H**: The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. VIIIth International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, York, UK, 2004. 7. 17-21 Abstract p. 99, 2004.
- 2) **Harada H**, Yokohama T, Takada Y, Ichimori Y, Wakisaka S, Ohuchi H, **Ohshima H**: Fgf10 is a regulatory factor for transition from crown to root formation in tooth development. VIIIth International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, York, UK, 2004. 7. 17-21 Abstract p. 33, 2004.
- 3) Nakasone N, Yoshie H, **Ohshima H**: Relationship between the expression of heat shock protein-25 in the dental epithelial and mesenchymal cells and their proliferation and differentiation during odontogenesis in rat molars. VIIIth International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, York, UK, 2004. 7. 17-21 Abstract p. 95, 2004.
- 4) Tsukamoto-Tanaka H, Ikegame M, Takagi R, **Ohshima H**: Hard tissue formation in the dental pulp during the regeneration process after tooth replantation in rat molars. VIIIth International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, York, UK, 2004. 7. 17-21 Abstract p. 119, 2004.
- 5) Ruspita I, Horiguchi T, Miyoshi K, Ueno A, **Harada H**, Noma T: Regulation of gene expression in dental epithelial cells. VIIIth International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, York, UK, 2004. 7. 17-21.
- 6) Miyoshi K, Horiguchi T, Ueno A, Nagata H, Baba Y, **Harada H**, Noma T: Effects of BMP2 on gene expression in dental epithelial cell line. VIIIth International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, York, UK, 2004. 7. 17-21.
- 7) Yokoi T, Saito M, Kiyono T, **Harada H**, Tsubakimoto T, Nishida E, Noguchi T, Teranaka T: Immortalization and characterization of mice dental follicle cells exhibiting tendon cell-like property in vitro. VIIIth International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, York, UK, 2004. 7. 17-21.
- 8) Morotomi Y, Kitamura C, Terashita M, **Harada H**: In vitro differentiation of enamel epithelial progenitor cells through epithelial-mesenchymal interactions. VIIIth International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, York, UK, 2004. 7. 17-21.
- 9) Tsukamoto-Tanaka H, Ikegame M, Takagi R, **Ohshima H**: Immunocytochemical and histochemical study of hard tissue formation in the dental pulp after tooth replantation in rat molars. 16th International Congress of the IFAA and 109th Annual Meeting of Japanese Association of Anatomists, Kyoto, Japan, 2004. 8. 22-27, 2004 Anat Sci Int 79(Suppl): 362, 2004.
- 10) Kajiya H, Ito M, **Ohshima H**, Kenmotsu S, Benjamin IJ, Ries WL, Reddy SV: Characterization of stromal/preosteoblast cells from heat shock factor-2 (HSF-2) null mice. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Seattle, USA, 2004. 10. 1-5.

- 11) Ida-Yonemochi H, Satokara I, **Ohshima H**, Yamada Y, Saku T: Perlecan regulates the enamel organ morphogenesis. 83th General Session and Exhibition of IADR, Maryland, 2005. 3. 9-12, J Dent Res 2005.
- 12) Iwatsuki S, Honda M, **Harada H**, Ueda M: Tissue Engineered Tooth from Mouse Tooth Bud Cells. 83th IADR (Baltimore, USA), 3. 19-22, 2005.
- 13) **Suzuki H**, Amizuka N, Noda M, **Ohshima H**, Maeda T: The mineralization of the bone matrix and the elemental mapping of calcium, phosphorus, and magnesium in the klotho mouse, ASBMR 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA, 2005. 9. 23-27, Abstract S p. 195.
- 14) **Harada H**: Cessation of Fgf-10 signaling leads to the transition from crown to root formation due to a defective dental epithelial stem cell compartment. Gordon Research Conference (Ventura, USA), 2006, 1. 22-27.
- 15) Taniguchi, A., Xu, L., **Harada, H**: Reuptake of Extracellular Amelogenin by Dental Epithelial Cells. 84th General Session and Exhibition of IADR, Brisbane, Australia, 2006. 6. 28-7. 1.
- 16) Yamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Yuasa K, **Harada H**, Fujiwara T, Fukumoto S: Neurotrophic Signaling is Regulated by Glycosphingolipids in Dental Epithelial Cells. 84th General Session and Exhibition of IADR, Brisbane, Australia, 2006. 6. 28-7. 1.
- 17) **Harada H**, Ichimori Y, Tamaki-Yokohama T, **Ohshima H**, Katsube KI, Wakisaka S: Notch signaling regulates development of stratum intermedium in tooth germs. 84th General Session and Exhibition of IADR, Brisbane, Australia, 2006. 6. 28-7. 1, J Dent Res 85(Special Issue B): #0802, 2006.
- 18) **Ohshima H**, Ogawa R, Takamori Y, Saito C, **Nakakura-Ohshima K**, Cho SW, Jung HS: Capacity of Dental Pulp Differentiation after Tooth Transplantation. 84th General Session and Exhibition of IADR, Brisbane, Australia, 2006. 6. 28-7. 1, J Dent Res 85(Special Issue B): #2033, 2006.
- 19) Ali MN, Ejiri S, Kobayashi T, Oda K, **Ohshima H**, Saito C: Rat mandibular distraction osteogenesis: 3D micro CT evaluation and histological analysis. 7th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Hong Kong, 2006. 11 5-9.
- 20) Hasegawa T, **Suzuki H**, Yoshie H, **Ohshima H**: Factors to determine the different healing patterns in replanted teeth. 85th General Session and Exhibition of IADR, New Orleans, Louisiana, 2007. 3. 21-24, J Dent Res 86(Special Issue A): #0542, 2007.

## (2) シンポジウム・特別講演

- 1) 大島勇人: 一幼若永久歯の歯内療法—歯髓の創傷治癒を生物学的見地から考える。昭和歯学会後援セミナー, 東京, 2004. 4. 23, 昭和歯学会雑誌 24(3): 358, 2004.
- 2) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髓修復機構から歯の再生研究へ。神奈川歯科大学研究談話会, 2004. 5. 21.
- 3) 大島勇人: シンポジウム「幼若永久歯の歯内療法」歯髓の創傷治癒を生物学的見地から考える。第25回日本歯内療法学会学術大会, 新潟, 2004. 7. 11, 日本歯内療法学会学術大会プログラム抄録集 p. 29-30, 2004.



- 4) 原田英光: 歯の発生におけるFGF10の役割. 第46回歯科基礎医学会サテライトシンポジウム, 広島, 2004. 9. 23-25.
- 5) 大島勇人: 電子顕微鏡で解き明かす象牙芽細胞の生涯. 日本大学松戸歯学部電顕講習会, 松戸, 2004. 10. 15.
- 6) 原田英光: 歯の発生と再生研究のための基礎的技術から最新テクニックまで. 硬組織再生生物学会, 北九州, 2004. 10. 23.
- 7) 中村典史, 川野真太郎, 光安岳志, 原田英光: エナメル上皮腫の組織化学. 第45回日本組織細胞化学会総会・ワークショップ「硬組織の組織化学」, 鹿児島, 2004. 10. 30.
- 8) Ohshima, H: Dentin-pulp complex: development, structure, and function, Special lecture for the students in College of Dentistry, Yonsei University (延世大学校歯科大学), Seoul, Korea, 2004. 11. 1.
- 9) Ohshima, H: Consideration of the repair responses of dental pulp after tooth injury from a biological point of view, Special lecture for the graduate students in College of Dentistry, Yonsei University (延世大学校歯科大学), Seoul, Korea, 2004. 11. 2.
- 10) 原田英光: 歯と歯周組織の再生に向けた上皮-間葉相互作用の人工的細胞構築. 第3回日本再生医療学会, 幕張, 2004.
- 11) 原田英光: 組織幹細胞と歯周組織再生. 近畿化学協会バイオ部会定例セミナー, 大阪, 2004.
- 12) 原田英光: 歯の再生医療の現状と今後の展望. 九州歯科大学広島支部同窓会, 広島, 2005. 1. 22.
- 13) 大島勇人: 歯の再植後の歯髄治癒過程からみる象牙質・歯髄複合体の生物学的特性. 北海道大学歯学部歯学研究セミナー, 2005. 2. 4.
- 14) 大島勇人: 象牙質・歯髄複合体研究の進展と再生医療への生物学的基盤, 平成17年度新潟大学歯学部同窓会・総会学術講演, 新潟, 2005. 4. 16.
- 15) 原田英光: 歯科の再生医療, 第104回日本皮膚科学会総会 研修講習会, 横浜, 2005. 4. 23.
- 16) 原田英光: 歯の再生医療の現状と展望. 九州歯科大学兵庫支部同窓会, 神戸, 2005. 5. 14.
- 17) 原田英光: 歯の発生と再生研究から歯科再生医療の明日を考える. 九州歯科大学島根支部同窓会, 神戸, 2005. 6. 17.
- 18) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄修復機構から見てきた歯髄の生物学的特性. 東京医科歯科大学大学院特別セミナー, 東京, 2005. 7. 1.
- 19) Ohshima H: Cope-Osborn's Tritubercular Theory, Special lecture for the graduate students in College of Dentistry, Yonsei University (延世大学校歯科大学), Seoul, Korea, 2005. 8. 6.
- 20) Ohshima H: Cell dynamics in the process of pulpal healing following tooth injuries. Symposium B9: Cell dynamics of tooth formation and regeneration. International Symposium of Maxillofacial & Oral Regeneration Biology in OKAYAMA 2005, Okayama, Japan, 2005. 9. 17-20 Program & Abstracts p.180, 2005.

- 21) **Harada H:** Cell dynamics in the growth and differentiation of dental epithelium during tooth development: the lineage of stratum intermedium. Symposium B9: Cell dynamics of tooth formation and regeneration, International Symposium of Maxillofacial & Oral Regeneration Biology in OKAYAMA 2005, Okayama, Japan, 2005. 9. 17-20.
- 22) 大島勇人: 電子顕微鏡で解き明かす歯髄の生物学的特性. 日本大学松戸歯学部電顕講習会, 松戸, 2005. 10. 21.
- 23) 原田英光: 歯と歯周組織再生に向けた組織幹細胞研究とその展開. 日本顕微鏡学会第50回シンポジウム「再生医学」, 福岡, 2005. 11. 1-2.
- 24) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄治癒過程における細胞のダイナミクス. 北海道大学歯学部歯学研究セミナー, 2005. 11. 25.
- 25) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄修復メカニズムと歯髄の再生能力, 長岡歯科医師会「新友会」講演会, 長岡, 2005. 12. 8.
- 26) 原田英光: 歯の幹細胞の維持機構の解明から歯の再生への展開. 第111回日本解剖学会総会シンポジウム, 相模原, 2006. 3. 29-31.
- 27) 原田英光: 歯の再生医療の現状と展望. 日本歯科大学歯学会エキスパートセミナー, 新潟, 2006. 4. 7.
- 28) 原田英光: 歯の再生医療の現状と展望. 九州歯科大学泉友会支部同窓会, 北九州, 2006. 4. 21.
- 29) 大島勇人: 歯髄反応を生物学的に考える. 第5回LSTR療法学会2006年度学術大会特別講演, 東京, 2006. 9. 17, LSTR療法学会雑誌 2007 in press.
- 30) 大島勇人: 外的刺激に対する歯髄反応の特殊性と再生. 第48回歯科基礎医学会学術大会・総会, 原田英光, 野中 and 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」, 鶴見, 2006. 9. 21-23, J Oral Biosci 48(Suppl): 85, 2006.
- 31) 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学を考える. 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」, 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): 83, 2006.
- 32) 原田英光: 歯と歯周組織の再生医療開発に向けた取り組みと今後の展望. 九州歯科大学大阪支部同窓会, 大阪, 2006. 9. 30.
- 33) 原田英光: 再生医学研究の紆余曲折と新天地盛岡は. 九州大学歯科口腔外科同門会, 福岡, 2006. 11. 3.
- 34) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄修復機構と再生研究への展開. 岩手医科大学歯学会第32回総会, 原田英光: 再生研究の最前線, 盛岡, 2006. 12. 2, 岩手医科大学歯学会プログラム・抄録集 p. 6, 2006.
- 35) **Harada H:** Dental epithelial stem cells. ERGOB meeting, Prangins Switzerland, 2006. 12. 15-17.

- 36) **Ohshima H:** Cell dynamics in the process of pulpal healing following tooth injuries. International Symposium on Molecular Destruction and Reconstruction of the Dentin/Pulp Complex and Its Surrounding Tissues (the COE program: "Frontier Research on Molecular Destruction and Reconstruction of Tooth and Bone", Tokyo Medical and Dental University), Tokyo, 2007. 3. 5.
- 37) 石関清人, 鍵谷忠慶, 藤原尚樹, 原田英光: メッセル軟骨の局所形態発生とその運命. 第112回日本解剖学会総会・全国学術集会, 大阪, 2007. 3. 27-29.

### (3) 国内学会発表等

- 1) **大島勇人:** 電子メールとwebを安全に使うために. 新潟大学歯学部情報セキュリティ委員会主催「コンピュータ・ネットワークセキュリティ講習会」, 新潟, 2004. 6. 21.
- 2) 大内章嗣, **大島勇人**, 富沢美恵子, 福島正義, 山崎和久, 隅田好美, 小野和宏, 五十嵐敦子, 八木稔, ステガロユ・ロクサーナ, 中島俊一, 山田好秋: 4年制歯科衛生士養成課程新入生に対する卒業後進路希望等に関するアンケート調査. 第23回日本歯科医学教育学会総会および学術大会, 新潟, 2004. 6. 30-7. 2.
- 3) **大島勇人:** 第3回歯胚再生コンソーシアム, 東京, 2004. 7. 27.
- 4) **鈴木啓展**, 網塚憲生, 織田公光, 野田政樹, 吉江弘正, 前田健康: klotho欠損マウスの象牙芽細胞と骨細胞における組織学的異常について. 第22回日本骨代謝学会, 大阪, 2004. 8. 5-7, 日本骨代謝学会誌(プログラム抄録集) p. 202, 2004.
- 5) **大島勇人:** 第4回歯胚再生コンソーシアム, 東京, 2004. 8. 30.
- 6) **大島勇人**, 中曽根直弘, 監物新一, **大島邦子:** ラット臼歯窩洞形成後の歯髄におけるストレスタンパク質HSP-25発現と細胞増殖との相関について. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25, 歯科基礎医学会雑誌, 46(5): 378, 2004.
- 7) 中曽根直弘, **大島勇人:** ラット臼歯発生過程における歯胚上皮および間葉細胞のストレスタンパク質HSP-25発現と細胞増殖, 分化との関係. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25, 歯科基礎医学会雑誌, 46(5): 402, 2004.
- 8) 川岸恵理子, 楯 泰昌, **大島邦子**, 野村修一, **大島勇人:** 高齢ラット臼歯窩洞形成後の歯髄におけるストレスタンパク質HSP-25発現と抗原提示細胞の動態について. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25, 歯科基礎医学会雑誌, 46(5): 403, 2004.
- 9) **鈴木啓展**, 網塚憲生, 織田公光, 野田政樹, **大島勇人**, 前田健康: Klotho欠損マウスの骨細胞における組織学的異常について. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25, 歯科基礎医学会雑誌, 46(5): 405, 2004.
- 10) 高田勇之介, 山越康男, 横濱玉器, 一森康男, 脇坂 聡, 原田英光: 脾臓内抗原感作法を用いた抗DSPモノクローナル抗体の作製. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25.
- 11) 横濱玉器, 高田勇之介, 一森康男, 脇坂 聡, 原田英光: マウス切歯でのFgf-10の発現維持に関与する成長因子の探索. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25.

- 12) 横井隆政, 斎藤正寛, 椿本貴教, 西田英作, 原田英光, 野口俊英, 寺中敏夫: 不死化マウス歯小嚢細胞における腭表現型の解析. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25.
- 13) 釜崎陽子, 湯浅健司, 小西郁理, 原田英光, 藤原 卓, 福本 敏: 歯原性上皮細胞の増殖分化における糖脂質の役割について. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25.
- 14) 山田亜矢, 福本恵美子, 原田英光, 藤原 卓, 福本 敏: マウス切歯におけるGjalの発現とその局在. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25.
- 15) 小西郁理, 湯浅健司, 斎藤 幹, 釜崎陽子, 山田亜矢, 原田英光, 藤原 卓, 福本 敏: 歯原性上皮細胞における包括的増殖因子シグナルの解明. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25.
- 16) 吉羽邦彦, 楯 泰昌, 吉羽永子, 岩久正明, 興地隆史, 大島勇人: 歯科用レーザーのう蝕治療への応用に関する研究. 第20回日本歯科医学会総会, 横浜, 2004. 10. 29-31, 日本歯科医師会雑誌, 57(4): 401, 2004.
- 17) 楯 泰昌, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 岩久正明, 興地隆史, 大島勇人: ラット臼歯への半導体レーザー照射に対する歯髄反応. 平成16年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2004. 11. 13, 新潟歯学会雑誌 34(2): 288, 2004.
- 18) 田中容子, 池亀美華, 高木律男, 大島勇人: ラット臼歯再植後の歯髄治癒過程における歯髄内硬組織形成メカニズムの検索. 平成16年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2004. 11. 13, 新潟歯学会雑誌 34(2): 289, 2004.
- 19) 大島勇人: 第5回歯胚再生コンソーシアム, 東京, 2004. 11. 26.
- 20) 大島勇人, 橋本英美, 原田英光: Apical budは齧歯類切歯やモルモット臼歯の持続的成長を維持している, H13・H15学術フロンティア推進事業合同研究集会, 松戸, 2004. 12. 17-18.
- 21) 大島勇人, 原田英光: 第1回歯の発生生物学と再生に関するシンポジウム(世話人, 座長), シンポジスト: 大峽 淳「歯の種類を決定するメカニズムについて」; 山城 隆「歯根形成のメカニズムについて」; 福本 敏「歯の形成のための環境因子としての細胞外マトリックス」, 東京, 2004. 11. 26.
- 22) 原田英光, 田巻玉器, 一森康男, 高田勇之介, 脇坂 聡: 歯の発生におけるFGF10の役割. 第49回大阪歯学会総会, 大阪, 2004. 12. 9.
- 23) 橋本英美, 中曽根直弘, 鈴木啓展, 坂井日出男, 監物新一, 大島邦子, 齊藤 力, 原田英光, 大島勇人: 複数のapical budがモルモット臼歯の持続的成長を維持している. 第110回日本解剖学会総会・全国学術集会, 富山, 2005. 3. 29-31, 解剖学雑誌 80(Suppl.): 175, 2005.
- 24) 原田英光, 田巻玉器, 一森康男, 高田勇之介, 脇坂 聡: 歯胚器官培養のビデオ観察による歯冠形態決定メカニズムの解明. 第110回日本解剖学会総会・全国学術集会, 富山, 2005. 3. 29-31.
- 25) 高田勇之介, 横濱玉器, 一森康男, 脇坂 聡, 原田英光: 脾臓内抗原感作法を用いた抗DSPモノクローナル抗体の作製. 第110回日本解剖学会総会・全国学術集会, 富山, 2005. 3. 29-31.
- 26) 川瀬知之, 奥田一博, 斎藤宜則, 鈴木啓展, 吉江弘正: 多血小板血漿(PRP)に含まれる血小板の細胞膜は石灰化の核として作用する. 第48回春期日本歯周病学会学術大会, 長崎, 2005. 4. 21-23, 日本歯周病学会会誌(プログラム抄録集) p. 47, 2005.

- 27) 大島勇人:第6回歯胚再生コンソーシアム, 東京, 2005. 5. 27.
- 28) 鈴木啓展, 網塚憲生, 野田政樹, 大島勇人, 前田健康:骨基質石灰化に対するklotho欠損の影響. 第25回日本骨形態計測学会, 東京, 2005. 6. 17-19, 日本骨形態計測学会雑誌 15 (2): 76, 2005.
- 29) 鈴木啓展, 網塚憲生, 野田政樹, 大島勇人, 前田健康:klothoマウスにおける骨基質石灰化とCa, P, Mg元素マッピング, 第23回日本骨代謝学会, 大阪, 2005.7.21-23, 日本骨代謝学会誌(プログラム抄録集) p. 202.
- 30) 大島勇人:第7回歯胚再生コンソーシアム, 東京, 2005. 8. 24.
- 31) 川瀬知之, 奥田一博, 塩谷慎吾, 鈴木啓展, 山宮かの子, 吉江弘正:ハイドロキシアパタイト多孔体による歯周組織に特化した培養人工骨作製の試みー第一報 深部気孔での安定した細胞増殖の誘導ー, 第48回秋期日本歯周病学会学術大会, 札幌, 2005. 9. 22-23, 日本歯周病学会会誌(プログラム抄録集) p. 111.
- 32) 大島勇人, 原田英光:サテライトシンポジウム「エナメルタンパク質の新規機能性を探究する研究と将来への展開」(企画), シンポジスト:栗栖浩二郎「アメロゲニンの細胞生物学的機能を示唆する初めての形態学的知見について」;福本 敏「アメロブラスチンによるエナメル芽細胞の分化制御」;中村卓史「Epiproteinはenamel matrixの発現と歯の形態形成に必須の分子である」;畠山純子「Amelogenin/Ameloblastin Double Knockout Mice 解析によるエナメルマトリックスの働き」;須田直人「歯根吸収に関する最近の知見とアメロゲニンによる吸収抑制の可能性」;谷口彰良「アメロゲニンの発現増幅メカニズムとその意義」, 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30, J Oral Biosci 47(Suppl): 26, 2005.
- 33) 小川亮一郎, 齊藤 力, 大島勇人:マウス舌下部への自家移植歯における歯髄内硬組織形成について. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30, J Oral Biosci 47(Suppl): 88, 2005.
- 34) 朔 敬, 板垣真奈美, 依田浩子, 丸山 智, 程 君, 大島勇人, 里方一郎:歯原性角化モデルとしてのMsx2ノックアウトマウス顎骨嚢胞. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30, J Oral Biosci 47(Suppl): 96, 2005.
- 35) 鈴木啓展, 網塚憲生, 野田政樹, 大島勇人, 前田健康:Klotho欠損マウスにおける骨基質の石灰化異常. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30, J Oral Biosci 47(Suppl): 100, 2005.
- 36) 大沢 大, 鈴木啓展, 監物新一, 齊藤 力, 内田 隆, 大島勇人:エナメル質形成不全を呈する突然変異ラットにおけるエナメル芽細胞の形態変化とエナメルタンパク質の局在について. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30, J Oral Biosci 47(Suppl): 103, 2005.
- 37) 本田雅規, 岩附慎二, 原田英光, 上田 実:マウス歯胚細胞による歯の再生. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30.
- 38) 吉崎恵悟, 釜崎陽子, 湯浅健司, 福本恵美子, 山田亜矢, 原田英光, 野中和明, 福本 敏:神経成長因子NT-4によるエナメル芽細胞の分化制御. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30.

- 39) 椿本貴教, 斎藤正寛, 横井隆政, 西田英作, 高坂一貴, 原田英光, 寺中敏夫: 不死化マウス歯乳頭細胞分化能力の解析. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30.
- 40) 高坂一貴, 横井隆政, 斎藤正寛, 椿本貴教, 西田英作, 原田英光, 野口俊英, 寺中敏夫: 不死化歯小嚢細胞より分離した歯根膜前駆体細胞の解析. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30.
- 41) 田巻玉器, 高田勇之介, 一森康男, 脇坂聡, 原田英光: マウス切歯形成端における幹細胞nicheの維持に関わるFgf9の役割. 第47回歯科基礎医学会学術大会・総会, 仙台, 2005. 9. 28-30.
- 42) 川岸恵理子, 大島邦子, 野村修一, 大島勇人: 高齢ラット臼歯窩洞形成後の歯髄反応. 第114回日本補綴歯科学会学術大会, 新潟, 2005. 10. 1-2, 日本補綴歯科学会雑誌 49(Special Issue): 183, 2005.
- 43) 中曽根直弘, 吉江弘正, 大島勇人: 歯の発生における歯胚上皮および間葉細胞のストレスタンパク質heat-shock protein (HSP)-25発現と細胞増殖との関係. 平成17年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2005. 11. 5, 新潟歯学会雑誌 35(2): 256, 2005.
- 44) 川岸恵理子, 大島邦子, 野村修一, 大島勇人: 高齢ラット臼歯窩洞形成後の歯髄反応. 平成17年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2005. 11. 5, 新潟歯学会雑誌 35(2): 258, 2005.
- 45) 小川亮一郎, 齊藤 力, 大島勇人: マウス舌下部への自家歯牙移植実験による歯髄分化能の検索. 平成17年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2005. 11. 5, 新潟歯学会雑誌 35(2): 263, 2005.
- 46) 鈴木啓展, 金子 進, 佐藤 隆, 熊西敏郎, 竹内幸美, 吉江弘正: アレンドロネート長期投与による歯周組織変化. 日本歯科保存学会50周年記念大会2005年度秋期学術大会, 東京, 2005. 11. 23-25, 日本歯科保存学雑誌(プログラム抄録集) p. 48, 2005.
- 47) 大島勇人: 歯科再生会議が目指す方向性, 第1回産学連携フォーラム(歯科再生医療産学連携会議主催), 東京, 2005. 12. 19.
- 48) 道本修一郎, 福地健郎, 奥山真也, 上田 潤, 酒井康弘, 尾山徳秀, 阿部春樹, 大島勇人: rebound tonometer (TonoLabR)を用いた小動物眼の眼圧測定精度について, 第101回新潟眼科集談会, 2005. 12. 17-18, 眼科臨床医報 2005.
- 49) 樺沢勇司, 勝部憲一, 岡田憲彦, 原田英光, 山口 朗, 小村 健: 歯原性角化嚢胞形成における幹細胞制御因子Notchシグナルの解析. 第50回日本口腔外科学会総会, 大阪, 2005. 23-25.
- 50) 大島勇人: 篤志解剖全国連合会第36回総会, 相模原, 2006. 3. 28.
- 51) 大島勇人, Hyun-A Lee, Sung-Won Cho, Jinglei Cai, Min-Jung Lee, 監物新一, Han-Sung Jung: マウス第一臼歯エナメル結節はパラコーンとプロトコニッドの形成に関与する. 第111回日本解剖学会総会・全国学術集会, 相模原, 2006. 3. 29-31, 解剖雑誌 81(Suppl): 171, 2006.
- 52) 大島勇人: 第8回歯胚再生コンソーシアム, 東京, 2006. 3. 30.
- 53) 大島勇人: 第2回産学連携フォーラム(歯科再生医療産学連携会議主催), 東京, 2006. 7. 10.
- 54) 原田英光, 鍵谷忠慶, 藤原尚樹, 田畑泰彦, 石関清人: ヘルトヴィッチ上皮鞘の形成メカニズムと歯根誘導技術の開発. 第15回硬組織再生生物学会, 京都, 2006. 9. 16.

- 55) 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.
- 56) 小澤幸重, 千坂英輝, 横田ルミ, 山本 仁, 鈴木久仁博, 寒河江登志朗, 大島勇人, 鄭 翰聖: 歯の形態形成要因. 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): 120, 2006.
- 57) 大沢 大, 監物新一, 齊藤 力, 内田 隆, 大島勇人: エナメル質形成不全を呈する突然変異ラット臼歯形成過程における歯の形態異常. 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): 126, 2006.
- 58) 長谷川朋子, 鈴木啓展, 大島勇人: マウス再植後の歯髄治癒パターンを規定する因子について. 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): 127, 2006.
- 59) Tetiana Haniastuti, 大島勇人, 星野悦郎: Post-treatment pathohistology of pulpitis with spontaneous pain. 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): 131, 2006.
- 60) 藤原尚樹, 田巻玉器, 大島勇人, 石関清人, 鍵谷忠慶, 脇坂 聡, 原田英光: 歯根発生におけるヘルトビッチ上皮鞘の形成メカニズムについて. 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): 152, 2006.
- 61) 鍵谷忠慶, 佐々木憲明, 石関清人, 藤原尚樹, 原田英光: 破骨細胞アポトーシスにおけるcalpainの関与について. 第48回歯科基礎医学会学術大会・総会, 鶴見, 2006. 9. 21-23.
- 62) 石関清人, 鍵谷 忠慶, 藤原尚樹, 原田英光: メッケル軟骨背側端からのツチ骨とキヌタ骨の形成. 第48回歯科基礎医学会学術大会・総会, 鶴見, 2006. 9. 21-23.
- 63) Ali MN, Ejiri S, Kobayashi T, Oda K, Ohshima H, Saito C: Histological analysis of a rat model of mandibular distraction osteogenesis. 平成18年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2006. 11. 11, 新潟歯学会雑誌 36(2): 315, 2006.
- 64) 橋本英美, 芳澤享子, 齊藤 力, 大島勇人: 複数のapical budがモルモット臼歯の持続的成長を維持している. 平成18年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2006. 11. 11, 新潟歯学会雑誌 36(2): 315, 2006.
- 65) 大沢 大, 齊藤 力, 大島勇人: *Whitish chalk-like teeth (wct)* 遺伝子変異はラット成熟期エナメル芽細胞の分化異常と歯の低石灰化を引き起こす. 平成18年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2006. 11. 11, 新潟歯学会雑誌 36(2): 316, 2006.
- 66) 長谷川朋子, 鈴木啓展, 吉江弘正, 大島勇人: マウス臼歯再植後の歯髄治癒パターンを規定する因子について. 平成18年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2006. 11. 11, 新潟歯学会雑誌 36(2): 316, 2006.
- 67) 大島勇人: 第3回産学連携フォーラム(歯科再生医療産学連携会議主催), 東京, 2007. 1. 23.

- 68) **Ohshima H, Osawa M:** Rat *wct* mutation prevents differentiation of maturation-stage ameloblasts resulting in hypo-mineralization in teeth, 文部科学省平成15年度学術フロンティア推進事業(形態形成グループ)研究集会, 東京, 2007. 2. 16.
- 69) 鍵谷忠慶, 藤原尚樹, 石関清人, 原田英光: Wnt5aノックアウトマウス歯胚の組織学所見について, 岩手医科大学歯学会第36回例会, 盛岡, 2007. 2. 24.
- 70) 大島勇人: 篤志解剖全国連合会第37回総会, 大阪, 2007. 3. 26.
- 71) 大島勇人: 第9回歯胚再生コンソーシアム, 大阪, 2007. 3. 26.
- 72) 大島勇人, 海野秀基, 鈴木啓展, 監物新一, 大島邦子, Sung-Won Cho, Jinglei Cai, Han-Sung Jung: 顎骨への歯の他家移植実験を利用した歯髄分化能の検索. 第112回日本解剖学会総会・全国学術集会, 大阪, 2007. 3. 27-29, 解剖雑誌 82(Suppl): 154, 2007.
- 73) 小澤幸重, 蔡 景菴, 鄭 翰聖, 大島勇人, 千坂英輝, 横田ルミ, 山本 仁, 鈴木久仁博, 寒河江登志朗: 歯の形態形成は顎の成長と深く関連する. 第112回日本解剖学会総会・全国学術集会, 大阪, 2007. 3. 27-29, 解剖雑誌 82(Suppl): 158, 2007.
- 74) Ali MN, Ejiri S, Kobayashi T, Oda K, **Ohshima H**, Saito C: Histological study of the cellular events during rat mandibular distraction osteogenesis. 第112回日本解剖学会総会・全国学術集会, 大阪, 2007. 3. 27-29, 解剖雑誌 82(Suppl): 234, 2007.
- 75) 鍵谷忠慶, 佐々木憲明, 石関清人, 藤原尚樹, 原田英光: Calpain 阻害剤を用いた破骨細胞のアポトーシス抑制. 第112回日本解剖学会総会・全国学術集会, 大阪, 2007. 3. 27-29.

### 3. 出版物

- 1) 原田英光: 歯科の再生医学. 再生医療へのブレイクスルー, 遺伝子医学MOOK, 1 p. 288-291, 2004.
- 2) 原田英光, 脇坂聡: 口腔諸器官の発生と再生. 浜田茂幸, 米田俊之編: 先端歯科医学の創生, 大阪大学出版会, 大阪, p. 2-13, 2005.
- 3) 原田英光: 歯の発生・再生. 上野直人, 野地澄晴編: 発生・再生イラストマップ, 羊土社, 東京, 2005.
- 4) 原田英光: 2. エナメル上皮細胞. 上田 実監修, 本田雅規編著: 「歯の再生: 歯の発生生物学から歯の再生研究まで」第2章 歯にかかわる細胞, 真興交易(株)医書出版部, 東京, p. 59-66, 2006.
- 5) 大島勇人: 3. 歯髄細胞の特性と分化能. 上田 実監修, 本田雅規編著: 「歯の再生: 歯の発生生物学から歯の再生研究まで」第2章 歯にかかわる細胞, 真興交易(株)医書出版部, 東京, p. 67-74, 2006.



## 研究成果の概要

### (1) はじめに

象牙質は膠原線維(コラーゲン線維)を主成分とする基質に磷酸カルシウムのハイドロキシアパタイト結晶が沈着したもので、成分から見ると骨と類似しているが、象牙質は骨とは似て非なる組織である。一番の大きな違いは、骨は絶えず吸収と形成を繰り返しながら新しい骨に置き換わる(リモデリングという)のに対し、象牙質は一度造られるとリモデリングされることがない。さらに、骨の場合は形成細胞である骨芽細胞がみずから造った骨に埋め込まれ骨細胞となり、その後の骨を造るのは他の細胞に任せてしまう。一方、象牙質の場合は象牙芽細胞がその細胞突起を象牙質に埋め込むだけで、細胞の本体は常に象牙質の外にあり、この突起が象牙細管の中を走っている。

このような象牙質と骨との違いについて、系統発生学的に両者の由来を考えてみると、骨は体の支持組織として進化したのに対し、象牙質は感覚器として進化した硬組織であると考えられないだろうか。この考えに従えば、感覚器であるが故に、象牙質基質の中には象牙芽細胞突起が存在し、外的な刺激を受容し反応する能力が象牙質に備わっている。一方、支持組織である骨はリモデリングによりその恒常性を維持しているが、直接外的な刺激を受けることは稀である。また、病的環境では歯髄内には歯髄結石(象牙質粒ともいう)や骨様組織などの硬組織ができることが知られている。多くの魚類・両生類・爬虫類の歯では、歯の象牙質の下端と基底の骨が線維性結合もしくは骨性結合(アンキローシス)しているので、系統発生学的にはアンキローシスは病的な状態とは言い切れない。しかし、このような動物の歯は、次から次へと生え替わる多生歯性であり、歯が生え替わる際には骨が吸収を受ければ容易に歯が脱落するので、アンキローシスという状態はこの様な歯の生え替わりには好都合であると言える。しかし、私たち哺乳類は一生歯性もしくは二生歯性であるので、ア

ンキローシスという状況は望ましい状況とは言えない。従って、歯の損傷などの後に歯髄内で造られる硬組織が象牙質なのか骨なのかを見極めることは歯髄の治癒過程の理解に極めて重要であり、硬組織の種類がリモデリングの有無に影響を与えるとすれば、歯髄内での硬組織形成メカニズムの解明は歯科臨床においても重要なテーマであると言えよう。

我々のからだは、外傷や切断などの物理的損傷に対しての治癒能力を備えており、その傷を受けた場所に応じて修復し、元通りに再生する。歯科領域においても再生現象が知られており、窩洞形成や移植・再植等の歯の損傷に対して、歯髄は高い免疫防御機能を有すると共に、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、局所の歯髄反応を生物学的見地から捉える必要があると言える。申請者は平成16～18年度科学研究費補助金を受け、歯の発生過程および歯の損傷後の歯髄修復過程における細胞のダイナミクス、および歯における組織幹細胞に関して検索し、以下の事を明らかにした(参照:添付研究成果総説 1, 2, 5, 6, 7, 8, 23, 24)。

### (2) 歯の発生過程における細胞のダイナミクス ①:ラット臼歯生後発育におけるストレスタンパク質発現と細胞増殖活性との相関(添付研究成果原著論文 16)

ストレスタンパク質 heat-shock protein (HSP) は多機能タンパク質であるが、近年細胞の増殖と分化への関与が示唆されている。今回我々は、歯の発生における低分子量ストレスタンパク質 HSP-25 の機能的意義を明らかにするために、生後の歯の発生過程における HSP-25 発現と細胞増殖、分化との関係を免疫細胞化学的に検索した。

材料として生後1日から100日齢のWistar系

ラットの上顎第一臼歯を使用した。プロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与し分裂細胞をラベルし、2 時間後にアルデヒド固定・EDTA 脱灰後パラフィン切片を作製し、抗 BrdU 抗体および抗 HSP-25 抗体を用いて二重免疫染色を行った。

生後 1 日では BrdU 免疫陽性細胞はサーヴィカルループと咬頭間領域の内エナメル上皮およびそれらに隣接する歯髄に数多く局在していた。一方、HSP-25 免疫陽性反応は象牙芽細胞およびエナメル芽細胞がすでに分化した咬頭領域に限局していた。その後生後 5 日から 30 日の間に BrdU 免疫陽性細胞は根尖側方向にシフトしたが、ヘルトヴィツヒの上皮鞘周囲に局在した。HSP-25 発現についても同じように免疫反応が根尖側にシフトしたが、BrdU と HSP-25 の免疫反応は重なることはなかった。生後 60 日から 100 日では BrdU 免疫陽性細胞は歯髄内にはほとんど認められず、HSP-25 免疫陽性反応は象牙芽細胞層にのみ局在した。

以上より、歯胚上皮および間葉細胞は細胞増殖終了後に HSP-25 発現を獲得し、HSP-25 が細胞増殖から分化へのスイッチとして働くことが示唆された。一方、象牙芽細胞、エナメル芽細胞における HSP-25 の持続的発現は形成細胞の機能発現に関与すると考えられた。

### (3) 歯の発生過程における細胞のダイナミクス ②: ラット切歯および胎生期臼歯における ストレスタンパク質発現と細胞増殖活性との 相関 (添付研究成果原著論文 20)

ラット臼歯生後発育において、象牙芽細胞とエナメル芽細胞は細胞増殖終了後にストレスタンパク質 HSP-25 免疫陽性反応を獲得する。しかしながら、胎生期での細胞増殖と分化の関係に関するデータはない。我々は歯の形態形成過程における HSP-25 の機能的な意義を明らかにするために、ラット胎生期臼歯と生後の常生歯の切歯における HSP-25 の発現と細胞増殖活性を免疫組織化学的に比較した。

材料として胎生 15 日から生後 0 日齢の Wistar 系ラットの上顎第一臼歯および生後 30 日齢の下顎切歯を使用した。胎生期ではアルデヒド固定・

EDTA 脱灰後凍結切片を作製し、細胞分裂マーカーである抗 Ki67 抗体および抗 HSP-25 抗体を用いて、生後ではプロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与し分裂細胞をラベルし、2 時間後にアルデヒド固定・EDTA 脱灰後パラフィン切片を作製し、抗 BrdU 抗体および抗 HSP-25 抗体を用いて二重免疫染色を行った。

臼歯形態形成期において多くの増殖細胞が歯胚に広く分布し、HSP-25 免疫陽性反応は細胞分裂終了後の歯胚上皮および間葉細胞に認められた。しかしながら、歯の形態形成におけるシグナルセンターと考えられている第一および第二エナメル結節には細胞増殖、HSP-25 免疫陽性反応共に認められなかった。切歯における増殖細胞の分布パターンは、細胞分裂を欠くエナメル結節の消失と形成端の幹細胞が存在する領域 apical bud でのまばらな分布を除いて胎生期臼歯と同一であった。また口腔粘膜上皮では、1~2 層の発生途上のステージでは HSP-25 免疫陽性反応は認められないが、分化が進行し重層化したステージでは基底層以外の細胞層において HSP-25 免疫陽性反応が認められた。

以上より、HSP-25 タンパク質は歯の形態形成において細胞増殖と分化の間のスイッチとして働くことが示唆されたが、齧歯類において円錐型を呈する切歯や多咬頭の臼歯といった異なった歯の形態が異なる増殖細胞と非増殖細胞の調節とその分化のタイミングによって引き起こされると考えられた。

### (4) 歯の発生過程における細胞のダイナミクス ③常生歯における幹細胞 niche について (添付研究成果原著論文 9)

再生医療の主役となるのが、自己増殖したのち様々な機能細胞に分化する能力のある幹細胞と呼ばれる細胞群である。我々の体が形成される時には、各種の機能細胞が作り出されるかなめの部分に幹細胞が存在する。受精卵が発生を始めた初期にはすべての細胞種に分化可能な全能性幹細胞が存在し、ES 細胞 (胚性幹細胞) と呼ばれる。一方、生体の組織では、限定はされているものの多能性を備えた組織幹細胞が存在する。例えば、造血系幹細胞、粘膜や表皮などの上皮幹細胞、神経系幹細胞などがあり、組織幹細胞はその自己

再生能と分化能により組織恒常性と損傷後の組織再生に寄与している。この組織幹細胞は niche ニッチェという特別な微小環境に存在することで幹細胞としての性質を維持していると考えられており、その分子機構が次第に明らかになっている(以下「組織幹細胞」のことを単に「幹細胞」と呼ぶ。また、ここで述べるニッチェとは、上皮と間葉との間の相互作用によって制御された幹細胞維持に必要な微小環境であると理解して頂きたい)。

ところで、歯の発生は、第1鰓弓由来の外胚葉(口腔粘膜上皮)と神経堤由来の中胚葉(外胚葉性間葉)との相互作用(上皮間葉相互作用という)を通して、時間的・空間的な正確な細胞の増殖と細胞死の調節が行われ形態形成・細胞分化が進行する。哺乳類の歯は異形歯性といい、部位によりその形態が異なり、また動物種により歯の形態は多様性を示し、その食性を反映していると言われる。さらに、歯の形だけではなく、その発生様式も多様で、ネズミやウサギなどのある種の動物は一生生涯生え続ける常生歯(ヒトの歯を有根歯というので、それに対して常生歯は無根歯ともいう)をもつ。

この常生歯において歯の幹細胞が発見されたが、最近の歯の発生生物学研究でのブレイク・スルーと言えよう。歯の幹細胞ニッチェは常生歯の形成端(常生歯においては、口腔内に露出している切縁・咬頭側と反対側の先端を形成端と呼ぶ)に存在し、この領域は共通の形態学的特徴をもつ。幹細胞の維持と分化を決定するシグナル分子として、Notch1, Lunatic fringe, fibroblast growth factor (FGF)-10 が歯胚上皮・間葉に発現している。最近の組織学的・分子生物学研究から、常生歯形成端には歯胚が恒久的に維持されている分子機構が存在することから、我々はこの特別な歯の幹細胞ニッチェの領域を示す apical bud という新しい用語を提唱した。

ラットやマウスなどの齧歯類の切歯は一生生涯生え続ける常生歯である。これは、形成端における持続的な細胞供給と切縁における咬耗によりその恒常性が保たれている。形成端の歯胚上皮と間葉をコラゲナーゼ処理で分離して歯胚上皮を走査電子顕微鏡で観察すると、この部位の歯胚上皮はコブ状に突出した形態を成しており、あたかも仰向けの人間が頭をもたげているかの様な形態

を呈していることが明らかとなった。歯の発生が上皮間葉相互作用により進行することは先に述べたが、歯胚は、蕾状期、帽状期、鐘状期とその形態を変化させる。興味深いことに、常生歯形成端の歯胚上皮をその長軸に垂直な面で連続切片を作製して観察すると、その形態が蕾状期、帽状期、鐘状期の歯胚と同じ形態を順次呈することが示された。このことは、成獣になった後も常生歯形成端に初期段階の歯胚が恒久的に維持されていることを示していると言えよう。

細胞分裂マーカーで形成端歯胚上皮を観察すると、この部位には非対称分裂する細胞が存在し、分裂した一方の娘細胞は細胞分裂をしながら切縁側へ移動し内エナメル上皮、中間層、星状網、外エナメル上皮に分化するのに対し、もう一方は細胞分裂後、形成端歯胚上皮内に留まることが明らかになった。この幹細胞が存在する形成端の歯胚上皮について、これまで適切な用語が存在しなかったために cervical loop という用語が誤って用いられてきた。cervical loop というのは帽状期から鐘状期歯胚における内エナメル上皮と外エナメル上皮との移行部(折れ返り)のことを指し、歯冠形成が終わるとヘルトビツヒの上皮鞘となる部位である。従って、形成端には幹細胞が存在し歯胚が恒久的に維持されていることから、常生歯形成端を示す apical bud という新しい用語を提唱するに至った。また、この apical bud は齧歯類切歯だけでなく、モルモットの臼歯などにも存在することから、apical bud は歯種に拘わらず常生歯形成端に共通して存在すると考えられた。

幹細胞研究における問題点は組織においてその存在を示す特異的なマーカーが存在しないことであるが、幹細胞がニッチェと呼ばれる特別な領域に存在することが知られており、この微小環境が細胞の自己再生能の維持と分化の方向性の決定に重要な役割を果たしていると考えられている。これまでの研究により、apical bud と周囲の間葉組織が特異的なシグナルを発現することが明らかになっている。このシグナルの主役を演じるのが Notch シグナルであり、Notch1 mRNA が apical bud の星状網に発現し、基底膜に接した基底細胞との境界部で強い発現を示す。この Notch1 の発現が強い部位は、その下流のシグナルの転写因子 HES1 (Hairy/Enhancer of Split) mRNA の発現と一致する。また、基底細胞は Lunatic

*fringe* mRNA (Lunatic fringe は Notch シグナルを修飾すると考えられている) を発現し、基底細胞が内エナメル上皮細胞に分化すると *Jagged1* mRNA (*Jagged1* は Notch1 のリガンドとして働く) を発現するようになる。さらに、apical bud 周囲の間葉は *FGF-10* mRNA を発現している。この *FGF-10* は幹細胞の形成と維持に重要な働きをすることが明らかになっており、歯胚間葉における *FGF-10* の持続的な発現が常生歯の apical bud を維持していると言えよう。一方、有根歯であるマウス臼歯の歯胚形成過程においても、歯胚間葉に一過性に *FGF-10* mRNA が発現することが示されており、有根歯であっても歯胚の段階では幹細胞が維持されている可能性があると考えられる。

様々な器官発生過程において、その初期発生過程は共通の形態学的特徴を示し、共通の分子機構が存在することが示されている。体肢の発生過程を観察すると、体肢芽のシグナル・センターの一つである極性化活性域 zone of polarizing activity (ZPA) と *FGF-10* を含む *FGF* スーパー・ファミリーが形態形成の鍵となるシグナルとなっている。歯胚形成におけるシグナル・センターはエナメル結節 enamel knot であると考えられており、間葉における *FGF-10* 発現との相互作用により、歯胚の形成段階は蕾状期、帽状期、鐘状期と進行する。有根歯の発生では間葉の *FGF-10* mRNA の発現が停止するが、常生歯では持続的な *FGF-10* mRNA の発現がみられ、apical bud を維持していると考えられる。しかしながら、エナメル結節でのシグナルと間葉における *FGF-10* mRNA 発現との相互作用の分子機構は明らかになっていない。

歯というのが上皮由来組織と間葉由来組織からなる石灰化器官であるために、歯の再生は神経や筋、骨の様な組織の再生に比べて解決しなければならない多くの課題が残っている。歯の発生が上皮間葉相互作用により進行することは繰り返し述べたが、数多くのシグナル分子や成長因子の発現パターンが明らかになっており (<http://bite-it.helsinki.fi/>)、器官・細胞培養系や遺伝子改変マウスを使ってこれらのシグナルの機能解析が進んでいる。この様な情報の集積は、将来、歯の発生機構の解明から歯の再生医療へと繋がるであろう。しかしながら、歯の位置や形、数

を調節しているのは 200 以上もの遺伝子の相互作用によるものであるので、シグナルの解析が進んだとしてもティッシュ・エンジニアリングにより歯をつくることは容易なことではない。我々がより単純な歯の再生モデルとして常生歯を研究対象とし、apical bud の維持・分化機構を解明することが、歯の再生医療具現化に向けての有効な最初のステップであり、この分子機構の解明こそが歯の再生医療に有益な情報を与えることになるであろう。歯の幹細胞、そしてその維持に必要なニッチ、そして細胞運命の決定についての分子機構解明の研究は今始まったところである。

#### (5) 歯科用レーザー照射後の歯髄修復機構と細胞のダイナミクス: ①CrTmEr:YAG レーザーに対する歯髄反応 (添付研究成果原著論文 3)

近年、歯科臨床において様々な波長を持つレーザー装置が臨床応用され、窩洞形成などに用いられている。中でも、Erbium:YAG (Er:YAG)、Chromium, Erbium:YSGG (Cr,Er:YSGG)、Chromium,Thulium,Erbium:YAG (CrTmEr:YAG) レーザーなどに代表される硬組織切削レーザーは、従来のタービン切削に比べ、切削時の振動が少なく、静音性に優れるため、タービンに変わる切削器具として期待されている。今日までのレーザーによる窩洞形成後の歯髄反応に関する多数の研究がなされているが、それらのほとんどは病理組織学的な検索であり、レーザーによる切削後の歯髄反応は、エアタービンによるものとほぼ同様であり、その安全性を示唆するものであった。しかしながら、レーザーによる窩洞形成後の歯髄反応においては、未だ不明な点も多く、細胞レベルで詳細に検索したものはほとんど見られない。本研究は、レーザーによる窩洞形成に対する歯髄反応を明らかにする目的で、窩洞形成後の歯髄における象牙芽細胞の動態、および抗原提示細胞の動態を、それぞれ抗ストレスタンパク質 heat-shock protein (HSP)-25 抗体、抗 class II MHC 抗原抗体を用い、免疫細胞学的に検索を行った。また、これまで報告されている、同様の実験系におけるタービンによる歯の切削後の歯髄反応との比較検討も行った。

生後 100 日齢 Wistar 系ラットの右側上顎第一臼歯に注水下で CrTmEr:YAG Laser (ニーク

試作機)を用い、200-250 mJ / pulse, 5 Hzにて象牙質の半分に及ぶグループ状の窩洞を形成し、窩洞を開放状態とした。窩洞形成直後、6, 12 時間後および 1, 3, 5 日後にアルデヒド系固定液による灌流固定・EDTA による低温脱灰後、上顎臼歯矢状断凍結切片を作製した。象牙芽細胞の分化マーカーとして抗 HSP-25 ポリクローナル抗体、および抗原提示細胞のマーカーとして OX6 モノクローナル抗体を用い、ABC 法にて免疫染色した。また、左側上顎第一臼歯をコントロールとした。また、一部の切片は HSP-25 免疫染色後、通法に従い後固定、樹脂包埋を行い、準超薄切片、超薄切片とし、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察も行った。

0~12 時間後においては、窩洞直下の象牙芽細胞は破壊されていたが、象牙芽細胞の HSP-25 発現は持続し、滲出性の変化はほとんど認められなかった。この窩洞形成初期における歯髄への影響はタービンによるものと同程度であった。しかし、1 日後までに象牙細管中への口腔細菌の侵入ならびに歯髄・象牙境への円形細胞浸潤が起こり、その後病変が経時的に拡大し、その周囲を HSP-25 免疫陽性細胞が取り囲んでいた。また、6~24 時間後に歯髄・象牙境へ集まる OX6 陽性細胞の数はエアタービンによる窩洞形成時に比し少なく、同部位での象牙芽細胞の再生は認められなかった。術後 3 日後の電子顕微鏡像より、病変周囲を取り囲んでいた HSP-25 陽性細胞は、Golgi 装置や粗面小胞体などの細胞内小器官が発達しており、分化過程の象牙芽細胞であろうと思われた。一方、病変内部の円形細胞は、ペリオキシダーゼ果粒を多数有し、分葉核である好中球であることが明らかとなった。

細菌感染が、レーザーの場合にのみ認められた原因としては、レーザーによる切削の場合、窩洞の表面にスメア層が無く象牙細管が露出していること、また、これまで報告されている他のレーザーによる実験系よりも、窩洞底部から歯髄までの距離が短いこと、仮封していないことが考えられる。窩洞表面に象牙細管が露出しているために、口腔細菌の細管内部への侵入は容易であり、残存象牙質が薄いために、修復象牙質形成が行われる前に、細菌の影響が歯髄に到達したためと考えられる。細菌感染による病変が生じるに連れて、歯髄・象牙境から OX6 陽性細胞が減少し、好中

球浸潤が認められた。この現象は、スカベンジャーとしての好中球の機能を如実に表すと共に、炎症性細胞が、抗原提示細胞から好中球に移行したことを表している。他のレーザーによる切削においても、スメア層が存在しないことは同様であり、レーザー切削後の充填処置時には、従来の切削時以上に辺縁封鎖に対する配慮が必要であろう。

以上より、CrTmEr:YAG Laser による窩洞形成は、形成時に歯髄へ与えるダメージは同程度であるが、象牙細管経由の細菌感染ならびに歯髄・象牙境への急性炎症反応を惹起し、受傷部位への抗原提示細胞の遊走および象牙芽細胞の再生が妨げられ、正常な歯髄再生過程が妨げられることが明らかとなった。レーザー切削後の歯髄反応については、まだまだ不明な点も多いため、今後さらなる研究が必要であろう。

#### (6) 歯科用レーザー照射後の歯髄修復機構と細胞のダイナミクス:②半導体レーザーに対する歯髄反応(添付研究成果論文 12)

1964 年に Goldman らによってルビーレーザーの歯科臨床応用の可能性が報告されて以来、Argon, CO<sub>2</sub>, Nd:YAG, Er:YAG, GaAlAs 半導体といった様々な歯科用レーザーが開発され、レーザーが歯牙硬組織に与える影響について検討されてきた。歯内療法領域では歯髄診断、象牙質知覚過敏症、覆髄等への臨床応用が行われてきたが、その臨床応用は限られており、歯科用レーザー照射が象牙質・歯髄複合体へ与える影響については不明な点が多い。本研究は、現在象牙質知覚過敏症等に臨床応用が開始している半導体レーザー照射に対する象牙質・歯髄複合体の反応を明らかにするために、抗ストレスタンパク質 heat-shock protein (HSP)-25 抗体を用いた免疫組織化学により半導体レーザーに対する象牙芽細胞の反応性を検索した。

抱水クロラル(350mg/kg)深麻酔下にて、8 週齢 Wistar 系雄性ラットの右側上顎第一臼歯近心面に、GaAlAs 半導体レーザー(オサダライトサージ 3000)を用いて、照射出力を低出力(0.5W)・中出力(1.0W)・高出力(1.5W)に変化させ、60 秒間×3 回、計 180 秒間の接触照射を行った。照射 1~30 日後に、深麻酔下にて実験動

物を 4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流固定, 10%EDTA にて脱灰後, パラフィンならびに凍結切片を作製した。パラフィン切片用には, 通法に従ってアルコール脱水・パラフィン包埋後, 厚さ約  $5\mu\text{m}$  切片を作製し, H-E 染色を施した。また, 凍結切片用には, 厚さ約  $50\mu\text{m}$  切片を作製し, ABC 法にて抗 HSP-25 抗体を用いた免疫染色を行い, メチレンブルー対比染色を施した。また, 無処置の左側上顎第一臼歯を対照群とした。

本実験における半導体レーザー照射によって, 歯質の肉眼的損傷は認められなかったが, 歯髄における HSP-25 免疫反応がダイナミックに変化した。レーザー照射 6 時間後において, 低出力条件では象牙芽細胞が HSP-25 強陽性を持続していたが, 中・高出力条件では照射側の歯冠から歯根部歯髄にかけて HSP-25 免疫陽性反応の減弱もしくは消失と, 周囲歯髄および歯根膜の HSP-25 免疫活性の上昇が観察され, 照射出力の増加に伴って HSP-25 免疫陽性反応に変化が見られる範囲が拡大していた。照射 30 日後では, 低・中・高の各出力条件において照射側歯髄腔内に第三象牙質形成が認められたが, そのほとんどが骨形成を併発していた。既存の象牙質と第三象牙質との境界にはヘマトキシリンに濃染する石灰化傷害線が認められ, その形態学的特徴から象牙質と骨組織を容易に区別できた。また, 歯髄内に骨組織形成が認められた歯には, しばしば歯根吸収が認められた。第三象牙質形成部位には HSP-25 強陽性の象牙芽細胞が配列していたのに対し, 歯髄内骨組織周囲の HSP-25 免疫陽性反応は弱いことが判明した。

抗 HSP-25 抗体を用いた免疫組織化学により, ラット臼歯に GaAlAs 半導体レーザーを照射した際の歯髄反応, 特に象牙芽細胞の反応を観察することができた。窩洞形成や歯の再植によって傷害を受けた歯髄では, 早期に象牙芽細胞の HSP-25 陽性反応が消失し, 新たに歯髄・象牙質界面に配列した象牙芽細胞が HSP-25 免疫活性を獲得することが知られている。したがって HSP-25 免疫陽性反応の変化は, 歯の損傷後の歯髄治癒過程における象牙芽細胞の変性/再生現象を反映していると考えられ, レーザー照射後に HSP-25 陽性反応が消失することは, レーザー照射が象牙芽細胞に不可逆的変化を及ぼし, 歯

髄の損傷程度によっては歯髄内に骨組織が形成されたと考えられる。また, 象牙質・歯髄複合体における生物学的性質, 特に硬組織形成能力に関しては不明な点が多い。歯の再植後に歯髄内に第三象牙質と骨組織形成という二つの治癒過程が見られるが, 本実験結果は歯髄そのものが象牙質形成に加え骨組織形成能をもつことを示唆していると考えられる。以上をまとめると, 本実験では, 半導体レーザー照射によって象牙質の切削なしに歯髄腔内に硬組織形成が誘導されること, および, 照射出力の増加に伴って象牙芽細胞が不可逆的ダメージを受け, 歯髄の損傷程度によって歯髄内に骨組織形成が惹起されることが明らかとなった。また骨組織が形成されたものでは歯根吸収を併発する 경우가多く, 歯髄腔内での骨組織形成と歯根吸収との相関が伺われた。半導体レーザーの歯科臨床応用においては, 歯髄腔内に骨組織の形成を伴わずに第三象牙質形成を誘導するレーザーの適正照射出力を設定することが重要であると考えられた。

#### (7) 歯の再植後の歯髄修復機構と細胞のダイナミクス①ラット臼歯を用いた実験(添付研究成果原著論文 17)

象牙質・歯髄複合体は損傷に対する修復能力をもっており, う蝕, 咬耗・摩耗, 歯の切削などにより歯が損傷を受けると第三象牙質を形成して防御に働くが, 歯の再植後にも同様な防御機構が働くことが知られている。歯の再植とは, 意図的, もしくは外傷により偶発的に歯が歯槽窩から脱落してしまった場合, 歯をもう一度もとの歯槽窩(抜歯窩)に戻す処置である。歯の再植は歯科臨床で一般的に行われている処置法であるにもかかわらず, その後に歯髄でどのような変化が起こっているのかについての理解や歯の再植後の治癒を左右する歯髄の重要性についての認識は乏しい。これまでの研究により, 歯の再植後には, 歯髄腔内に第三象牙質が形成されることに加え, 骨組織が形成されることが知られている。しかしながら, 歯の再植後の歯髄治癒過程を規定するメカニズムについては明らかになっていない。

そこで, 本研究は, 硬組織形成細胞のマーカーとしてアルカリ性フォスファターゼ(ALP)酵素組織化学, 破骨細胞系細胞のマーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)酵素組織



化学ならびにカタペシン K 免疫組織化学, 象牙芽細胞の分化マーカーとしてストレスタンパク質 Heat Shock Protein (HSP)-25 免疫組織化学を用いて歯の再植後の歯髄の治癒過程を検索した。また, 切片作製前にマイクロ CT を用いて歯髄の治癒パターンをスクリーニングした。

材料として4週齢 Wistar 系ラットを用い, 右側上顎第一臼歯を深麻酔下にて抜歯後ただちに再植し, 無処置の左側上顎第一臼歯を対照群とした。再植後 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 28, 60 日に深麻酔下で灌流固定後, マイクロ CT により歯髄内硬組織形成の有無を観察した。引き続き EDTA にて脱灰後, 凍結切片を作製し, 抗 HSP-25 抗体, 抗カタペシン K (CK) 抗体を用いた免疫染色, ALP・TRAP 二重染色を施した。CK 免疫染色をした試料の一部は後固定・脱水後樹脂包埋し, 透過電顕にて観察した。

マイクロ CT 観察により, 再植歯の歯髄内硬組織形成過程や周囲組織の変化をスクリーニングできることが明らかとなった。再植後 12 日以降には, 歯髄内に形成される硬組織として第三象牙質と骨組織を区別することができ, 歯根吸収も明瞭に確認することができた。

酵素組織化学ならびに免疫組織化学的検索により, 再植後の歯髄治癒過程で HSP-25, ALP, TRAP, CK の発現パターンがダイナミックに変化することが明らかとなった。対照群では, 歯冠部象牙芽細胞が HSP-25 および ALP 強陽性を示し, 歯髄内には TRAP および CK 陽性反応は認められなかった。再植後 1~3 日では, 歯髄での HSP-25 および ALP 陽性反応が減弱し, 5~10 日で根尖側から歯冠歯髄にかけて HSP-25 および ALP 陽性反応が回復し, その後第三象牙質形成が観察された。一方, HSP-25 および ALP 陽性反応が回復しない場合には, 再植後 7 日以降に歯髄内に多数の TRAP および CK 陽性の単核および多核の破骨細胞系細胞が出現し, 象牙質・歯髄界面にもこれらの細胞が集積し, 象牙細管内へ細胞突起を伸ばしていた。再植後 12~60 日には歯髄腔内に骨組織形成が認められ, TRAP および CK 陽性細胞は骨表面に残存した。透過電顕による観察により, CK 陽性破骨細胞系細胞が核小体の明瞭な細胞内小器官の発達した間葉細胞と直接接触していることが明らかとなった。また,

ANOVA 検索により再植時間と再植後の歯根吸収との間に統計学的な有意差が認められた。

近年の骨代謝研究において, 破骨細胞の分化と機能発現が骨芽細胞/間質細胞による OPG, RANKL, M-CSF により調節されていることが明らかになっており, 骨芽細胞/間質細胞と破骨細胞前駆細胞との直接接触が破骨細胞分化に必須であることが知られている。本研究において, 歯髄腔内に TRAP および CK 陽性の破骨細胞系細胞と歯髄内間葉細胞との直接接触は, 再植後の歯髄内における破骨細胞分化と骨組織形成過程に起こるイベントであると考えられた。

一方, 第三象牙質形成が起こる場合には歯髄内には破骨細胞系細胞は出現せず, 象牙芽細胞もしくは象牙芽細胞に分化すると考えられている神経堤由来細胞による歯髄内における破骨細胞および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ことが推察された。最近の研究で歯髄細胞が OPG, RANKL, M-CSF などの破骨細胞分化調節因子を発現していることが明らかになっており, 歯髄内には骨代謝を抑制するメカニズムが存在することが報告されており, この事実も我々の仮説を支持するものと思われる。

以上より, 歯の再植後に歯髄内に TRAP および CK 陽性の破骨細胞系細胞が出現することが歯髄内骨組織形成の起点となることが明らかとなった。

#### (8) 歯の再植後の歯髄修復機構と細胞のダイナミクス②マウス臼歯を用いた実験(添付研究成果原著論文 27)

象牙質・歯髄複合体は損傷に対する修復能力を有しており, 咬耗・磨耗, 齲蝕, 歯の切削等により歯が損傷を受けると第三象牙質を形成して外界の刺激から自身を防御することが知られている。歯の再植とは意図的, もしくは外傷により偶発的に歯が歯槽窩(抜歯窩)から脱落してしまった場合, 歯をもう一度もとの位置に戻す処置である。歯の再植は, 歯科臨床で一般的に行われている処置法であるにもかかわらず, その後の歯髄でどのような変化が起こっているのかについての理解や歯の再植後の治癒を左右する因子についての認識は乏しい。これまでの研究により歯の再植後には,

歯髄腔内に第三象牙質が形成されることに加えて、骨組織が形成されることが知られている。さらに骨組織が形成される場合に、歯髄内に破骨細胞系細胞が出現することが明らかになっている。また、再植時間と歯根吸収との間にも有意関係が認められている。しかしながら、歯の再植後の歯髄治癒過程において再植後の歯髄治癒パターンを規定する因子については十分明らかになっていないのが現状である。そこで、本研究は、マウス臼歯再植実験モデルを確立し、象牙芽細胞の分化マーカーとして nestin 免疫組織化学、細胞増殖活性マーカーとしてブロモデオキシウリジン (BrdU) 免疫組織化学、破骨細胞系細胞のマーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 酵素組織化学を用いて、意図的再植時間の延長や咬合力がマウス臼歯再植後の歯髄治癒パターンに与える影響を検索した。

実験動物として生後 3 週齢の Crlj:CD1(ICR) マウスを用いた。抱水クロラル (350mg/kg) 腹腔内注射による麻酔後、上顎右側第一臼歯を歯科用ピンセットにて抜去し、直後に再植した群、30 分、1、2、3、6 時間生理食塩水中に浸漬した後に再植した群に分け、さらに対合歯抜去群と未抜去群に分け歯髄治癒パターンを検索した。術後 1、3、5、7、14 日後に BrdU を腹腔内投与し、分裂細胞をラベルし 2 時間後にアルデヒド系固定液で灌流固定、EDTA 脱灰、パラフィン切片を作製した。抗 nestin モノクローナル抗体および抗 BrdU を用いた免疫組織化学染色、TRAP 酵素組織化学染色を施し、光顕にて観察した。さらに、歯髄の BrdU 陽性細胞数を歯冠部と歯根部に分け統計解析 (LSD 検定) した。

対照群では、歯髄・象牙質界面に多列様を示す象牙芽細胞が nestin 陽性反応を示したが、歯髄内には TRAP 陽性反応は認められなかった。再植 3 日後までに nestin 陽性を示す象牙芽細胞が消失したが、1 日後に根尖部歯髄内に nestin 陽性の線維状構造物が出現し、その後歯冠方向に拡大していった。5 日後になると、歯根部から歯冠部にかけて nestin 陽性象牙芽細胞が配列を開始し、7 日後には歯髄全周に渡って nestin 陽性象牙芽細胞の配列が観察された。一方、nestin 陽性象牙芽細胞の配列が見られない標本も観察された。14 日以降では、歯髄治癒パターンは主に第三象牙質形成群、第三象牙質・骨様組織混

在群の 2 つに分けられたが、線維性組織置換群、炎症性反応群も観察された。また、実験期間を通して歯髄内 TRAP 陽性反応は大きな変化を示さなかった。歯髄内細胞増殖活性については、再植 3 日後になると歯根歯髄の増殖活性が増加し、5 日後には歯髄全体の増殖活性が増加した。その後増殖活性は減少したが、14 日後にも増殖活性が認められた。

一方、対合歯抜去群においては、第三象牙質形成の割合が高くなった。また、抜去後 30 分、1、2、3、6 時間生理食塩水中に浸漬した群においては、放置時間が長くなると第三象牙質形成群の割合が低くなり、線維性組織置換群や炎症性反応群の割合が増加した。

ラット臼歯再植実験モデルと比較して、マウス臼歯再植実験モデルは歯髄に与えるダメージが少ないと考えられ、そのことが歯髄内治癒パターンに影響し、第三象牙質が形成される割合が高くなることが示唆された。また、本実験群においては、骨様組織形成が見られる場合にも TRAP 陽性細胞の出現が希にしか見られず、ラット実験群と大きな違いを示した。一方、対合歯抜去群において、歯髄内第三象牙質形成群の割合が高くなることは、術後の咬合力が歯髄治癒パターンの負の因子として働くことが示唆された。さらに、意図的な再植時間の延長が歯髄内象牙質形成の割合を低くし、線維性組織置換群や炎症性反応群が増加することから、再植時間の延長が象牙芽細胞系細胞と骨芽細胞系細胞の比率や生存に影響を与えることが明かとなった。

以上より、意図的再植時間の延長と咬合力が象牙芽細胞系細胞の生存ばかりでなく、歯の再植後の歯髄治癒パターンに影響を与えることが明かとなった。

#### (9) 歯の移植後の歯髄修復機構と細胞のダイナミクス (添付研究成果原著論文 22)

歯の損傷に対して象牙質・歯髄複合体は高い防御機能を有しており、ひとたび象牙芽細胞が変性すると、歯髄間葉細胞は象牙芽細胞様細胞に分化し修復象牙質を形成することが知られている。一方、歯の再植後の歯髄修復過程において、歯髄内には第三象牙質が形成される場合に加え骨



組織が形成される場合が報告されており、歯髄組織の骨組織形成能が示唆されている。最近の研究では、歯髄幹細胞の骨形成能も示唆されており、歯髄間葉組織は神経堤由来と中胚葉由来のハイブリッドな組織であることが示されている。歯の再植後の歯髄内骨組織形成に関与する細胞として、歯髄組織の骨形成能に加えて、歯周組織の歯髄内硬組織形成への関与も否定できない。そこで、今回我々は、マウス上顎第一臼歯を抜去し、歯根、髄床底を除去し、歯周組織がない環境で、歯冠部を舌下部へ自家移植する実験系を確立して歯髄の分化能について検索した。

象牙芽細胞の分化マーカーについては象牙質リンタンパク質(DPP)、象牙質シアロタンパク質(DSP)、象牙質基質タンパク質(DMP-1)、ネスチン、ストレスタンパク質(HSP-25)が報告されているが、本研究では生後の歯と歯周組織で象牙芽細胞に特異的に発現するネスチンを象牙芽細胞分化マーカーとして用いた。3週齢ICR系マウスの上顎第一臼歯を深麻酔下で抜去後、歯根部および髄床底をメスにて切除し舌下部に自家歯牙移植を行った。術後1, 3, 5, 7, 10, 14, 28日後にブロモデオキシウリジン(BrdU)を腹腔内投与し分裂細胞をラベルし、2時間後に4%アルデヒド系固定液で灌流固定、10%EDTAにて脱灰・脱水後、通法に従いパラフィン包埋し、移植歯の矢状断パラフィン切片(厚さ5 $\mu$ m)を作製した。また、歯根・髄床底部の除去後移植をせずに固定したものをコントロールとした。切片はヘマトキシリンエオジン(H&E)染色、細胞増殖活性を抗BrdU抗体、象牙芽細胞の分化マーカーとして抗ネスチン抗体を用いた免疫染色を施し光学顕微鏡で観察した。さらに破骨細胞系細胞のマーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)活性を検索した。

移植1週間後までは歯冠部周囲の舌筋組織に加え、歯髄腔に炎症性細胞浸潤が観察された。術後1日では歯髄・象牙質界面に変性した象牙芽細胞に代わり好中球の集積が観察された。5~7日後には既存の象牙質に連続して象牙質形成が確認され、象牙質基質界面にはネスチン陽性の象牙芽細胞様細胞が配列し、移植歯内での象牙質再生が確認された。14日後になると、象牙質から離れた部位で骨組織形成が観察されたが、骨組織表面に配列した骨芽細胞はネスチン陰性を

示した。過去の歯髄の移植実験においては、まず骨組織形成が起こり、それに連続して象牙質形成が起こることが報告されている。さらに、象牙質基質には象牙芽細胞分化を促すシグナル分子が埋入されていることが示されており、象牙芽細胞の分化には象牙質や骨組織などの足場とシグナルが必要ながことが明らかになった。しかしながら、足場とシグナルだけでは象牙質形成には十分ではない。術後5日以降には歯髄腔内にTRAP強陽性細胞が増加し、その後の骨形成部位近傍にTRAP強陽性細胞が確認された。歯の再植実験では、歯髄内骨組織形成と破骨細胞系細胞の出現の相関が確認されており、移植歯においてもTRAP陽性の破骨細胞系細胞の出現と骨組織形成との関係が明かとなった。一方、象牙質形成過程においては、同じ単球・マクロファージ系の抗原提示細胞が歯髄・象牙質界面に出現することが報告されており、微小環境が破骨細胞系細胞か抗原提示細胞の出現を規定しているのかもしれない。実際に、本実験においても歯髄・象牙質界面にTRAP陽性細胞が出現すると骨形成が誘導される様である。

移植後の細胞増殖活性を調べると、移植歯周囲の舌筋組織では術後1日には高い増殖活性を示すのに対し、3日以降は増殖活性が低くなった。一方、歯髄腔内の細胞増殖活性は3日以降に増加し、実験期間を通して高い活性を示した。コントロールでは髄角部歯髄のみが残存しており、歯髄が高い細胞増殖活性を有していることが示唆された。しかしながら、本実験では歯髄内骨組織形成への移植歯周囲の舌筋組織の関与を否定できない。そこで、歯髄細胞を死滅させることを目的に歯冠部を熱湯に1もしくは2分間浸漬した後に移植した実験及び凍結-融解を繰り返した後に移植した実験を行い、2週間後に観察した。これらの実験群では、歯髄腔のボリュームの増加はみられず、歯髄腔内の骨組織形成と髄角部の象牙質形成が阻害された。以上より、歯髄腔内骨組織形成には歯髄組織が必須であることが明かとなり、歯髄内には象牙芽細胞系細胞と骨芽細胞系細胞の異なる細胞群が存在することが示唆された。

#### (10) 高齢ラット歯髄の免疫防御機能(添付研究成果原著論文21)

歯髄は高い修復能力を有しており、咬耗・磨

耗・齧蝕や窩洞形成等の歯の損傷に対して、第三象牙質を形成し外界の刺激から自身を防御することが知られている。これまでに我々は、100日齢ラット臼歯窩洞形成モデルを用いて歯の損傷後の歯髄修復過程を明らかにしている。すなわち、象牙質の切削後に損傷を受けた象牙芽細胞は層構造を失いバラバラになり6時間後にマクロファージに処理され、12時間後には抗原提示細胞が歯髄・象牙質界面に一過性に現れ、その細胞突起を象牙細管に伸ばす。3日後になると新たに分化した象牙芽細胞が歯髄・象牙質界面に配列し、抗原提示細胞は象牙芽細胞下層に移動する。さらにストレスタンパク質 heat-shock protein (HSP)-25 の発現パターンが象牙芽細胞の変性・再生過程を反映していることが明らかになっている。しかしながら、加齢に伴う歯の損傷に対する歯髄反応ならびに歯髄免疫防御機構の変化については不明な点が多い。

そこで本研究では、歯髄免疫防御機構の加齢変化を明らかにするために、これまでに明らかにしてきた成獣ラットの所見と比較して、高齢ラットでの歯牙切削に対する歯髄の反応性について免疫組織化学的に検索した。

実験動物として生後300~360日齢 Wistar 系ラットを用いた。上顎左側第一臼歯近心面にエアタービンにて注水下でグループ状に窩洞形成を施した。窩底部残存象牙質の厚みを150~200  $\mu\text{m}$  とし、仮封等の処置は行わず開放状態とした。尚、無処置の右側第一臼歯を対照群とした。窩洞形成直後、6, 12, 24 時間、3, 5 日後にアルデヒド系固定液にて灌流固定、EDTA 脱灰後、凍結およびパラフィン切片を作製した。象牙芽細胞の分化マーカーとして抗 HSP-25 ポリクローナル抗体および抗 nestin モノクローナル抗体、抗原提示細胞のマーカーとして OX6 モノクローナル抗体を用い、ABC 法にて免疫組織化学染色を行った。また、一部の試料は、HSP-25 免疫染色後、オスミウム後固定、脱水、樹脂包埋後、準超薄・超薄切片を作製し、光顕、電顕にて観察した。一方、歯髄周辺部の OX6 陽性細胞分布密度を比較するために100日齢ラット第一臼歯の OX6 免疫染色標本を作製した。

高齢ラットでは、象牙芽細胞が HSP-25 免疫強陽性を示したが、髄角における第三象牙質形成、咬頭間領域や髄床底部における第二象牙質形成により歯髄腔が狭窄していた。さらに、歯髄周辺部の OX6 陽性細胞密度が有意に増加し、象牙前質にも存在していた。

窩洞形成を行うと、高齢ラットでは2つの異なる反応 (severe damage, mild damage) が観察された。すなわち、前者の反応では、成獣ラットと同様に、窩洞形成直後に象牙芽細胞が損傷を受け、12時間後には抗原提示細胞が一過性に歯髄・象牙質界面に出現し、細胞突起を象牙細管内へ伸ばしていた。24時間後には歯髄・象牙質界面より HSP-25 陽性の象牙芽細胞が消失したが、3日後には歯髄・象牙質界面に HSP-25 陽性の再生象牙芽細胞が配列した。しかし、成獣ラットに比べ浸出性変化は少なく歯髄での炎症反応が穏やかだった。一方後者の反応では、窩洞形成6~24時間後において損傷部位の HSP-25 強陽性象牙芽細胞が層構造を維持していた。しかし、12時間後には前者の反応と同様に抗原提示細胞が一過性に歯髄・象牙質界面に出現し、細胞突起を象牙細管内へ伸ばしていた。同部位を透過電顕にて観察すると、損傷部位の象牙細管が空になっているものもみられ、樹状細胞や好中球が空の細管に侵入していた。このことは、象牙芽細胞によっては損傷を受けずに生き残る細胞がいることを示唆しており、細胞によって象牙細管もしくは細胞突起の状態が異なることが推測された。

興味深いことに、高齢ラットの歯髄内では、歯髄周辺部で抗原提示細胞密度が増加し、同細胞が象牙前質にも存在していた。ヒトの歯でも同様の現象がみられ、抗原提示細胞が複数の象牙芽細胞突起とコンタクトしており、象牙芽細胞の恒常性への関与が推測されている。今後、電顕レベルで抗原提示細胞と象牙芽細胞突起の関係を明らかにする必要がある。

以上の結果より、高齢ラットにおいて歯髄防御・修復機能が保持されていることが明らかとなったが、窩洞形成後の象牙芽細胞の反応性に違いが観察された。このことにより、高齢ラットでは個体により象牙芽細胞の突起もしくは細管内の状態が異なることが予想され、この違い

が窩洞形成後の歯髄反応の多様性を引き起こしていると考えられた。

### (11) おわりに

歯の損傷後に歯髄が高い修復能力をもっているのは、間違いなく局所に存在する細胞の分化能に因るところが大きい。歯髄修復に関わる細胞の供給源になる歯髄組織幹細胞について、その存在については異論がないところであるが(Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 13625-13630, 2000), その存在部位については推測の域を出ておらず、明らかになっていないのが現状である。また、歯髄が骨組織形成能を含めた多分化能をもつ可能性について述べたが、多分化能をもつ一つの幹細胞が存在するのか複数の由来をもつ幹細胞が複数存在するのか否かについても明らかになっていない。歯の損傷後に歯髄腔内に骨組織形成が起こると、歯根吸収やアンキローシス(骨性癒着)が惹起され易いことから、将来の歯髄細胞を用いた歯科再生医療を実現するのにあたり、歯髄組織幹細胞を単離する技術やその分化能を明らかにすることは極めて重要な問題である。

現在我々は、毛包の幹細胞を明らかにした手法(Nature 438: 1026-1029, 2005)を参考に、歯髄組織幹細胞の局在をブロモデオキシウリジン(BrdU)法にて明らかにすることに成功した(未発表データ)。我々の結果は従来考えられていたものと異なり、歯の損傷後の歯髄における細胞増殖活性の結果(論文未発表データ)とを総合すると、これまでの認識を覆す歯髄修復における細胞のダイナミクスが予想される。この様に幹細胞をラベルした動物(ラット、マウス)を使って、歯の損傷後の歯髄治癒過程における幹細胞の動態を調べることで、歯髄組織幹細胞の分化能を明らかにすることが可能になることから、今後成体に存在する体性幹細胞(間葉系幹細胞)である歯髄組織幹細胞の局在とin vivoにおける分化能を解明すること、そして、歯髄組織幹細胞を単離して、その分化能を検索すること、さらに、歯髄組織幹細胞と歯胚上皮細胞を用い、組織工学的に歯胚再生を試みる将来の歯科再生医療を見据えた研究を計画している。

## 添付研究成果論文リスト

- 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(2): 1-13, 2004.
- 2) **Harada H, Ohshima H**: New perspectives on tooth development and dental stem cell niche. Arch Histol Cytol 67(1): 1-11, 2004.
- 3) Suzuki T, Nomura S, Maeda T, **Ohshima H**: An immunocytochemical study of pulpal responses to cavity preparation by laser ablation in rat molars by using antibodies to heat shock protein (Hsp) 25 and class II MHC antigen. Cell Tissue Res 315(3): 311-319, 2004.
- 4) Asawa Y, Aoki K, Ohya K, **Ohshima H**, Takano Y: Appearance of electron-dense segments: indication of possible conformational changes of pre-mineralizing collagen fibrils in the osteoid of rat bones. J Electron Microsc 53(4): 423-433, 2004.
- 5) 大島勇人: 歯の発生研究の展望と歯の幹細胞ニッチェ: 常生歯形成端を示す新用語apical budの提唱, 「最近のトピックス」, 新潟歯学会雑誌 34(1): 53-55, 2004.
- 6) 大島勇人: My Cell 象牙づくりの職人 象牙芽細胞の生涯に迫る. ミクロスコピア 21(3): 182-189, 2004.
- 7) 大島勇人: 歯の再植後の歯髄治癒過程からみる象牙質・歯髄複合体の生物学的特性. 日本歯科評論 64(10): 93-100, 2004.
- 8) 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(2): 103-107, 2005.
- 9) **Ohshima H**, Nakasone N, Hashimoto E, Sakai H, **Nakakura-Ohshima K**, **Harada H**: The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. Arch Oral Biol 50(2): 153-157, 2005.
- 10) Masuyama T, Miyajima K, **Ohshima H**, Osawa M, Yokoi N, Oikawa T, Taniguchi K: A novel autosomal recessive mutation *whitish chalk-like teeth (wct)* resembling amelogenesis imperfecta maps to rat chromosome 14 corresponding to human 4q21. Eur J Oral Sci 113(6): 451-456, 2005.
- 11) **Suzuki H**, Amizuka N, Oda K, Li M, Yoshie H, **Ohshima H**, Noda M, Maeda T: Histological evidences on altered distribution of osteocytes and bone matrix synthesis in klotho-deficient mice. Arch Histol Cytol 68(5): 371-381, 2005.
- 12) 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(1): 50-57, 2006.
- 13) **Harada H**, Ichimori Y, Yokohama-Tamaki T, **Ohshima H**, Kawano S, Katsube K, Wakisaka S: Stratum intermedium lineage diverges from ameloblast lineage via Notch signaling. Biochem Biophys Res Commun 340(2): 611-616, 2006.

- 14) Yokohama-Tamaki T, **Ohshima H**, Fujiwara N, Takada Y, Ichimori Y, Wakisaka S, Ohuchi H, **Harada H**: Cessation of Fgf-10 signaling leads to the transition from crown to root formation due to a defective dental epithelial stem cell compartment. *Development* 133(7): 1359-1366, 2006.
- 15) Kajiya H, Ito M, **Ohshima H**, Kenmotsu S, Ries W, Benjamin I, Reddy S: RANK ligand expression in Heat shock factor-2 deficient mouse marrow stromal/preosteoblast cells. *J Cell Biochem* 97(6): 1362-1369, 2006.
- 16) Nakasone N, Yoshie H, **Ohshima H**: An immunohistochemical study of the expression of heat-shock protein-25 and cell proliferation in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in rat molars. *Arch Oral Biol* 51(5): 378-386, 2006.
- 17) 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(2): 219-229, 2006.
- 18) Kim JY, Cha YG, Cho SW, Kim EJ, Lee MJ, Lee JM, Cai J, **Ohshima H**, Jung HS: Inhibition of apoptosis alters tooth shape and size: implications for macrodontia. *J Dent Res* 85(6): 530-535, 2006.
- 19) Kim E, Cho SW, Yang JY, Cai JL, Lee SJ, **Ohshima H**, Jung HS: Tooth survival and periodontal tissues healing of allo-transplanted teeth in the mice. *Oral Diseases* 12(4): 395-401, 2006.
- 20) Nakasone N, Yoshie H, **Ohshima H**: The relationship between the termination of cell proliferation and expression of heat-shock protein-25 in the rat developing tooth germ. *Eur J Oral Sci* 114(4): 302-309, 2006.
- 21) Kawagishi E, Nakakura-Ohshima K, Nomura S, **Ohshima H**: Pulpal responses to cavity preparation in aged rat molars. *Cell Tissue Res* 326(1): 111-122, 2006.
- 22) Ogawa R, Saito C, Jung HS, **Ohshima H**: Capacity of dental pulp differentiation after tooth transplantation. *Cell Tissue Res* 326(3): 715-724, 2006.
- 23) 大島勇人: 最近のトピックス: 歯髄細胞の由来に関する最近の知見. *新潟歯学会雑誌* 36(2): 249-253, 2006.
- 24) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄修復機構. *歯科臨床研究* 4(1): 49-57, 2007.
- 25) Cho KW, Cho SW, Oh CO, Ryu YK, **Ohshima H**, Jung HS: The effect of cortical activation on orthodontic tooth movement. *Oral Diseases* 13(3): 314-319, 2007.
- 26) Cho SW, Lee HA, Cai J, Lee MJ, **Ohshima H**, Jung HS: The primary enamel knot determines the position of the first buccal cusp in developing mice molars. *Differentiation* 2007 in press.
- 27) 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* 2007 in press.