

学 位 論 文

象牙芽細胞の枯渇は象牙芽細胞分化と象牙質形成を誘導する

趙 麗娟

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織発生再生工学
(主指導教員:各務 秀明 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Depletion of odontoblasts induces odontoblastic differentiation and dentin formation

Lijuan Zhao

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Hideaki Kagami)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph. D. (in Dentistry)

目次

	ページ
1. 略号, 略号・用語の説明	P.2
2. 要旨	P.4
3. 緒言	P.5
4. 実験材料及び方法	P.7
1) 動物	
2) 試薬および抗体	
3) 組織観察	
① パラフィン切片による解析, ②凍結切片による解析	
4) 薬剤の投与方法	
① カルセインの投与方法	
② ジフテリア毒素の投与方法	
③ PTH の間歇投与方法	
5) DTR, PTH/PTHrP 受容体およびリン酸化 CREB の免疫染色(パラフィン切片)	
6) in situ ハイブリダイゼーション	
7) Micro-CT 解析	
8) Real-time PCR 解析	
5. 結果	P.10
7. 考察	P.14
8. 結論	P.17
9. 謝辞	P.18
10. 参考文献	P.19
11. 図表	P.24
12. 図表の説明	P.30

略号

CREB	cAMP Response Element Binding protein
Col1	Type I Collagen α
DT	Diphtheria Toxin
DTR	Diphtheria Toxin Receptor
DSPP	Dentin sialophosphoprotein
Eef1a1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
GFP	Green Fluorescent Protein
hPTH(1-34)	Amino acid 1-34 fragment of human PTH
PTH/PTHrP	Parathyroid hormone / parathyroid hormone-related protein
PTH1R	PTH/PTHrP Receptor
Micro-CT	Micro-Computed Tomography
SD	Standard Deviation
3D	Three-Dimensional
抗 DTR 抗体	Heparin Binding Epidermal Growth Factor

略号・用語の説明

Col1: I 型コラーゲンは, 人体の最も豊富なコラーゲンである, 腱, 靱帯, 筋原繊維の内膜, 骨の有機部分, 真皮, 象牙質などに存在する. 骨芽細胞, 象牙芽細胞のマーカータンパク質として知られている.

DTR: ジフテリア毒素の受容体. ジフテリア毒素の受容体は膜結合型のヘパリン結合性 EGF 様増殖因子(HB-EGF)であることがわかっている. 毒素が結合する EGF 様ドメインの構造の違いにより, 動物によってジフテリア毒素に対する感受性には大きな差がある. ヒト DTR

は、毒素との結合親和性が非常に高いため、ヒトはジフテリア毒素に高い感受性を示す。ジフテリア毒素が DTR を介して細胞内に取り込まれると真核生物のペプチド鎖伸長因子 eEF2 を ADP リボシル化することにより蛋白質合成を阻害して細胞死をひき起こす。一方、マウス DTR は毒素との結合親和性をほとんど示さないため、マウスはジフテリア毒素に対し非感受性である。

DSPP: 象牙芽細胞に特異的に発現するタンパク質である。2 つに切断されると、象牙質シアロタンパク(DSP: Dentin sialoprotein) と象牙質リンタンパク(DPP: Dentin phosphoprotein) になる。DSPP 欠損マウスの歯は、象牙質の菲薄化、歯髄腔の拡大、歯髄の露出などの表現型を呈し、ヒト象牙質形成不全症Ⅲ型に類似する。

PTH: 84 個のアミノ酸からなる Ca 調節ホルモンの 1 つであり、生物活性は 1~34 アミノ酸領域に存在する。PTH の合成および分泌は、血中 Ca および活性型ビタミン D₃ により、抑制的に調節されている。一方、PTH は骨芽細胞の RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand) の発現誘導および活性化を促進し、血中 Ca 値を上昇させる。また、PTH(1-34) の間歇的投与は、骨芽細胞による骨形成を上昇させ、骨量増加効果を発揮する。

PTH/PTHrP 受容体(PTH1R): G 蛋白質共役型受容体スーパーファミリーに属し、細胞膜を 7 回貫通するドメインを持つ。2 つシグナル経路を介する。①アデニル酸シクラーゼ-cAMP 系を介し PKA(protein kinase A) を活性化する経路と。②PLC(phospholipase C) を活性化して、イノシトールトリリン酸およびジアシルグリセロールの産生亢進を経て PKC を活性化する経路が知られている。

CREB: 転写制御因子のひとつであり、ゲノム上の遺伝子転写制御領域に存在する cAMP 応答配列(CRE) を介した転写活性化に関わる中心的な核タンパク質である。その転写促進活性はリン酸化によって厳密に制御されている。cAMP 依存的タンパク質キナーゼ(PKA) によるリン酸化がその転写活性を調節する。

要旨

歯科治療のために窩洞を形成した歯の髄腔側では、象牙芽細胞による石灰化が亢進する。以上は、失われた硬組織を補填する生体防御反応であり、臨床現場では、より早期の修復象牙質形成が求められる。この過程において、窩洞形成にともない象牙芽細胞の細胞死が誘導され、新生象牙芽細胞の出現が観察される。しかしながら、象牙芽細胞死と修復象牙質の形成との関係は良く分っていない。今回我々は、遺伝子改変マウスを用いて、ジフテリア毒素(DT)投与により象牙芽細胞を特異的に死滅させる実験系を構築した。この実験系を用いて、修復象牙質の形成に対する象牙芽細胞死の重要性を調べることを目的とした。

I 型コラーゲンのプロモーター[Col1(2.3)]の制御下で GFP を発現するマウスの上顎の第一臼歯を回収した。凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、象牙芽細胞に GFP の発現が特異的に観察された。したがって、歯髄組織において、Col1(2.3)は象牙芽細胞特異的なマーカーであることが示された。そこで Col1(2.3)-Cre/flox-stop-flox-ジフテリア毒素受容体(DTR)マウスを作製した。Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT を投与すると、象牙芽細胞が組織特異的に死滅することを確認した。次に Col1(2.3)-GFP/Col1(2.3)-Cre/DTR マウスを用いて、象牙芽細胞の枯渇後の再生象牙芽細胞の出現の有無を観察した。その結果、枯渇した象牙芽細胞は、時間依存的に再生することが明らかになった。次に、象牙芽細胞枯渇後の修復象牙質の形成を、カルセイン標識により観察した。その結果、象牙芽細胞を枯渇した条件下でのみ、象牙質へのカルセインの取り込みが認められた。さらに、micro-CT による解析結果から、象牙芽細胞の枯渇後に硬組織体積が増えることが示された。以上より、象牙芽細胞の枯渇が新生象牙質形成を誘導することが明らかになった。次に、象牙芽細胞の枯渇後に歯髄組織で活性化されるシグナル伝達経路を解析した。その結果、象牙芽細胞の枯渇後に、副甲状腺ホルモン(PTH: parathyroid hormone)/PTH 関連蛋白質(PTHrP: PTH-related protein)受容体の発現上昇が歯髄組織で確認された。象牙芽細胞の枯渇条件下では、PTH/PTHrP 受容体を介して活性化される PKA(protein kinase A)の下流シグナル分子である CREB(cAMP responsive element binding protein)のリン酸化の上昇も認められた。さらに、PTH(1-34)のマウスへの投与は、象牙芽細胞の枯渇にともなう新生象牙質の形成を促進した。

以上の所見より、象牙芽細胞死が歯髄環境に作用して、(1)歯髄間葉系細胞の PTH/PTHrP 受容体/PKA 経路を活性化する結果、象牙芽細胞への分化が亢進すること、(2)それに引き続き新生象牙質の形成を誘導することが示唆された。すなわち象牙芽細胞死を引き金とした、象牙芽細胞の再生および新生象牙質の形成を調節する歯髄環境の存在が示唆された。

緒言

歯は、エナメル質、象牙質、セメント質と呼ばれる硬組織から構成される¹⁾。歯冠部ではエナメル質が、歯根部ではセメント質が象牙質の外側に位置しており、象牙質の内側は歯髄で満たされている。象牙質の歯髄に接した表面には象牙芽細胞が局在し、象牙質の形成に寄与する¹⁾。歯は失われた硬組織を補填する生体防御機構が備わっており、外傷または齲蝕により損傷を受けると、第三象牙質と呼ばれる硬組織が歯髄側に形成される^{2,3)}。硬組織の損傷の程度により、第三象牙質は異なる機構で形成される。軽度の損傷では、既存の象牙芽細胞による象牙質形成が亢進し、この過程により形成された第三象牙質を反応象牙質と呼ぶ^{2,4,5)}。一方、露髄をとともう重度の硬組織損傷では、象牙芽細胞が細胞死により消失する。それに引き続き、新たな象牙芽細胞が歯髄幹細胞から分化・供給され、新生象牙質形成に寄与する。この新しく分化した象牙芽細胞が形成する第三象牙質を、修復象牙質と呼ぶ^{2,6,7)}。しかしながら、露髄した歯が修復象牙質の形成のみで完全に修復することは難しく、歯科治療の現場では、MTA(mineral trioxide aggregate)セメントや水酸化カルシウム製剤といった歯科用覆髄材料を用いた硬組織再建療法が実施されている⁸⁾。したがって、修復象牙質の形成機構が明らかになり、その形成を促進する治療法が開発できれば、より効率的な歯科治療法の確立が実現することが予想される。

組織の修復時に Wnt/ β -catenin シグナルが活性化することが知られている。その活性化が炎症、細胞死、そして組織修復部位への幹細胞の遊走を調節することにより、組織修復を正に調節することが報告されている^{9,10,11)}。Wnt シグナルのレポーターマウス(Axin2^{lacZ})を用いて、歯の硬組織損傷時にも Wnt/ β -catenin シグナルが活性化されることが示された⁶⁾。さらに、glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)の阻害剤による Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は、マウス第一臼歯の欠損部修復を亢進した⁷⁾。また、Wnt/ β -catenin シグナルを抑制した Cag-Cre^{ERT2}/Wls^{fl/fl} マウスでは、窩洞を形成した第一臼歯の治癒が遅延した⁶⁾。しかしながら、反応象牙質の形成には Wnt/ β -catenin シグナルが必要ないとの報告もあることから、第三象牙質の形成に必要なシグナル伝達のメカニズムについては、未だ結論には至っていない⁴⁾。

歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化誘導は、修復象牙質の形成に必須のイベントである^{2,6,7)}。近年、歯髄幹細胞の同定に関する多くの報告がなされている。マウス切歯を用いた解析では、転写因子である Gli1 が陽性の細胞¹²⁾、歯髄血管周囲にあるプロテオグリカン的一种である NG2(nural/glial antigen 2)が陽性のペリサイト¹³⁾、そして Cervical loop に局在する Flamingo 1/Celsr1 陽性/CD90 陰性の細胞¹⁴⁾が歯髄幹細胞であると報告された。一方、マウスの臼歯では、Wnt/ β -catenin シグナルの下流因子である Axin2 が陽性の細胞⁶⁾、 α SMA(alpha-smooth muscle actin)陽性のペリサイト¹⁵⁾が、歯髄幹細胞であることが遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析により示された。興味深いことに、FGF2(fibroblast growth factor 2)は、 α SMA 陽性の歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化を促進する¹⁶⁾。以上

より、歯髄幹細胞の実体については未だ結論には至っていない。歯髄幹細胞の同定により、修復象牙質の分化機構の理解が深まることが予想される。

遺伝子改変動物を用いて、細胞を特異的に枯渇する実験手法が報告されている^{17,18,19}。このシステムでは、**Cre/loxP** システムを用いてヒトジフテリア毒素受容体(DTR)をマウスの組織特異的に発現させる。ヒトジフテリア毒素を上記の遺伝子改変マウスに投与し、目的の細胞集団のみを枯渇することが出来る。以上の手法を用いることにより、目的細胞の生体内における役割および挙動を解析することが可能になる。本研究では、以上の手法を応用し、象牙芽細胞を特異的に枯渇する実験系を構築した。作成した遺伝子改変マウスを用いて、修復象牙質の形成過程における象牙芽細胞の細胞死が、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化誘導、ならびに修復象牙質の形成に必須であるか否かを調べた。さらに近年、歯の発生における役割が示された、副甲状腺ホルモン(PTH: parathyroid hormone)/PTH 関連蛋白質(PTHrP: PTH-related protein)受容体²⁰)に着目し、歯の硬組織修復メカニズムの解明を試みた。

実験材料及び方法

1. 動物

C57BL/6 マウスは、日本 SLC 社(静岡)より購入した。Col1(2.3)-GFP マウスは慶応義塾大学の松尾光一先生より供与された。Col1(2.3)-Cre マウスは理化学研究所(埼玉)より、loxP-stop-loxP-DTR マウスは、Jackson Laboratory(Bar Harbor, Maine, US)より購入した。これらのマウスの交配により Col1(2.3)-Cre/DTR および Col1-GFP(2.3)-GFP/Col1(2.3)-Cre/DTR マウスを得た。本研究には、12 週齢以上のマウスを用いた。動物は松本歯科大学ハイテクセンター内の実験室にて飼育した、飼育に関しては、松本歯科大学動物実験委員会が定める動物実験指針に基づいて行った。

2. 試薬および抗体

抗 DTR 抗体は Cloud-Clone Corp.社(Wuhan, China)より購入した。抗 PTHR 抗体 (G220)は Assay Biotech 社(Fremont, CA)より購入した。抗リン酸化 CREB 抗体(9198S)は Cell Signaling TECHNOLOGY 社(Danver, MA)より購入した。ジフテリア毒素 (D0564・1MG)は SIGMA 社(Tokyo, Japan)より購入した。PTH(1-34)試薬は Asashi Kasei Pharma Co, Ltd 社(Tokyo, Japan)より供与された。カルセイン(C0875-5G)は SIGMA 社より購入した。

3. 組織観察

1) パラフィン切片による解析

マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて還流固定を行い、歯を回収した。それぞれの組織は、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて 4 °C で 24 時間固定した。その後、10%EDTA 溶液を用いて脱灰した(4 °C, 3 週間)。それぞれの脱灰組織は、上昇エタノール系列での脱水後、パラフィン包埋し、ミトクローム(SM2000R, LEICA, Wetzlar Germany)にて 4 μm の厚さで薄切した。切片はヘマトキシリン(032-14635, Wako, Osaka, Japan)エオジン(051-06515, Wako)により染色した。その後、スライドガラスは封入剤(FX00100, Matsunami, Osaka, Japan)に封入した。

2) 凍結切片による解析

マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて還流固定を行い、歯を回収した。組織は、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて 4 °C で 24 時間固定した。その後、10%~30%のスクロースに段階的に浸し、スクロース置換を行った。凍結包埋剤(SCEM, SECTION-LAB 株式会社, 広島)に組織を浸し、液体窒素にて凍結を行い包埋した。包埋した組織は、川本法に従い、Cryofilm Type III C (SECTION-LAB 株式会社)を

用いて、凍結ミクローム(CM3050S, LEICA, Germany)にて、タングステンブレード(TC-65, Leica)で 10 μm の厚さに薄切した. その後, TO-PRO-3(642/661)(T3605, Molecular Probes, Waltham, MA)にて核を染色しスライドガラスに封入した.

4. 薬剤の投与方法

1)カルセインの投与方法

マウスに吸入麻酔(イソフル, DS ファーマアニマルヘルス)を施し, マウス背中の皮下にカルセイン(3 mg/ml) を 0.16 ml 投与した. 投与は 3 日および 5 日間隔で 2 回投与し, 最終投与の 24 時間後に回収した.

2)ジフテリア毒素の投与方法

マウスの腹腔内にジフテリア毒素(250ng/day)を1週間投与した.

3)PTH(1-34)の間歇投与方法

マウスの腹腔内に PTH(80 $\mu\text{g/kg/day}$)を 16 日間投与した.

5. DTR, PTH/PTHrP 受容体およびリン酸化 CREB の免疫染色(パラフィン切片)

マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて還流固定を行い, 歯を回収した. それぞれの組織は, 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて 4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間固定した. その後, 10%EDTA 溶液を用いて脱灰した(4 $^{\circ}\text{C}$, 3 週間), それぞれの脱灰組織は, 上昇エタノール系列での脱水後, パラフィン包埋し, ミクローム(SM2000R, LEICA)にて 4 μm の厚さで薄切した. さらに抗 DTR 抗体, 抗 PTHR 抗体, 抗リン酸化 CREB 抗体にて, それぞれ 4 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間処理後, ヒストファイン Max-Po(rat, rabbit, goat)kit(ニチレイバイオサイエンス株式会社, 東京), ImmPACT DAB Substrate(VECTOR Laboratories 社, Burlingame, CA)を用いて DAB 染色を行った.

6. in situ ハイブリダイゼーション

マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて還流固定を行い, 歯を回収した. それぞれの組織は, 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて 4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間固定した. その後, 10%EDTA 溶液を用いて脱灰した(4 $^{\circ}\text{C}$, 3 週間). それぞれの脱灰組織は, 上昇エタノール系列での脱水後, パラフィン包埋し, ミクローム(SM2000R, LEICA)にて 4 μm の厚さで薄切した. In situ ハイブリダイゼーションには, RNAscope 2.5HD Reagent Kit-RED (Advanced Cell Diagnostics Inc. Newark, CA)を用いた. DSPP(Dentin sialophosphoprotein)のプロープとして, RNAscope Probe-Mm-Dspp (#448301, Advanced Cell Diagnostics Inc)を用いた.

7. micro-CT 解析

マウスから歯を回収し, 70%エタノール液にて 4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 週間固定した. マイクロフォーカス

X線 CT μ CT35 装置(Scanco Medical 社, Switzerland)により解析した.

8. Real-time PCR 解析

マウスの歯の RNA は, TRIzol Reagent(15596018, Ambion, Carlsbad, CA)と PureLink RNA Micro Kit(12183-016, Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて行った. マウスの歯を回収後, 0.2%の I 型コラーゲン(034-22363, Wako)溶液中で 10 分間室温にてインキュベーションし, 歯根膜を取り除いた. 歯を 0.5 ml の TRIzol の中でホモジェナイザーを用いて粉砕した. 粉砕した組織に TRIzol を 0.5 ml 加え, 5 分後にクロロホルムを 0.2 ml 加えて, 12000 g, 4 °C で 10 分間遠心した. 上清から RNA を 0.6 ml 回収し, 0.6 ml の 70% ethanol を加え, カラムに 0.7 ml 移し, 11500 rpm, 4 °C で 1 分遠心した. その後, さらに RNA を 0.7 ml 加え同じ条件で遠心した. そして, Wash Buffer I を 0.35 ml カラムに加えて, 同じ条件で遠心した. その後, DNase/Carrier RNA をカラムに加えて, 15 分経過の後, 0.35 ml の Wash Buffer I を加えて, 1500 rpm, 4 °C で 30 秒遠心し, その後, 100% ethanol を加えた Wash Buffer II を 0.5 ml 加えて上記と同じ条件で遠心を行った後, さらに 11500 rpm, 4 °C で 1 分遠心した. RNA free water 12 μ l を加えて, 上記と同様の条件で遠心分離を行い, Non-Stick RNase-Free 1.5 ml Microfuge Tube(AM12405, Ambion)に RNA を回収した.

各分子の mRNA の発現量は, One Step SYBR Prime Script PLUS RT-PCR キット (RR096A, タカラバイオ株式会社)を用いて, 測定した. 各種プライマーは以下の通りである.

マウス DSPP

5'-GAGCAACACGGATGGATGATTTTC-3' (forward);

5'-CACTCTTGTCACGCACAGCCTTA-3' (revers)

マウス PTH1R

5'-CTGTGGCAGATCCAGATGCACTA-3' (forward);

5'-GAAGTCCAATGCCAGTGTCCAG-3' (revers)

マウス Eef1a1

5'-TGCTGCCATTGTTGATATGG-3' (forward);

5'-TCCACAGCTTTGATGACACC-3' (revers)

結果

1. 象牙芽細胞に特異的なマーカー蛋白質の探索

本研究では、象牙芽細胞の細胞死を誘導できる遺伝子改変マウスを作成した。それに先立ち、象牙芽細胞で特異的に発現するマーカー蛋白質の探索を行った。I 型コラーゲン(Col1)は象牙芽細胞で発現することが知られている¹⁾。そこで、Col1 の 2.3 kb のプロモーター領域の下流で Green Fluorescent Protein (GFP)を発現する遺伝子改変マウス[Col1(2.3)-GFP マウス]の第一臼歯を回収後に凍結切片を作成し、共焦点顕微鏡による観察を行った。その結果、歯髄組織において象牙芽細胞に特異的な Col1(2.3)-GFP の発現が認められた(図 1)。

2. 象牙芽細胞の枯渇実験系の確立

Col1 が象牙芽細胞に特異的に発現するタンパク質であることが明らかになったので、(1) Col1 の 2.3 kb のプロモーター領域の下流で Cre 組換え酵素を発現する遺伝子改変マウス [Col1(2.3)-Cre]および、(2)転写を Stop させる配列を loxP 配列で挟み込み(loxP-stop-loxP), その下流でジフテリア毒素受容体を発現する遺伝子が ROSA26 の遺伝子座内に組み込まれたマウス(DTR)を準備した。Col1(2.3)-Cre マウスと DTR マウスを交配し、両方の遺伝子を有するマウスを作成した(図 2A)。このマウスでは、象牙芽細胞が歯髄組織中で特異的に DTR を発現する。したがって、DT の投与により象牙芽細胞に特異的な細胞死を誘導することが出来る。Col1(2.3)-Cre/DTR マウスの歯髄組織における DTR の発現を抗 DTR 抗体染色により確認した。その結果、Col1(2.3)-Cre/DTR マウスの第一臼歯では、象牙芽細胞特異的に DTR の発現が認められた(図 2B, 右パネル)。一方、野生型マウスの第一臼歯では、DTR 陽性細胞は認められなかった(図 2B, 左パネル)。次に、Col1(2.3)-Cre/DTR マウスおよび DTR(コントロール)マウスに DT(250 ng/日)を一週間腹腔内投与し、8 日目に第一臼歯を回収した。パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色により象牙芽細胞を観察した。その結果、DTR マウスでは象牙質表面に並んだ象牙芽細胞が認められる一方で、Col1(2.3)-Cre/DTR マウスでは象牙芽細胞が著しく減少した(図 2C)。以上の結果より、象牙芽細胞を特異的に枯渇する実験系の構築が確認された。

3. 象牙芽細胞の枯渇後における新生象牙芽細胞の観察

象牙芽細胞の枯渇にともなう新生象牙芽細胞の出現の有無を観察した。象牙芽細胞をモニタリングするために、Col(2.3)-GFP マウスと Col1(2.3)-Cre/DTR マウスを交配して Col(2.3)-GFP/Col1(2.3)-Cre/DTR マウスを作成した。Col(2.3)-GFP/DTR(コントロール)マウスおよび Col(2.3)-GFP/Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに、DT(250 ng/日)を一週間腹腔内投与した。DT の最終投与の 1, 7, 14, 21 日後に Col(2.3)-GFP/Col1(2.3)-Cre/DTR マウスの第一臼歯を回収した。Col(2.3)-GFP/DTR(コントロール)マウスの第一臼歯は、DT 最終投

与の1日後に回収した。凍結組織切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、Col(2.3)-GFP/DTR(コントロール)マウスでは、象牙質に沿ってCol1(2.3)-GFP陽性の象牙芽細胞が観察された(図3A)。一方、Col(2.3)-GFP/Col1(2.3)-Cre/DTRマウスのDT最終投与1日後では、Col1(2.3)-GFP陽性の象牙芽細胞が著減することが確認された(図3A)。しかしながら、7, 14, 21日後にCol1(2.3)-GFP陽性の象牙芽細胞が再び出現することが明らかになった(図3A)。

さらに、象牙芽細胞の再生を象牙芽細胞マーカーであるDSPPのin situ ハイブリダイゼーションにて解析を行った。DTR(コントロール)マウスおよびCol1(2.3)-Cre/DTRマウスに、DT(250 ng/日)を一週間腹腔内投与した。DTの最終投与の1, 7日後にCol1(2.3)-Cre/DTRマウスの第一臼歯を回収した。DTR(コントロール)マウスの第一臼歯は、DT最終投与の1日後に回収した。パラフィン切片を作成し、DSPPの発現をin situ ハイブリダイゼーションにより検出した。その結果、DTR(コントロール)マウスでは、象牙質に沿ってDSPP陽性の象牙芽細胞が観察された(図3B)。一方、Col1(2.3)-Cre/DTRマウスにおけるDTの最終投与1日後では、DSPP陽性の象牙芽細胞が著減することが確認された(図3B)。しかしながら、7日後にDSPP陽性の象牙芽細胞が再び出現することが明らかになった(図3B)。以上より、象牙芽細胞が枯渇すると、歯髄間葉系幹細胞から象牙芽細胞への分化が促され、新生象牙芽細胞が出現することが示唆された。

4. 象牙芽細胞の枯渇後における新生象牙質の観察

象牙芽細胞の枯渇にともなう新生象牙質形成の有無を観察した。解析に先立ち、マウスの成長にともなう象牙芽細胞の石灰化活性の挙動を調べた。4, 6, 12週齢のマウスにカルセインを4日間の間隔をあけて2回投与した。最終投与の24時間後に、上顎第一臼歯を回収した。凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡によりカルセインで標識された骨組織を観察した。その結果、4週齢のマウス第一臼歯では、象牙質の歯髄側の全体にわたり、カルセインで2重に標識された部位が観察された(図4A)。6週齢のマウス第一臼歯では、歯根部には、カルセインの2重標識が認められ、その一方で、歯冠部は1重のカルセイン標識のみが観察された(図4B)。12週齢のマウス第一臼歯では、象牙質におけるカルセインの標識が全く認められなかった(図4C)。以上の結果から、6から12週齢の間に象牙質の石灰化が低下することが明らかになった。以上の結果を踏まえ、新生象牙質の形成実験には12週齢以降のマウスを使用した。

次に、象牙芽細胞の枯渇後における象牙質の石灰化を観察した。DTR(コントロール)マウスおよびCol1(2.3)-Cre/DTRマウスに、DT(250 ng/日)を一週間腹腔内投与した。DT最終投与の3および6日後にカルセインを注射した。カルセインの最終投与の24時間後にマウスの第一臼歯を回収した。凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡により硬組織のカルセインラベルを観察した。その結果、DTR(コントロール)マウスの歯槽骨ではカルセインの取り込みが認められたが、象牙質には認められなかった(図5A 左パネル)。一方、Col1(2.3)-

Cre/DTR マウスでは、象牙質の歯髄組織に沿って、カルセインの取り込みが確認された(図 5A).

次に、象牙芽細胞の枯渇が新生象牙質形成に及ぼす作用を、micro-CT(micro-computed tomography)により解析した. コントロール(DTR)および Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに 1 週間 DT を投与することにより象牙芽細胞を枯渇した. DT 最終投与の 6 週後にマウスの第一臼歯を回収し、micro-CT により構築した 3D 画像から硬組織の体積を測定した. その結果、象牙芽細胞を枯渇した Col1(2.3)-Cre/DTR マウスでは第一臼歯の硬組織体積が、コントロール(DTR)マウスと比較して有意に増加することが明らかになった(図 5B, C). さらに、象牙芽細胞枯渇の歯髄体積に対する影響を micro-CT により解析した. その結果、象牙芽細胞を枯渇させた Col1(2.3)-Cre/DTR マウスの歯髄体積は、コントロール(DTR)マウスよりも低下することが明らかになった(図 5D, E). 以上は、新生象牙質の形成が誘導されたために歯髄組織が狭くなり、その結果、歯髄体積が減少したことを示唆する. 以上の結果より、象牙芽細胞の特異的な枯渇により、新生象牙質形成が誘導されることが示された.

5. 象牙芽細胞の枯渇後に活性化されるシグナル伝達経路の探索

象牙質の形成が活発であるマウスの発生過程における歯髄組織には、副甲状腺ホルモン(PTH: parathyroid hormone)/PTH 関連蛋白質(PTHrP: PTH-related protein)受容体が発現することが知られている²⁰⁾. また、PTH の間歇的投与は、骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を誘導し、その結果、骨量を増やすことが報告されている^{21,22)}. 以上より、象牙芽細胞の枯渇にともなう象牙芽細胞の分化および石灰化亢進の作用機序にも、PTH-PTHrP 受容体シグナル伝達経路が寄与することを予想した.

7 日齢マウスにおける萌出前の第一臼歯を回収し、パラフィン切片を作成し、抗 PTH/PTHrP 受容体の抗体による免疫染色を行った. 以前の報告と同様に、歯髄細胞に PTH/PTHrP 受容体の発現が観察された(図 6A). 次に、8 週齢マウスの第一臼歯における歯髄組織の PTH/PTHrP 受容体の発現を調べた. その結果、PTH/PTHrP 受容体の発現は歯根膜に多く確認されたが、歯髄組織にはほとんど認められなかった(図 6B). 以上より、歯髄組織における PTH/PTHrP 受容体の発現は、歯の発生時期に認められるものの、加齢にともない低下することが示された.

そこで次に、象牙芽細胞の枯渇後の歯髄組織における PTH/PTHrP 受容体の発現を解析した. DTR(コントロール)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに、DT(250 ng/日)を一週間腹腔内投与した. DT の最終投与の 1, 7, 21 日後に Col1(2.3)-Cre/DTR マウスの第一臼歯を回収した. DTR(コントロール)マウスの第一臼歯は、DT 最終投与の 1 日後に回収した. 抗 PTH/PTHrP 受容体抗体に対する免疫染色を行った結果、DTR(コントロール)マウスの歯髄には PTH/PTHrP 受容体の発現は認められなかった(図 6C). 一方、象牙芽細胞を枯渇した 7, 21 日後では、歯髄組織に PTH/PTHrP 受容体の発現が確認された(図 6C). さらに、DT の最終投与の 1, 7, 21 日後の歯髄組織における PTH/PTHrP 受容体の mRNA 発現

を Real-time PCR により調べた。象牙芽細胞マーカーである DSPP の発現量は、象牙芽細胞の枯渇 1 日後に減少し、その後は時間依存的に上昇した(図 6D)。一方、PTH/PTHrP 受容体(Pth1R)の発現は、免疫染色の結果と同様に、象牙芽細胞の枯渇後 1 週間で有意に上昇した(図 6C, D)。以上の結果より、象牙芽細胞の枯渇後に、歯髄細胞の PTH/PTHrP 受容体の発現が上昇することが示された。

PTH/PTHrP 受容体の下流では、PKA(protein kinase A)の活性化を介して CREB(cAMP responsive element binding protein)のリン酸化が誘導される²³⁾。次に、象牙芽細胞の枯渇後の歯髄細胞における CREB のリン酸化の有無を調べた。DTR(コントロール)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに、DT(250 ng/日)を一週間腹腔内投与した。DT の最終投与の 1, 7, 21 日後に Col1(2.3)-Cre/DTR マウスの第一臼歯を回収した。また、1 日後に DTR(コントロール)マウスの第一臼歯を回収し、それぞれのサンプルについて、抗リン酸化 CREB 抗体に対する免疫染色を行った。その結果、DTR(コントロール)マウスの歯髄には CREB のリン酸化は認められなかったが、象牙芽細胞を枯渇した 7, 21 日後には、リン酸化 CREB が確認された(図 6E)。PTH/PTHrP 受容体の発現上昇と、CREB のリン酸化の誘導が同時期に認められた(図 6C-E)。以上の結果は、象牙芽細胞の枯渇により発現上昇した PTH/PTHrP 受容体の下流で PKA シグナル伝達が進捗することを示唆する。

次に、PTH-PTH/PTHrP 受容体シグナル伝達経路の活性化による新生象牙質の誘導作用を調べた。Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/日)を一週間腹腔内投与した。DT の最終投与の 24 時間後から、PTH(1-34)(80 µg/kg)を 24 時間ごとに 16 日間投与した。コントロール群には、0.1%BSA(bovine serum albumin)を投与した。5 日間隔でカルセインを 2 回投与し、最終投与の 24 時間後に第一臼歯を回収した。凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で象牙質のカルセイン標識を観察した。その結果、PTH(1-34)の投与により、カルセインの 2 重標識の間隔が拡大することが示された(図 6F, G)。以上より、象牙芽細胞の枯渇後に上昇する歯髄細胞の PTH/PTHrP 受容体は、その活性化により新生象牙質の形成を進捗することが示唆された。

考察

1. 象牙芽細胞の枯渇実験系の構築

硬組織が損傷した歯の髄腔側では、象牙芽細胞による第三象牙質の形成が亢進する。露髄をともなう重度の損傷時では、象牙芽細胞が細胞死により枯渇する。それに引き続き、歯髄幹細胞から新生象牙芽細胞への分化と修復象牙質の形成が誘導される¹⁾。本研究では、以上の組織修復が、象牙芽細胞の細胞死を基点にして起こるか否かを遺伝子改変マウスによる象牙芽細胞の枯渇実験系を用いて調べた。

Col1(2.3)のプロモーターの下流で GFP を発現するマウスの歯髄組織では、象牙芽細胞だけに GFP の発現が認められた(図 1)。さらに Col1(2.3)-Cre/DTR マウスの歯髄組織における DTR の発現は象牙芽細胞にのみで確認された(図 2B)。以上の結果に対応し、Col1(2.3)-Cre/DTR マウスへのジフテリア毒素の投与は、歯髄組織において象牙芽細胞特異的な細胞死を誘導した(図 2C)。

一方、Col1(2.3)は、骨芽細胞でも発現するため、本実験系では骨芽細胞も枯渇していることが考えられる^{24,25)}。しかしながら、本枯渇実験で用いた 12 週齢以上のマウスでは、歯槽骨の骨芽細胞における Col1(2.3)-GFP の発現は象牙芽細胞と比較して低レベルであった(図 1)。また、Col1(2.3)-GFP/Col1(2.3)-Cre/DTR を用いた GFP 陽性細胞の確認実験においても、ジフテリア毒素の投与後における歯槽骨の Col1(2.3)-GFP 陽性骨芽細胞の低下は確認されなかった(図 2A)。以上より、本実験系では象牙芽細胞の枯渇のために、象牙芽細胞と骨芽細胞に共通のマーカー蛋白質である Col1(2.3)を使用しているが、象牙芽細胞と比較して、骨芽細胞に対する影響は少ないことが示唆された。

2. 象牙芽細胞の枯渇にともなう新生象牙芽細胞の分化誘導

歯は重度の損傷を受けると、欠損部位の周囲に局在する象牙芽細胞の細胞死が誘導される。それに伴い歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化が亢進し、枯渇した象牙芽細胞は速やかに補填される¹⁾。しかしながら、以上の象牙芽細胞の分化誘導のメカニズムについては未解明である。本研究では、象牙芽細胞の細胞死と、その再生との関係を、象牙芽細胞を特異的に枯渇できる遺伝子改変マウスを用いて解析した。その結果、象牙芽細胞を枯渇すると、時間依存的に新たに分化した象牙芽細胞が出現することが示された(図 3, 図 6D)。以上の結果は、象牙芽細胞の細胞死が起因となり、歯髄幹細胞から象牙芽細胞分化が誘導されることを示唆する。すなわち、象牙芽細胞の細胞死により、象牙芽細胞分化因子の発現が誘導され、それが歯髄幹細胞に作用する可能性が考えられる。

歯髄幹細胞から象牙芽細胞の分化に寄与する因子については、これまでに多く報告されている。象牙質の細胞外基質は、歯髄幹細胞の遊走因子を含むとの報告がある²⁶⁾。すなわち、象牙質損傷に伴い放出する因子が象牙芽細胞分化に作用することが示唆される。象牙質に

含まれる分化誘導因子として、TGF- β (transforming growth factor- β)や BMPs (bone morphogenic proteins)が報告されている^{27,28,29,30}). しかし、本研究で用いた実験系は、象牙質の損傷を伴わないため、象牙芽細胞分化誘導因子は象牙質に含まれる基質タンパクには由来しないことが予想された。

組織の再生に Wnt/ β -catenin シグナルが働くことが知られている^{9,10,11}). 近年、象牙芽細胞に対する Wnt/ β -catenin シグナルの重要性が報告されている^{31,32}). Axin2 は Wnt/ β -catenin シグナルに対する抑制因子である。したがって、Axin2 の遺伝子欠損マウス (Axin2^{LacZ/LacZ}) では、Wnt/ β -catenin シグナルが促進する。このマウスの象牙芽細胞および象牙質は正常であったが、修復象牙質の形成が上昇することが報告された³³). この時、Axin2 の遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して、修復象牙質形成過程における歯髄細胞の細胞死の低下と細胞増殖の亢進が認められた。さらに、ラットの象牙質損傷実験においても、リボソームに含有したヒト Wnt3a が修復象牙質の形成を亢進し、この時、歯髄細胞の細胞死の低下と細胞増殖の亢進が認められた³³). また、Wnt/ β -catenin シグナルが活性化された細胞を標識できる遺伝子改変マウス (Axin2-Cre^{ERT2}/Rosa26-mTmG^{flx/+})を用いた、修復象牙質形成時における歯髄細胞の系譜解析が行われた⁶). この報告によると、象牙質の損傷にともない、歯髄細胞で発現上昇した Wnt がオートクラインに作用することにより、歯髄幹細胞の細胞周期および象牙芽細胞分化を促進する。また、Wnt5a, Wnt6, Wnt7b, Wnt10a, Wnt11 などが象牙芽細胞分化に寄与することが、主に *in vitro* 培養実験により示されている^{34,35,36,37,38,39}). 以上より、本実験で認められた、象牙芽細胞の枯渇後の象牙芽細胞の分化誘導についても、Wnt シグナルの関与が示唆される。今後、象牙芽細胞の枯渇後における歯髄細胞での Wnt シグナルの活性化の有無を、Real-time PCR および免疫染色により検討する必要があると思われる。

3. 象牙芽細胞の枯渇にともなう新生象牙質の形成誘導

カルセインによる石灰化硬組織の標識実験により、生後 6-12 週齢頃にマウス象牙質の石灰化が低下することが示された(図 4)。今回、低下した象牙質の石灰化が、象牙芽細胞を枯渇することにより再び上昇することが示された(図 5)。本実験で枯渇した象牙芽細胞は、時間依存的に回復する(図 3)。修復象牙質の形成には、歯髄幹細胞から分化・供給された新生象牙芽細胞が寄与することが知られている^{2,6}). 従って、本実験において認められた新生象牙質の形成も、歯髄幹細胞から分化した新生象牙芽細胞が寄与することが示唆される。

一方、露髄を伴わない軽度の象牙質損傷では、既存の象牙芽細胞により反応象牙質が形成される^{2,4,5}). 我々が構築した象牙芽細胞の枯渇実験系では、ジフテリア毒素の連日投与を 1 週間行った。ジフテリア毒素の最終投与の 24 時間後において、Col1(2.3)陽性の象牙芽細胞は著減していたが、未だ残存する象牙芽細胞が認められた(図 3A)。従って、本研究において認められた新生象牙質の形成に、新生象牙芽細胞だけではなく、既存の象牙芽細胞も寄与する可能性が考えられ、今後の検討が必要である。反応象牙質の形成に働くシグナル伝達

については未だ良く分かっていないが、少なくとも Wnt/ β -catenin, TGF- β , BMP シグナルの活性化は必須ではないことが、遺伝子改変マウスおよび阻害剤を用いた実験により示されている⁴⁾。しかし興味深いことに、GSK-3 の抑制剤による Wnt/ β -catenin シグナル活性化は、修復象牙質だけではなく、反応象牙質の形成も促進した^{4,7)}。すなわち、Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は、反応象牙質の形成に必須ではないものの、活性化することによりその形成が亢進することが示唆された。

マウス長管骨の骨折モデルにおいて、硬組織の修復に対するマクロファージの寄与が報告されている^{40,41,42)}。本実験において、象牙芽細胞の枯渇後に、マクロファージが出現して死細胞の除去に働くことが予想される。この時出現した、マクロファージによる新生象牙質形成の促進作用については今後の検討が必要である。

4. 象牙芽細胞の分化と石灰化誘導に寄与するシグナル伝達経路

免疫染色および Real-time PCR 解析により、象牙芽細胞の枯渇に伴い歯髄細胞で PTH/PTHrP 受容体と、その下流の CREB のリン酸化が上昇することが示された(図 6)。歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化亢進が活発な発生時期には、マウス歯髄組織で PTH/PTHrP 受容体の発現が上昇する²⁰⁾。また、PTH の間歇的投与は、骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を誘導する^{21,22)}。以上より、象牙芽細胞の枯渇により上昇した PTH/PTHrP 受容体が、歯髄幹細胞から象牙芽細胞の分化を正に調整することが示唆される。さらに、PTH(1-34)の間歇投与が、象牙芽細胞の枯渇に伴う象牙質の石灰化を亢進したことから、歯の再生過程における PTH-PTH/PTHrP 受容体シグナルの重要性が考えられる(図 6F)。以上の仮説を証明するために、今後は(1)PTH(1-34)投与による、象牙芽細胞分化に対する作用、(2)H-89 をはじめとした、PKA 阻害剤による PTH-PTH/PTHrP 受容体-PKA シグナルの必要性、さらには(3)歯髄細胞における PTH/PTHrP 受容体の発現誘導機構についての解析が必要である。

結論

本研究より、象牙芽細胞死にともない、歯髄の未分化間葉系細胞画分から象牙芽細胞への分化が亢進することが示された。さらにこの時、新生象牙質の形成も亢進することが示された。以上の過程において、歯髄間葉系細胞の PTH/PTHrP 受容体/PKA 経路が活性化することに加え、PTH(1-34)のマウスへの間歇投与は、新生象牙質の形成を亢進した。以上より、歯の組織修復過程を、PTH/PTHrP 受容体/PKA 経路が、正に調節することが示唆された。すなわち、象牙芽細胞死を引き金とする、PTH/PTHrP 受容体/PKA 経路を介した象牙芽細胞の再生および新生象牙質の形成を調節する歯髄環境の存在が示唆された。今後、PTH/PTHrP 受容体/PKA 経路の活性化による人為的な制御を基盤とした歯科治療法の確立に繋がることが期待される。

謝辞

本研究に際し、終始御懇意なる御指導、御校閲を賜りました松本歯科大学大学口腔外科学講座 各務秀明教授、松本歯科大学口腔生化学講座 宇田川信之教授、松本歯科大学口腔解剖学講座 中村浩彰教授に謹んで謝意を申し上げます。また本研究に多大なる御指導を賜りました東京歯科大学口腔科学研究センター 溝口利英講師、松本歯科大学歯科矯正学講座 荒井敦講師に厚く感謝申し上げます。本研究を遂行にあたり、御指導、御助言を賜りました松本歯科大学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座 高橋直之教授、松本歯科大学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座 小林泰浩教授、松本歯科大学口腔外科学講座 李憲起講師に謹んで謝意を申し上げます。

また、本研究を遂行にあたり、御助言、御協力頂きました松本歯科大学口腔解剖学講座堀部寛治助教および原弥勒力助教、同じグループの大学院生の楊孟雨さん、北海道医療大学口腔構造・機能発育学 細矢明宏准教授、福岡歯科大学生理学・分子生物学科細胞生理学専攻 岡部幸司教授、進正史講師に厚く感謝申し上げます。

本研究の遂行および論文の作成にあたり、御協力頂きました松本歯科大学総合歯科医学研究所、松本歯科大学口腔外科学講座の各先生および大学院生、ならびに本研究に携わってくださった全ての皆様に御礼申し上げます。

最後にこの研究を絶えず支え励ましてくれた両親(父趙京印、母成平彩)、兄(趙成杰)、兄嫁(程云)、甥(趙浩然)に心から感謝いたします。

参考論文

1. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A (2011) Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 3:711-35.
2. Goldberg M, Smith AJ (2004) Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 15(1):13-27.
3. Sloan AJ, Smith AJ (2007) Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*. 13(2):151-7.
4. Neves VCM, Sharpe PT (2018) Regulation of reactionary dentine formation. *J Dent Res*. 97(4):416-22.
5. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O (2014) Reactionary dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries. *J Dent Res*. 93(8):788-93.
6. Babb R, Chandrasekaran D, Carvalho Moreno Neves V, Sharpe PT (2017) Axin2-expressing cells differentiate into reparative odontoblasts via autocrine Wnt/ β -catenin signaling in response to tooth damage. *Sci Rep*. 7(1):3102.
7. Neves VC, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT (2017) Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Sci Rep*. 7:39654.
8. Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ (2017) Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *J Investig Clin Dent*. 8(2).
9. Whyte JL, Smith AA, Helms JA (2012) Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4(8):a008078.
10. Fuerer C, Nusse R, Ten Berge D (2008) Wnt signalling in development and disease: Max Delbrück Center for Molecular Medicine meeting on Wnt Signaling in Development and Disease. *EMBO Rep*. 9(2):134-8.

11. Clevers H, Loh KM, Nusse R (2014) Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*. 346(6205):1248012.
12. Zhao H, Feng J, Seidel K, Shi S, Klein O, Sharpe P, Chai Y (2014) Secretion of Shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor. *Cell Stem Cell*. 14(2):160-73.
13. Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT (2011) Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(16):6503-8.
14. An Z, Sabalic M, Bloomquist RF, Fowler TE, Streelman T, Sharpe PT (2018) A quiescent cell population replenishes mesenchymal stem cells to drive accelerated growth in mouse incisors. *Nat Commun*. 9(1):378.
15. Vidovic I, Banerjee A, Fatahi R, Matthews BG, Dymant NA, Kalajzic I, Mina M (2017) α SMA-expressing perivascular cells represent dental pulp progenitors in vivo. *J Dent Res*. 96(3):323-30.
16. Vidovic-Zdrilic I, Vining KH, Vijaykumar A, Kalajzic I, Mooney DJ, Mina M (2018) FGF2 enhances odontoblast differentiation by α SMA+ progenitors in vivo. *J Dent Res*. 97(10):1170-7.
17. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 502(7473):637-43.
18. Mizoguchi T, Pinho S, Ahmed J, Kunisaki Y, Hanoun M, Mendelson A, Ono N, Kronenberg HM, Frenette PS (2014) Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development. *Dev Cell*. 29(3):340-9.
19. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ (2014) Leptin-

receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell*. 15(2):154-68.

20. Ono W, Sakagami N, Nishimori S, Ono N, Kronenberg HM (2016) Parathyroid hormone receptor signaling in osterix-expressing mesenchymal progenitors is essential for tooth root formation. *Nat Commun*. 7:11277.
21. Balani DH, Ono N, Kronenberg HM (2017) Parathyroid hormone regulates fates of murine osteoblast precursors in vivo. *J Clin Invest*. 127(9):3327-38.
22. Yang M, Arai A, Udagawa N, Zhao L, Nishida D, Murakami K, Hiraga T, Takao-Kawabata R, Matsuo K, Komori T, Kobayashi Y, Takahashi N, Isogai Y, Ishizuya T, Yamaguchi A, Mizoguchi T (2019) Parathyroid hormone shifts cell fate of a leptin receptor-marked stromal population from adipogenic to osteoblastic lineage. *J Bone Miner Res*. doi: 10.1002/jbmr.3811.
23. Ricarte FR, Le Henaff C, Kolupaeva VG, Gardella TJ, Partridge NC (2018) Parathyroid hormone(1-34) and its analogs differentially modulate osteoblastic Rankl expression via PKA/SIK2/SIK3 and PP1/PP2A-CRTC3 signaling. *J Biol Chem*. 293(52):20200-13.
24. Uribe F, Kalajzic Z, Bibko J, Nanda R, Olson C, Rowe D and Wadhwa S (2011) Early effects of orthodontic forces on osteoblast differentiation in a novel mouse organ culture model. *Angle Orthod*. 81(2):284-91.
25. Dacic S, Kalajzic I, Visnjic D, Lichtler AC and Rowe DW (2001) Colla1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression. *J Bone Miner Res*. 16(7):1228-36.
26. Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR (2012) Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components. *Exp Cell Res*. 318(18):2397-406.
27. Nakashima M, Akamine A (2005) The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*. 31(10):711-8.

28. Sloan AJ, Couble ML, Bleicher F, Magloire H, Smith AJ, Farges JC (2001) Expression of TGF-beta receptors I and II in the human dental pulp by in situ hybridization. *Adv Dent Res.* 15:63-7.
29. Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, Huang GX, Weaver J, Chen AC, Padwa BL, Hamblin MR, Barcellos-Hoff MH, Kulkarni AB, J Mooney D (2014) Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor-β1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med.* 6(238):238ra69.
30. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH (1994) Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol.* 162(1):18-28.
31. Angelova Volponi A, Zaugg LK, Neves V, Liu Y, Sharpe PT (2018) Tooth repair and regeneration. *Curr Oral Health Rep.* 5(4):295-303.
32. Sharpe PT (2016) Dental mesenchymal stem cells. *Development.* 143(13):2273-80.
33. Hunter DJ, Bardet C, Mouraret S, Liu B, Singh G, Sadoine J, Dhamdhare G, Smith A, Tran XV, Joy A, Rooker S, Suzuki S, Vuorinen A, Miettinen S, Chaussain C, Helms JA (2015) Wnt acts as a prosurvival signal to enhance dentin regeneration. *J Bone Miner Res.* 30(7):1150-9.
34. Wang C, Zhao Y, Su Y, Li R, Lin Y, Zhou X, Ye L (2013) C-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates Wnt5a-induced cell motility dependent or independent of RhoA pathway in human dental papilla cells. *PLoS One.* 8(7):e69440.
35. Peng L, Ren LB, Dong G, Wang CL, Xu P, Ye L, Zhou XD (2010) Wnt5a promotes differentiation of human dental papilla cells. *Int Endod J.* 43(5):404-12.

36. Li R, Wang C, Tong J, Su Y, Lin Y, Zhou X, Ye L (2014) WNT6 promotes the migration and differentiation of human dental pulp cells partly through c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *J Endod.* 40(7):943-8.
37. Lv H, Yang J, Wang C, Yu F, Huang D, Ye L (2018) The WNT7B protein promotes the migration and differentiation of human dental pulp cells partly through WNT/beta-catenin and c-Jun N-terminal kinase signalling pathways. *Arch Oral Biol.* 87:54-61.
38. Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I (2007) Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation.* 75(5):452-62.
39. Koizumi Y, Kawashima N, Yamamoto M, Takimoto K, Zhou M, Suzuki N, Saito M, Harada H, Suda H (2013) Wnt11 expression in rat dental pulp and promotional effects of Wnt signaling on odontoblast differentiation. *Congenit Anom (Kyoto).* 53(3):101-8.
40. Vi L, Baht GS, Soderblom EJ, Whetstone H, Wei Q, Furman B, Puviindran V, Nadesan P, Foster M, Poon R, White JP, Yahara Y, Ng A, Barrientos T, Grynblas M, Mosely MA, Alman BA (2018) Macrophage cells secrete factors including LRP1 that orchestrate the rejuvenation of bone repair in mice. *Nat Commun.* 9(1):5191.
41. Batoon L, Millard SM, Wulschleger ME, Preda C, Wu AC, Kaur S, Tseng HW, Hume DA, Levesque JP, Raggatt LJ, Pettit AR (2019) CD169+ macrophages are critical for osteoblast maintenance and promote intramembranous and endochondral ossification during bone repair. *Biomaterials.* 196:51-66.
42. Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Müller R, Wu AC, Van Rooijen N, Sweet MJ, Hume DA, Raggatt LJ, Pettit AR (2011) Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res.* 26(7):1517-32.

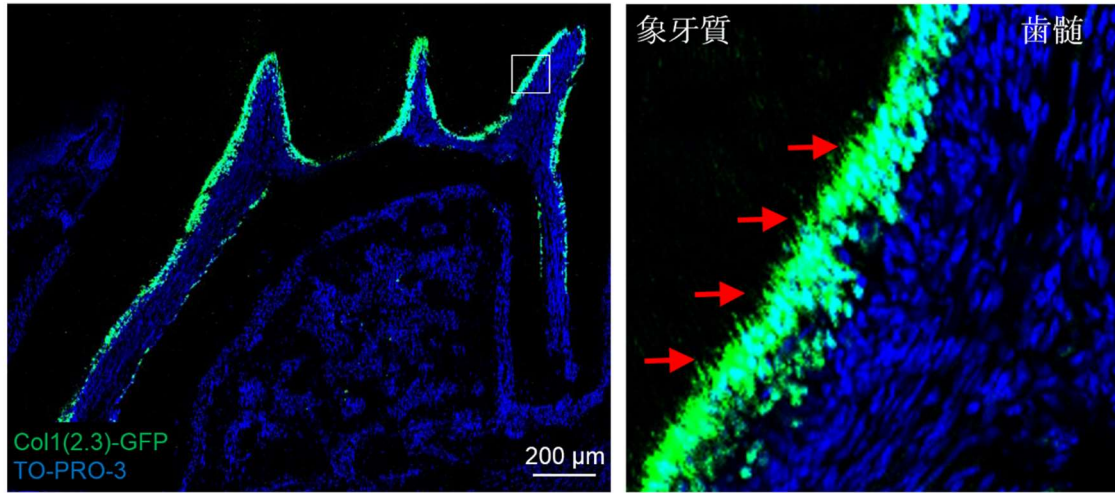


図 1 象牙芽細胞に特異的なマーカー蛋白質の探索

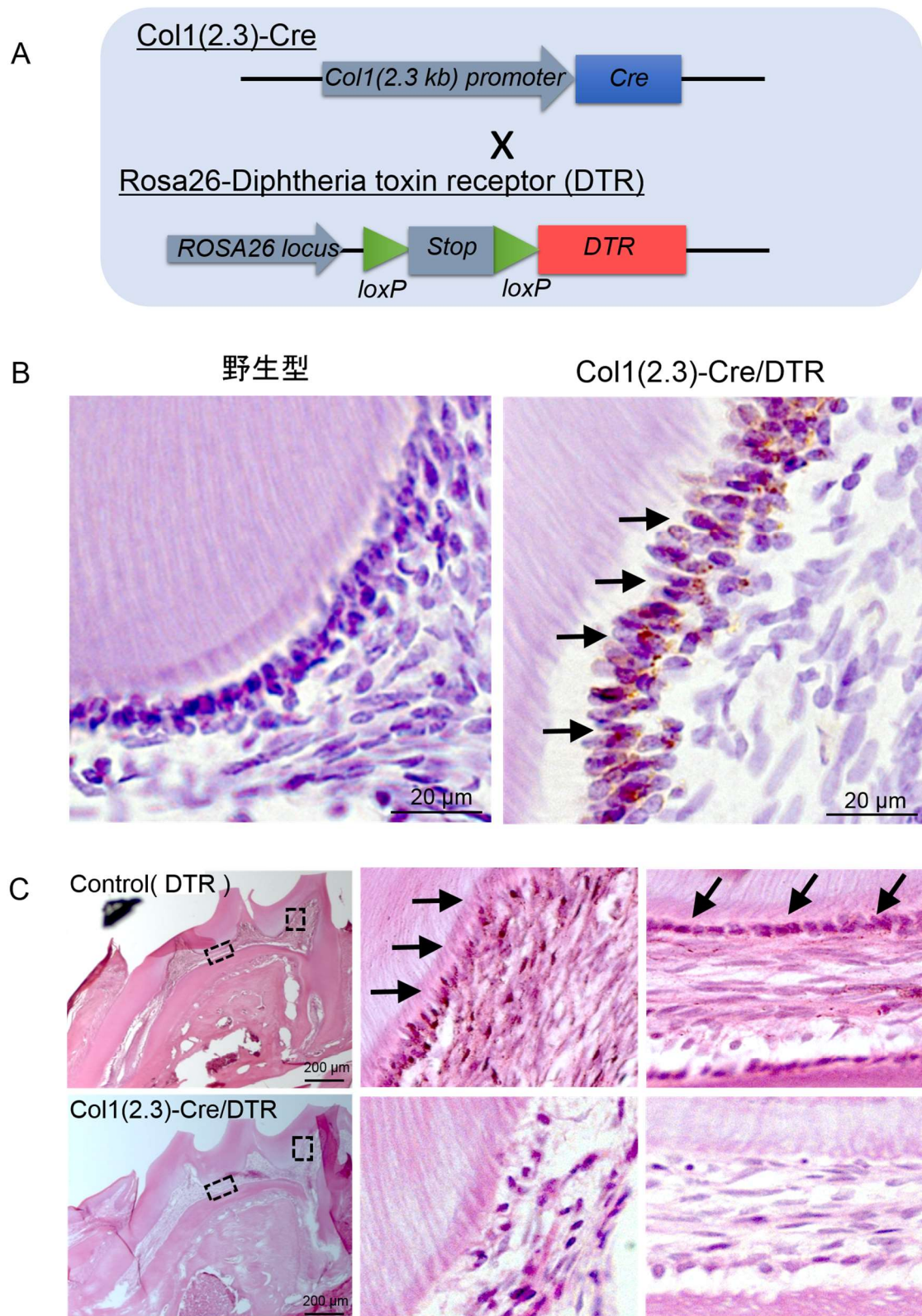
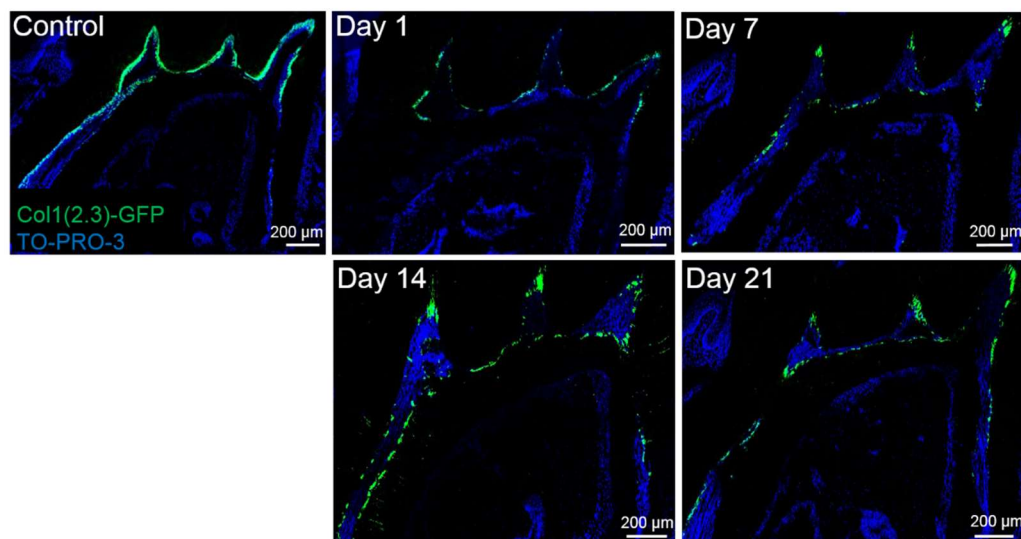


図 2 象牙芽細胞の枯渇実験

A

象牙芽細胞の再生



B

Control (DTR)

Col1(2.3)-Cre/DTR

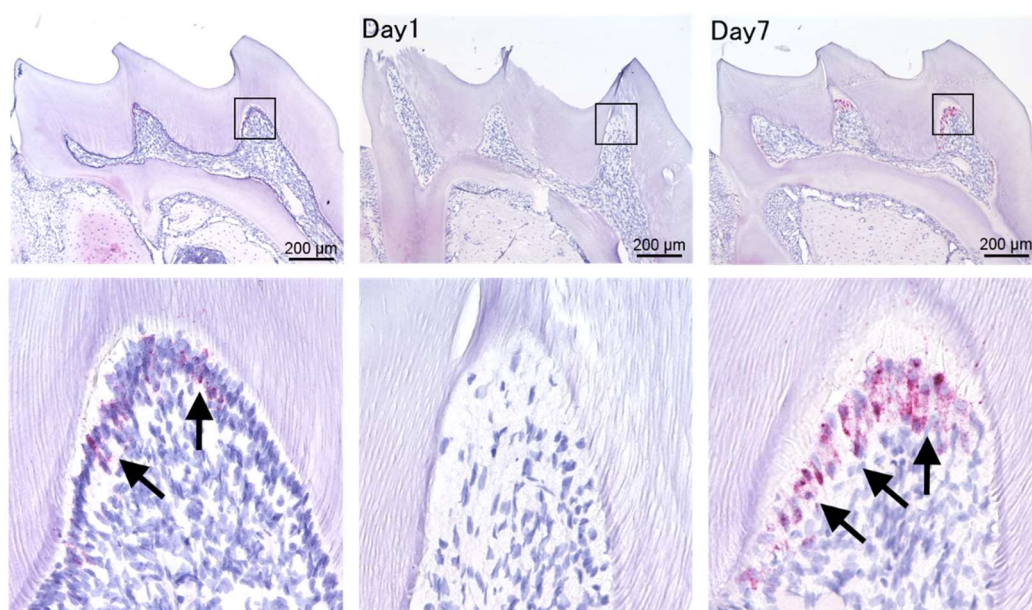


図 3 象牙芽細胞の枯渇後における新生象牙芽細胞の観察

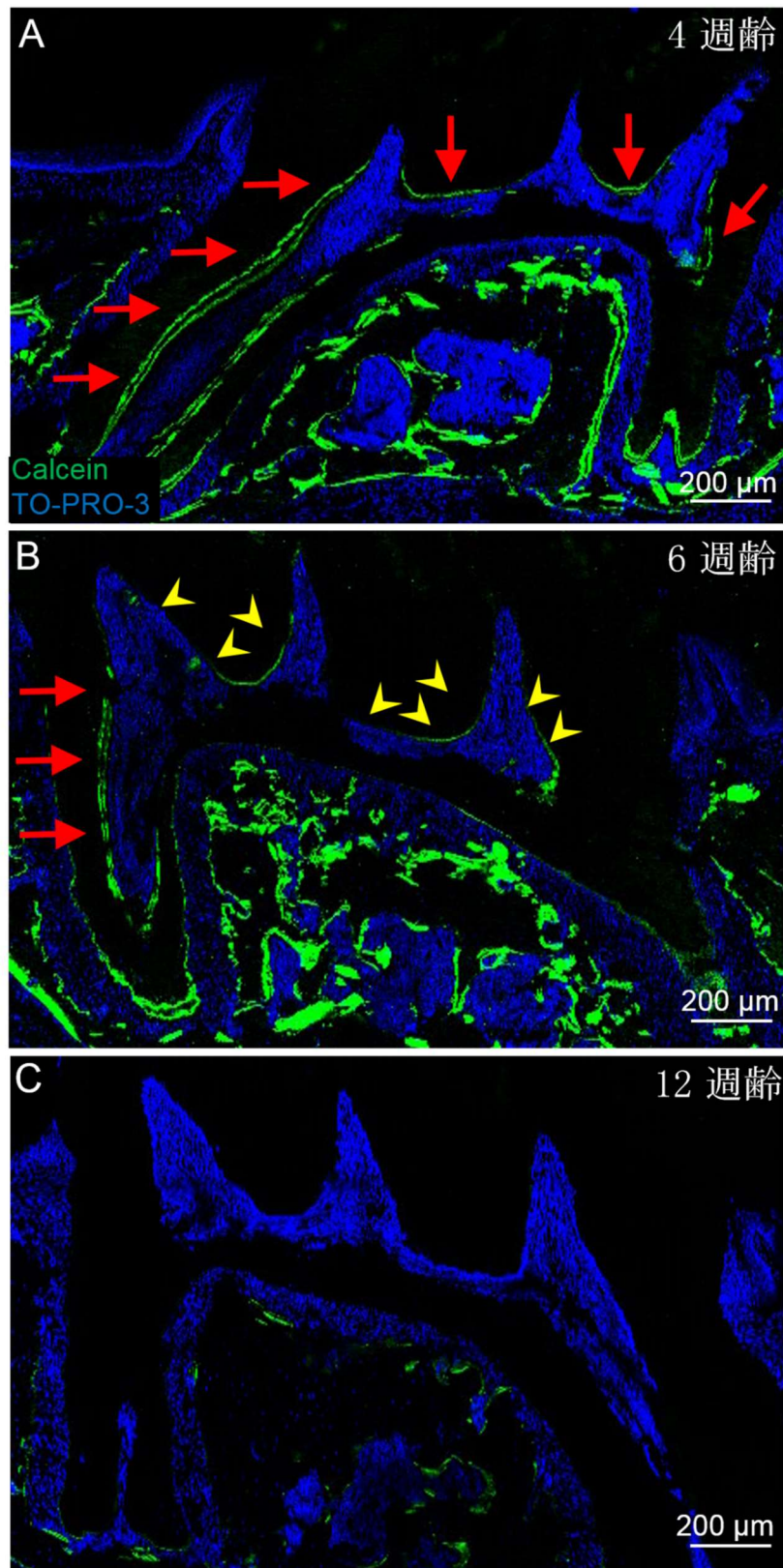


図 4 象牙芽細胞の石灰化活性の解析

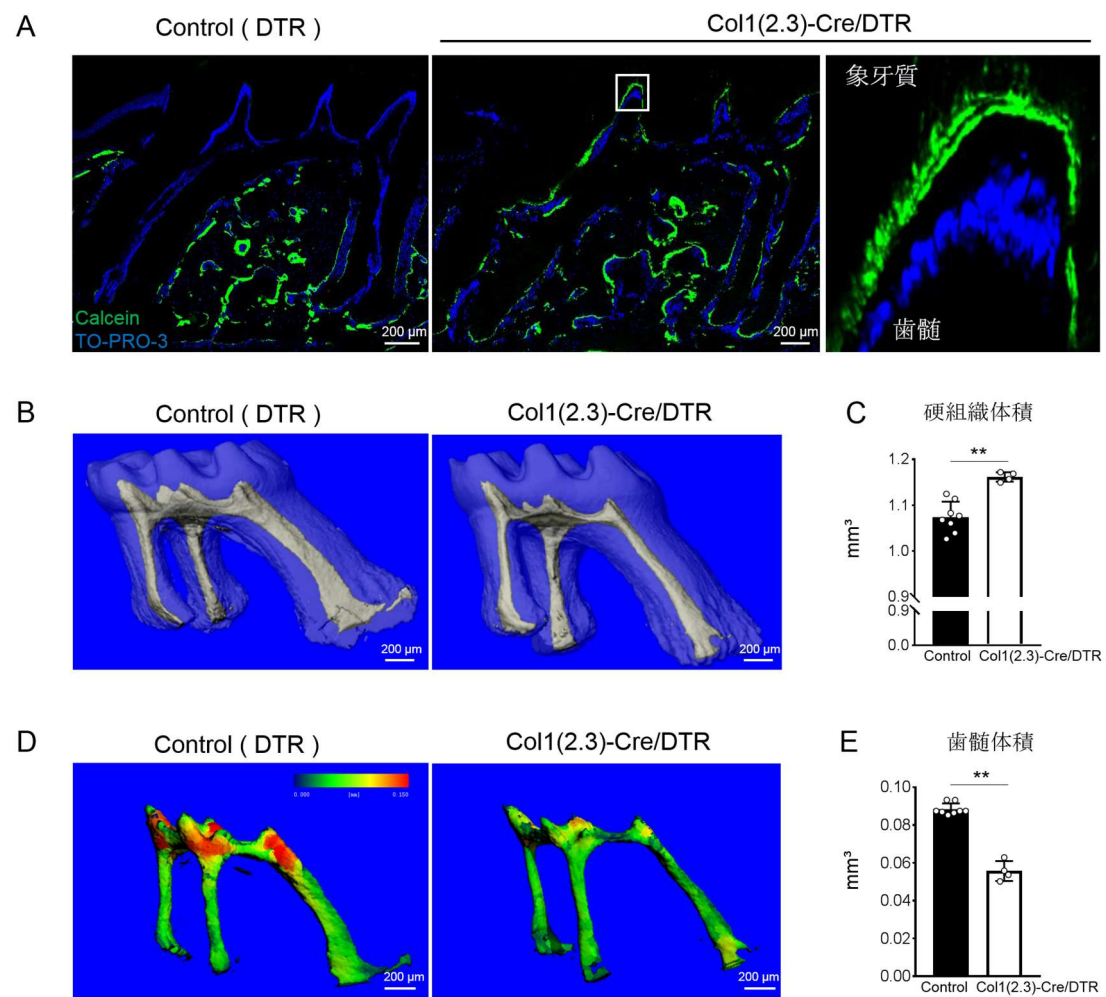


図 5 象牙芽細胞の枯渇後における新生象牙質の観察

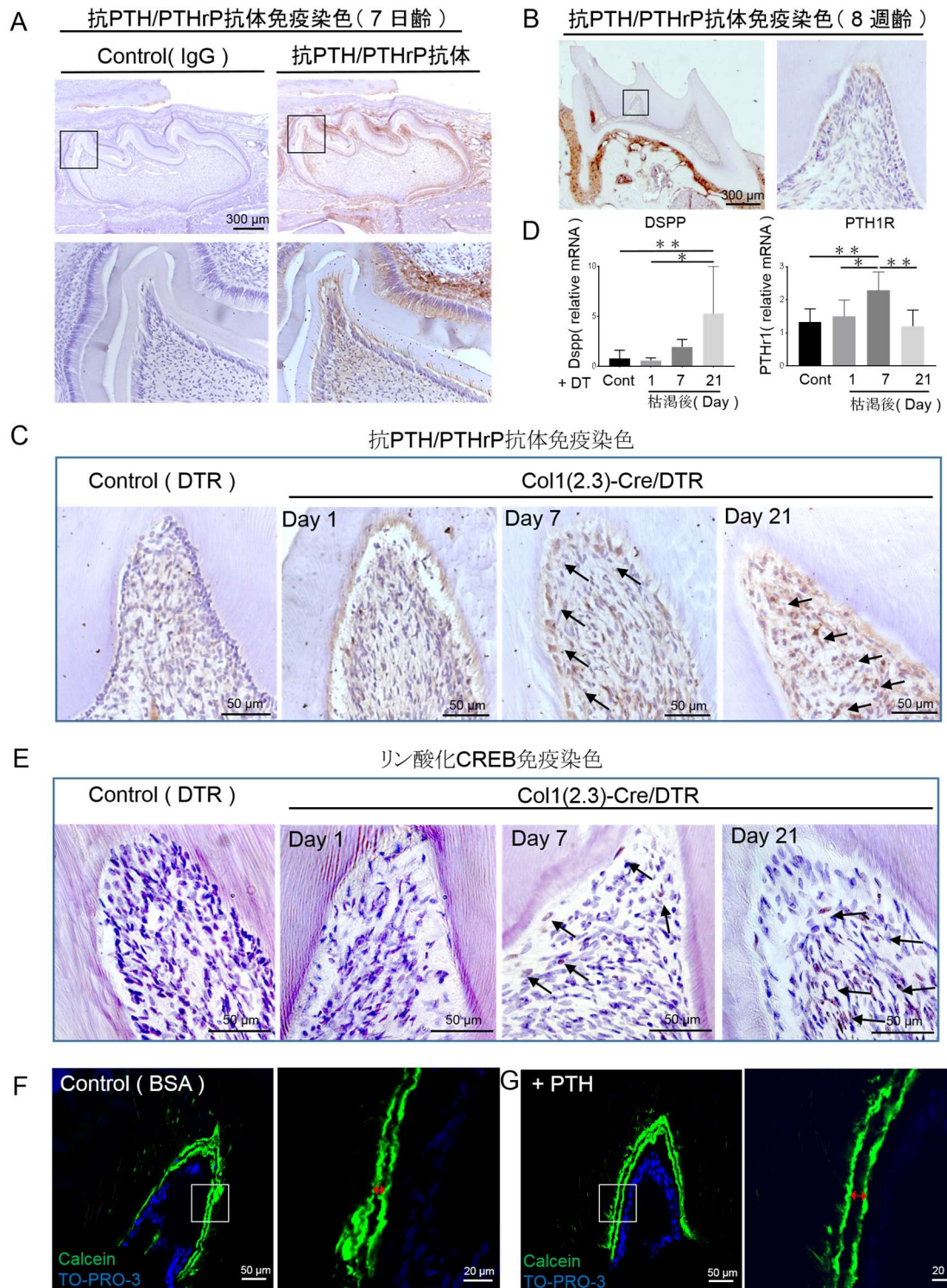


図 6 象牙芽細胞の枯渇後に活性化されるシグナル伝達経路の探索

図表の説明

図 1 象牙芽細胞に特異的なマーカー蛋白質の探索

Col1(2.3)-GFP マウスの大臼歯の凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察。

緑: Col1(2.3)-GFP 陽性の象牙芽細胞. 青: TO-PRO-3 (APC)陽性の核.

赤い矢印: Col1(2.3)-GFP 陽性の象牙芽細胞. スケールバー, 200 μm .

図 2 象牙芽細胞の枯渇実験

A. 象牙芽細胞の枯渇実験に用いる遺伝子改変マウス

B. 野生型マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスの歯髄組織の抗 DTR 抗体による免疫染色. 矢印: DTR 陽性細胞. スケールバー, 20 μm .

C. 12 週齢のコントロール(DTR)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与後に歯髄組織を HE 染色で観察. 上段: DTR, 下段: Col1(2.3)-Cre/DTR マウス. 矢印: 象牙芽細胞. スケールバー, 200 μm .

図 3 象牙芽細胞の枯渇後における新生象牙芽細胞の観察

A. 12 週齢の Col1(2.3)-GFP/Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与. DT 最終投与の 1, 7, 14, 21 日目の Col(2.3)-GFP 陽性の象牙芽細胞を共焦点レーザー顕微鏡下で観察. コントロール[Col1(2.3)-GFP/DTR]マウスは, DT 最終投与の 1 日目の歯髄組織を観察. 緑: Col1(2.3)-GFP 陽性の象牙芽細胞. 青: TO-PRO-3 (APC)陽性の核. スケールバー, 200 μm .

B. 12 週齢のコントロール(DTR)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与. DT 最終投与の 1, 7 日目の DSPP 陽性の象牙芽細胞を in situ ハイブリダイゼーションにより観察. コントロール(DTR)マウスは, DT 最終投与の 1 日目の歯髄組織を観察. 矢印: DSPP 陽性の象牙芽細胞. スケールバー, 200 μm .

図 4 象牙芽細胞の石灰化活性の解析

4, 6, 12 週齢の野生型マウスにカルセインを 4 日間の間隔をあけて 2 回投与した. カルセインを取り込んだ硬組織を共焦点レーザー顕微鏡下で観察.

緑: カルセイン. 青: TO-PRO-3(APC)陽性の核.

赤色矢印: カルセインの 2 重標識部位. 黄色矢頭: カルセインの 1 重標識部位. スケールバー, 200 μm .

図 5 象牙芽細胞の枯渇後における新生象牙質の観察

A. 12 週齢のコントロール(DTR)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与. DT 最終投与の 3 および 6 日目のにカルセインを投与して, 7 日目に

歯を回収した. 新生象牙質は共焦点レーザー顕微鏡下で観察した. 緑: カルセイン. 青: TO-PRO-3 (APC)陽性の核. スケールバー, 200 μ m.

BとD. 19 週齢のコントロール(DTR)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与. DT 最終投与の 6 週後に micro-CT 解析を行った. 硬組織と歯髓の 3D 画像(B). 歯髓の 3D 画像(D). 緑:狭い空間. 赤:広い空間.

C. 硬組織体積の定量解析.

E. 歯髓体積の定量解析. $n = 4-8$ ** $P < 0.01$, 平均 \pm SD.

図 6 象牙芽細胞の枯渇後に活性化されるシグナル伝達経路の探索

AとB. 野生型マウスの歯髓組織における抗 PTH/PTHrP 受容体抗体による免疫染色. Aは 7 日齢の組織, Bは 8 週齢の組織. スケールバー, 300 μ m.

C. 12 週齢のコントロール(DTR)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与. DT 最終投与の 1, 7, 21 日目の歯髓組織の抗 PTH/PTHrP 受容体抗体による免疫染色. コントロール(DTR)マウスは, DT 最終投与の 1 日目の組織を観察. 矢印: PTH/PTHrP 受容体陽性の細胞. スケールバー, 50 μ m.

D. 12 週齢のコントロール(DTR)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与. DT 最終投与の 1, 7, 21 日目の歯髓組織の RNA を回収し, DSPP および PTHr1 の Real-time PCR 解析を行った. Eefla1 を内部標準にして解析. $n = 3$ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 平均 \pm SD.

E. 12 週齢のコントロール(DTR)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与. DT 最終投与の 1, 7, 21 日目の歯髓組織のリン酸化 CREB の解析. コントロール(DTR)マウスは, DT 最終投与の 1 日目の歯髓組織を観察. 矢印: リン酸化 CREB 陽性の細胞. スケールバー, 50 μ m.

FとG. 12 週齢のコントロール(DTR)マウスおよび Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT(250 ng/匹/日)を 1 週間腹腔投与. DT の最終投与の 24 時間後から, PTH(1-34)(80 μ g/kg)を 12 時間ごとに 16 日間投与. コントロール群には, 0.1%BSA(bovine serum albumin)を投与. 5 日間隔でカルセインを 2 回投与し, 最終投与の 24 時間後に第一臼歯を回収した. 共焦点レーザー顕微鏡下でカルセインラベルを観察. 緑: カルセイン. 青: TO-PRO-3 (APC)陽性の核. 両矢印: 新生象牙質. スケールバー, 50 μ m (F), 20 μ m (G)