

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 水越 優
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 453 号
学位授与の日付 令和 2年 3月 23 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 矯正の歯の移動時における歯根膜の細胞動態

論文審査委員 主査 教授 齋藤 功
副査 教授 大峽 淳
副査 教授 魚島勝美

博士論文の要旨

【背景・目的】

歯根膜は歯と歯槽骨を固定する結合組織で、セメント質と歯槽骨の 2 つの石灰化組織の間に存在する極めて薄い非石灰化層である。力学的刺激に鋭敏に反応する歯根膜の細胞特性が矯正の歯の移動を可能にしていると考えられているが、力学的刺激下での細胞動態の詳細は依然として不明である。一般に幹細胞は培養条件下において高い増殖活性を有するが、生理的条件下の生体内における増殖活性は極めて低いことから、幹細胞の一部は標識物質の核内取り込みとそれに続く長期追跡により Label-retaining cells (LRCs) として検出が可能である。生涯成長を続けるマウス切歯においては LRCs から生じる増殖活性の極めて高い Transit-amplifying cells (TACs) への移行が組織の維持に不可欠であることが知られている。したがって、組織中の細胞増殖活性を解析することにより、組織幹細胞を起点とする歯根膜組織の恒常性維持に必要な細胞動態を明らかにすることが可能になると考えられる。本研究では、マウス臼歯に矯正力を負荷した際の歯根膜組織における細胞の増殖動態を明らかにすることを目的とした。

【試料および方法】

LRCs 検出のため、生後 15 日齢のマウスに 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を 5 日連続で腹腔内投与し 6、12 週間後に屠殺して組織標本を作製した。8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスと、細胞周期を蛍光タンパクの発現により観察できる Fucci2 マウス、および単一細胞由来の細胞クラスターを追跡できる RGBow: UBC-CreER^{T2} (RGBow) マウスを使用した。上顎左側第一臼歯と切歯間に 25 gf Ni-Ti coil を装着した。屠殺 6、12 時間前に EdU を腹腔内投与し、増殖期細胞の標識を行った。装置装着から 24、36、72 時間、7 および 14 日後に屠殺、脱灰パラフィン包埋組織標本を作製して組織学的に観察を行った。上顎左側第一臼歯遠心根周囲歯根膜を観察領域とし、右側同部位を対照群とした。また、組織標本上で Fucci2 マウスが発現する蛍光タンパク、および EdU 陽性細胞における歯原性間葉系幹細胞マーカー (Gli1)、TACs マーカー (Ring1b)、骨芽細胞系分化マーカー (Cbfa1/Runx2、Osterix) を免疫組織学的手法により検出した。

【結果】

15日齢のマウスへの5日間のEdU投与により、歯根膜細胞の約40%が標識された。その後6、12週間の追跡により、EdU陽性のLRCs率は7.7%、3.0%へと減少した。6週間後にLRCsの組織内局在はみられなかったが、12週間後ではセメント質表面に限局して存在した。LRCsのうち歯原性間葉細胞マーカーであるSox9、Gli1に陽性な細胞はそれぞれ49.3%、26.4%であった。

Ni-Ti coilの装着により第一臼歯が近心側に正常に移動したことをマイクロCTで確認した後、HE染色で、左側第一臼歯遠心根の近心側（圧迫側）および遠心側（牽引側）での歯根膜組織変化を観察した。牽引側では矯正力の負荷後36時間で歯根膜線維の伸長を認めた。一方、圧迫側では歯根膜腔が狭窄し、歯槽頂近傍では細胞成分が消失した。本研究では、矯正的歯の移動時における細胞増殖動態の解析を目的としているため、以降は牽引側のみを解析対象とした。

Ni-Ti coilを装着したマウスにEdUを腹腔内投与し、増殖期細胞の標識を行った。EdU陽性の増殖期細胞は対照群では極めて低かったが、矯正力の負荷後36時間で最大となり、時間の経過とともに減少した。歯根膜内でのEdU陽性細胞の明らかな局在は認めなかった。また、Fucci2マウスにおいて、対照群では歯根膜細胞の大部分が静止期にあったが、矯正力の負荷から36時間後では劇的に減少した。これらの結果は、大部分の歯根膜細胞が矯正力にตอบสนองして細胞周期の状態を変化させたことを示している。増殖期細胞中のRing1b陽性細胞率は39.6%、Gli1陽性細胞率は26.5%、Runx2/Cbfa1陽性細胞率は26.1%、Osterix陽性細胞率は15.6%であった。矯正力に誘導される増殖期細胞は一定のTACsを含むものの、多様な細胞集団であると考えられる。さらに、RGBowマウスを用いた単一細胞に由来する細胞クラスターの形成において、クラスター中の平均細胞数は、対照群では1.17、矯正モデルでは1.27であり、統計的有意差は認めなかった。また、細胞クラスターの局在は認められなかった。

【考察】

本研究ではマウス臼歯歯根膜における細胞動態を明らかにすることを目的とし、矯正力を負荷した環境下における歯根膜組織中の細胞増殖活性の解析を行った。組織幹細胞であると考えられるLRCsは歯根膜のセメント質近傍に検出されたのに対し、矯正力に誘導される増殖期細胞は歯根膜全域に観察された。これらの結果から、矯正力に誘導された増殖期細胞は、必ずしもLRCsから生じてはいない可能性を示唆しており、LRCsが組織内で幹細胞として機能しているかについては更なる検証が必要である。本研究の結果から、歯根膜における細胞代謝は特定の幹細胞を起点とする一方向性の階層的な分化軌跡によるものではなく、細胞の分化度という点からは、揺らぎの多い可逆的な確率論的な軌跡によるものである可能性が考えられる。

【結論】

本研究により、矯正力によって歯根膜に誘導される増殖期細胞の特性と細胞動態の一部が明らかとなった。

審査結果の要旨

歯科矯正治療は、力の負荷によって歯根膜のリモデリングを促進し、圧迫側には骨の吸収を、牽引側には骨の添加を誘導することによって歯の移動を可能としている。矯正力による歯の移動は、既に確立された術式として臨床応用されているが、個々の患者毎における負荷プロトコルの妥当性や、予期せぬ副作用等、依然として未解明な点も多い。ダイナミックな歯周組織の改変を伴う歯科矯正治療では、細胞レベル

での組織変化を理解することが不可欠であるが、力学的刺激によって変化する細胞動態の詳細、中でも幹細胞の組織改変に対する寄与については依然として不明である。

組織のリモデリングには幹細胞が細胞の供給源として重要な役割を果たしていると考えられている。幹細胞の分化様式は多様であるが、その代表的なものの一つとして、階層的分化様式 (Label-Retaining Cell (LRC) → Transit-Amplifying Cell (TAC) → 終末分化細胞) の存在が知られている。本研究は、細胞増殖活性の解析により、マウス臼歯歯根膜における幹細胞を起点とした階層的分化様式の存在について明らかにすることを目的としている。

その結果、本研究では標識細胞の長期追跡により、歯根膜組織中には細胞増殖活性の極めて低い LRC がセメント質近傍に限局して存在することを明らかにした。LRC は歯原性幹細胞マーカーだけでなく、石灰化系分化マーカーに陽性の細胞を含む多様な細胞集団であった。また、矯正力の負荷は一過性に歯根膜全域に増殖期細胞を出現させた。LRC と矯正力に誘導される増殖期細胞の局在の違いは、増殖期細胞が必ずしも LRC から出現しているわけではないことを示しており、矯正力により出現した増殖期細胞の全てが TAC ではないと考えられる。増殖期細胞のマーカー発現においても、TAC のマーカーに陽性の細胞だけでなく、他の分化マーカーに陽性の細胞も数多く観察されている。これらの結果は、矯正力による歯根膜の組織改変は、特定の幹細胞のみが応答するのではなく、組織中に存在する多様な細胞が応答していることを示している。したがって、矯正力による歯根膜の組織改変では、少数の幹細胞のみが細胞供給源となるわけではなく、総数の遥かに多い終末分化した細胞が個々に応答して増殖することにより、迅速な組織改変を可能にしていると考えられる。

矯正力による歯根膜組織中の増殖期細胞の増加は、極めて初期 (36 時間後) に一過性に観察され、歯の移動が顕著となる 1-2 週間後では限定的であった。力学的刺激に対する初期の鋭敏な反応と、歯の移動時における増殖期細胞の特性は異なっている可能性があり、今後はより後期の細胞特性の解析も必要であると考えられる。

本研究の結果からは、マウス臼歯歯根膜において LRC を起点とする一方向性の階層的な分化様式は観察されなかった。幹細胞の分化には、確率論的な分化様式や、終末分化した細胞が幹細胞能を再獲得する可逆性の分化様式の存在も報告されている。幹細胞能の再獲得についてはさらなる検証が必要であるが、臨床的にもその挙動予測が困難である歯根膜組織の特性は、細胞分化様式の特異性によるものである可能性が推察される。

過去の研究報告では、歯根膜中には間葉系幹細胞マーカーに陽性の細胞が血管構造の豊富な骨側に局在することが報告されている。これらの細胞は培養条件下における多分化能が確認されているが、組織中での挙動は確認されていない。本研究において、矯正力による細胞増殖活性ならびにクラスター形成に組織内局在は認められておらず、血管近傍の間葉系幹細胞マーカーに陽性の細胞による組織改変への寄与を肯定するものではないことから、既知の歯根膜幹細胞の組織内動態についても再検証が必要であると考えられる。

歯科矯正治療において、歯根膜に存在する多様な細胞の増殖動態を理解することは、新たな治療戦略の立案や、予期せぬ副作用の克服を目指す上での、基盤的情報として極めて有用である。本研究は、矯正力に誘導される歯根膜の細胞増殖動態を明らかにした点において、学位を授与するに相応しい研究であると判断した。