

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 中木 哲朗
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大博(歯)第189号
学位授与の日付 平成30年6月29日
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
博士論文名 Donor- host tissue interaction in allogenic transplanted tooth germ with special reference to periodontal tissue
(他家歯牙移植におけるドナー・ホスト相互作用: 歯周組織に着目して)

論文審査委員 主査 教授 大島 勇人
副査 教授 大峽 淳
副査 教授 田沼 順一

博士論文の要旨

【緒言】

顎発達中で欠損歯をもつ若年患者にとって、顎成長に咬合を調節させるためには、第三臼歯歯胚自家移植は欠損補綴に利用できる手法であろう。他家歯牙移植は、自家歯牙移植の場合に適切なドナーの歯が利用できない成人患者にとっても欠損補綴法の選択肢となる。最近我々は、生後1~2日齢マウスの下顎第一臼歯を2週齢のマウス上顎第一臼歯の歯槽窩に移植する他家歯牙移植のマウス動物実験モデルを確立し、発達中の移植歯で起こるダイナミックなドナー・ホスト相互作用が歯髄の特徴に影響を及ぼすことを示唆している。しかしながら、歯牙移植後の歯周組織におけるドナー・ホスト相互作用に関する生物学的エビデンスはほとんどない。

我々は BrdU 胎生期ラベリング法で、歯髄中の長期ラベル保持細胞(LRCs)、すなわち歯髄幹細胞/前脈絡細胞を同定することに成功した。しかしながら、この方法は歯樹膜(PDL)中の BrdU-LRCs を同定できなかったため、我々はドキシサイクリン誘発型 H2B-GFP 遺伝子組み換えマウスを使わなければならない。

PDL は歯小囊(DF)由来と別の細胞集団から構成されると仮定できるが、PDL の由来はまだ明らかになっていない。したがって、本研究は、歯の発生中の固有 PDL 細胞と移行細胞間の関係を明らかにするために、胎生期 BrdU ラベリング法、H2B-GFP マウス、GFP マウスを組み合わせた歯牙移植を用い、ドナー・ホスト相互作用を検索することを目的とした。

【材料と方法】

マウス胎生期 BrdU ラベリング法に従い、BrdU (150 mg/kg) 臍腔内注射を妊娠 WT マウスに3回(胎生15~17日齢に1日1回)与えた。下顎第一臼歯歯胚がラベルされた新生マウス(1~2日齢)から切り出され、非ラベルマウス(12~14日齢)上顎右側第一臼歯(M1)抜去後に歯槽窩に他家移植された。同様に、GFP 遺伝子改変マウスおよび野生型マウス間、ICR マウス間でも歯牙移植を行った。

生後の動物の成体組織における BrdU-LRCs をマップするため、BrdU (150 mg/kg body weight) を妊娠 ICR マウス臍腔内に3回(胎生15~17日齢に一度)注射した。本実験では、生後1~21日の ICR マウスと/またはドキシサイクリンが胎生14.5日に飲料水に加えられた TetOP-H2B-GFP マウスが使われた。歯牙移植の材料は、3~7匹の非ラベルホスト ICR と B6 マウスの群と1~2匹の GFP と野生型動物の群から集められ、各段階で灌流固定された。脱灰後、標本がパラフィンに包埋され、5 µm 厚の歯の矢状断切片が作製された。BrdU、Gli1、ペリオスチン、GFP 免疫組織化学を行い、統計解析した。

【結果と考察】

本研究での GFP マウスを用いた歯牙移植は、免疫拒絶反応が起こらない場合で、ほとんどのドナー由来細胞が PDL の歯に関連した区域に局在していた。もし免疫拒絶反応が惹起されると、歯に関連した区域に存在するほとんどの細胞が消失し、PDL は在生成体幹細胞を含むもとの組織とは異なった組織となる。移植歯の PDL の歯槽窩に関連した区域は、ホスト組織由来の別の細胞集団を主に含むことになるであろう。

本解析で TetOP-H2B-GFP マウスを用いた臼歯発生中の PDL 中の濃染 H2B-GFP-LRC は、生後から 3~8 週でさえ PDL 中に分布していることが示された(12~18%)。LRCs は静脈的な成体幹細胞であると推定されているので、PDL 中のこれらの細胞の密な分布はその高い可塑性と関係しているかもしれない。3 回の BrdU 腹腔内注射を用いた胎生期 BrdU ラベリング法は、PDL 中の BrdU-LRCs を検出できず、胎生 15~17 日に活発な細胞増殖を欠く細胞集団が生後 3 週の PDL を構成することを示している。GFP マウスを用いた他家歯胚移植の本実験は、本実験が正常の歯の発生を模倣しているように、PDL の由来、すなわち DF 由来細胞と非 DF 由来細胞との関係を証明した。DF 由来細胞(ドナー細胞)が主に歯に関連した区域に局在しており、非 DF 由来細胞は歯槽骨に関連した区域に局在している。さらに、歯の表面に直接付着する上皮構成要素である接合上皮(JE)がドナーのエナメル器細胞に由来することを明らかにした。

ペリオスチン免疫組織化学は、歯胚移植の場合に、ペリオスチン陽性細胞が術後 5 日に歯髄中に現れ、2 週までに増加し、象牙芽細胞層と根尖部を除き歯髄中に分布するようになった。ペリオスチンはヒトとマウス PDL 組織で特異的にそして強く発現し、ペリオスチン発現は PDL 細胞分化中に強くなるので、PDL 細胞が移植歯胚の発生中に歯髄腔に遊走すると考えるのは理にかなっている。

審査結果の要旨

顎発達中で欠損歯をもつ若年患者にとってデンタルインプラントは禁忌であるので、顎成長に咬合を調節させるためにはデンタルインプラントの代わりに、第三大臼歯歯胚自家移植は欠損補綴に利用できる手法であろう。他家歯牙移植は、自家歯牙移植の場合に適切にドナーの歯が利用できない成人患者にとっても欠損補綴法の選択肢となる。しかしながら、他家歯胚移植での歯周組織におけるドナー・ホスト相互作用に関する生物学的エビデンスはほとんどない。本研究は、将来の歯科臨床における他家歯胚移植を視野に入れ、歯胚移植後の歯周組織台癒過程におけるドナー・ホスト組織相互作用を明らかにすることを目的として、間欠投与追跡パラダイム(胎生期 BrdU ラベリング法: E15~17 に腹腔内注入)と TetOP-H2B-GFP マウス(E14.5 にドキシサイクリン投与)を用いて歯根膜(PDL)内の推定幹細胞の局在と、BrdU、Gli1、ペリオスチン免疫反応を比較する研究方略を用いている。さらに本研究は、GFP ラベルされたドナーまたはホストマウスを用い、間欠投与追跡パラダイムと GFP、BrdU、Gli1、ペリオスチン免疫組織化学により、動物モデルにおける他家歯胚移植後の歯周組織の治癒を特徴づけた。

本研究の ICR マウスを使用した歯胚移植では、歯髄組織が象牙芽細胞を欠く疎な結合組織に置き換わるのに対し、移植歯では歯周組織は正常な外観を呈しており、キラー T 細胞による免疫攻撃の後、ドナー由来の歯周組織幹細胞がホスト由来の細胞に置換したことを示唆している。この現象は、ICR マウスを用いた他家歯牙移植の場合の結果と一致する。現在、歯の移植は自家手術の範疇で行われている。もし歯牙移植の適応を他家移植まで含めれば、この治療を受ける患者の機会がかなり増えるであろう。歯髄が他家移植のため免疫拒絶反応により除去されたとしても、他家歯牙移植後の歯周組織が正常に治癒するので、移植歯が歯内療法により長期間維持されることから、他家歯牙移植の臨床応用の可能性を示唆している。

本研究での GFP マウスを用いた歯牙移植では、ほとんどのドナー由来細胞が PDL の歯に関連した区域に局在していた。もし免疫拒絶反応が惹起されると、歯に関連した区域に存在するほとんどの細胞が消失し、PDL は在住体幹細胞を含むもとの組織とは異なった組織となる。移植歯の PDL の歯槽骨に関連した区域は、ホスト組織由来の別の細胞集団を主に含むことになるであろう。

本研究での TetOP-H2B-GFP マウスを用いた臼歯発生中の PDL 中の濃染 H2B-GFP-LRC は、生後から 3~8 週でさえ PDL 中に分布していることが示された。LRCs は静脈的な成体幹細胞であると推定されているので、PDL 中のこれらの細胞の密な分布はその高い可塑性と関係しているかもしれない。3 回の BrdU 腹腔内注射(胎生 15~17 日で日に一度)を用いた胎生期 BrdU ラベリング法は、PDL 中の BrdU-LRCs を検出できず、胎生 15~17 日に活発な細胞増殖を欠く細胞集団が生後 3 週の PDL を構成することを示している。対照的に胎生期 BrdU ラベリング法で同定された BrdU-LRCs が 3 週ですら歯髄中に維持されており、このことは、その由来に関して歯髄幹細胞/前駆細胞は PDL 中の幹細胞前駆細胞とは全く異なるものであることを示唆している。H2B-GFP-LRCs の数が Gli1 陽性細胞の数より減少しているものの、3 週で PDL 中の H2B-GFP-LRCs と Gli1 免疫陽性細胞の発現パターンが一致していることは、歯髄中で BrdU-LRCs と Gli1 の陽性細胞が共局在することと同様である。したがって、神経発生、乳腺発生、毛の形態形成、歯髄の発生の様な他の組織同様、PDL 中の静脈幹細胞が Shh シグナリングで調節されていると考えられる。

GFP マウスを用いた他家歯胚移植の本実験は、本実験が正常の歯の発生を模倣しているように、PDL の由来、すなわち DF 由来細胞と非 DF 由来細胞との関係を証明した。DF 由来細胞(ドナー細胞)が主に歯に関連した区域に局在しており、非 DF 由来細胞は歯槽骨に関連した区域に局在している。上述の様式、H2B-GFP-LRCs は PDL 中にもっぱら分布しているというエビデンスから判断し、非歯小嚢由来の LRCs の分布は低いと思われる。

ペリオスチン免疫組織化学は、歯胚移植の場合に、ペリオスチン陽性細胞が術後5日に歯髄中に現れ、2週までに増加し、象牙芽細胞層と根尖部を除き歯髄じゅうに分布するようになった。ペリオスチンはヒトとマウスPDL組織で特異的にそして強く発現し、ペリオスチン発現はPDL細胞分化中に強くなるので、PDL細胞が移植歯胚の発生中に歯髄腔に遊走すると思われる。この概念は、同実験で推定される樹状細胞と上皮細胞を含む宿主細胞が歯髄組織に移住したというエビデンスにより支持される。興味深いことに、免疫反応の強度はかなり低いが、本研究ではペリオスチン陽性細胞が自然の歯の発生過程でさえ歯髄腔に現れ、PDL細胞が歯髄組織に遊走または歯髄細胞がPDL型の表現型に形質転換したことを示唆している。

JEと歯に関連した区域のPDLは、もっぱらドナー細胞由来で、一方歯槽骨に関連したPDLはドナーとホストのハイブリッドな構成であった。H2B-GFP-LRCsは、術後3～8週でTetOP-H2B-GFPマウスのPDLに局在しており、PDL中のGli1陽性細胞は術後2～3週で増加した。したがって、H2B-GFP-LRCsすなわちPDL中の推定幹細胞は、3回の腹腔内注射のBrdUでPDL中のBrdU-LRCsを検出できなかったため、胎生15～17日の非増殖細胞由来のものである。歯胚移植の本研究は、PDL推定幹細胞を含むものは、胎生15～17日非増殖細胞で、歯小嚢固有由来と他の細胞集団で構成することを示している。

以上、本研究結果は、他家歯胚移植での歯周組織におけるドナー・ホスト相互作用を細胞レベルで明らかにしており、将来の歯科臨床における他家歯胚移植を視野に入れ、歯胚移植後の歯周組織台癒過程におけるドナー・ホスト組織相互作用解明の糸口となる重要な知見を提示しており、歯周組織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。