

研究者：松田紗衣佳（所属：松本歯科大学 小児歯科学講座）

研究題目：GFP 移植骨髄由来細胞の実験的に引き起こしたマウス歯根膜息肉への移動と分化

目的：

日常の歯科臨床において、齶蝕による髓床底穿孔は、根管治療時にしばしば遭遇する。穿孔が大きい場合には同部に肉芽組織が増殖し、ポリープを形成するが、その細胞がどこから供給されているか明確にされていない。そこで、当該の歯根膜部にみられる肉芽組織の構成細胞が当該部での細胞増殖ばかりでなく、骨髄の未分化間葉細胞の移動によることを明らかにすることを目的とした。

材料および方法：

実験には、GFP 骨髄移植マウスモデルを使用し、マウスの上顎第一臼歯の髓床底部を 1/2 歯科用ラウンドバーを用い穿孔し、以後 m_CT と病理組織学的に検討するとともに、GFP, S100A4, Runx2, CD31 などについて最長 6 か月まで免疫蛍光染色により検討した。

結果および考察：

m_CT 像では、どの時期においても、歯槽骨の吸収と歯根膜腔の拡大が生じていた (Fig.1~3-a)。術後 2 週間の病理組織像では増殖細胞の主体は、線維芽細胞であり、その細胞の形態は、短い紡錘形で、その核は比較的丸いものが多かった。肉芽組織の最表層には、細胞間橋の明瞭な多角形の上皮細胞が増殖していた。当該の歯根膜部には正常な生理的な配列の歯根膜組織は無く、一部に好中球などの炎症性細胞が認められた (Fig.1-b, c)。術後 1 か月の病理組織像では、線維芽細胞は 2 週と同様、核は丸みをおび、肉芽組織の主をなしていた。髓床底直下にできた肉芽組織は穿孔部より髓腔内に盛り上がり、最表層は、重層扁平上皮で覆われていた。毛細血管は、2 週と比較して増殖し、とくに上皮直下に多く存在していた (Fig.2-b, c)。術後 3 か月では、増殖した肉芽組織内の線維芽細胞の核は扁平に変化し、膠原線維が目立つようになってきた。重層扁平上皮は厚みを増していた。毛細血管は、肉芽組織内に多数存在した。術後 6 か月では、増殖した肉芽組織には、膠原線維と、核の扁平な線維芽細胞が、より目立ち、リンパ球はその中に点在していた (Fig.3-b, c)。

GFP の免疫染色では、当該部の肉芽組織内に陽性細胞が多数みられた (Fig.1~3-d)。これら GFP 陽性細胞について、その細胞種の同定を行うために、蛍光免疫二重染色を行った。GFP-S100A4 の組み合わせでは、2 週、6 か月ともに、紡錘形の核を持った長紡錘形の細胞に緑色蛍光を示す GFP 陽性所見があり (Fig.4-a)、これらの外形を示す細胞に赤色反応の S100A4 陽性反応が認められた (Fig.4-b)。これらを重ね合わせによって確認すると、橙色に発色する両者の一致を示す場所があった (Fig.4-c)。さらに核を青色蛍光に発色する DAPI と重ね合わせると、橙色は核の周囲を取り込むように認められた (Fig.4-d)。GFP-Runx2 の組み合わせについ

では、肉芽組織内には、紡錘状で、丸みをおびたものがあり、同部位には緑色蛍光を発する GFP 陽性所見があり (Fig.5-a), これらの外形を示す細胞に、赤色蛍光の Runx2 陽性所見が認められた (Fig.5-b)。これを重ね合わせによって確認すると、橙色に発色する両者の一致を示した (Fig.5-c)。形態は、さらに核を青色蛍光に発色する DAPI と重ね合わせると、橙色は核の周囲を取り込むようになっていた (Fig.5-d)。GFP-CD31 では、明瞭な血管腔がみられる部位では、血管内腔面に GFP 陽性の内皮細胞の細胞質が配置していた (Fig.6-a)。この血管腔を作る血管内皮細胞に赤色蛍光の CD31 陽性反応が認められた (Fig.6-b)。これらの重ね合わせでは、GFP-S100A4, GFP-Runx2 と同様であった (Fig.6-c, d)。

今回 GFP マウスの第一臼歯の髓床底を穿孔して根分歧部病変を形成し、病理組織学的に病変の進展過程や、増殖した肉芽組織の構成細胞の由来を明確にすることとした。その結果、病理組織学的検討では、初期では若干の化膿性炎症が引き起こされるが、次第に慢性炎症として肉芽組織の増殖が起きていくことが分かった。蛍光二重染色を行った結果、GFP-S100A4 では、紡錘形細胞に S100A4 陽性反応がみられ、かつ、GFP 陽性反応を示したことから通常型の線維芽細胞が骨髓由来であることが分かった。GFP-Runx2 では、肉芽組織内の紡錘形細胞に Runx2 陽性反応を認め、GFP 陽性反応を示したことから、通常の線維芽細胞とは異なった歯根膜特有の線維芽細胞も骨髓に由来することが示唆された。GFP-CD31 において、形態学的に明瞭な血管において CD31 陽性反応を示し、GFP 陽性反応を認めたため、血管内皮細胞も骨髓細胞に由来するもののあることが示された。以上から、髓床底穿孔部にできた歯根膜ポリープには、毛細血管内皮細胞や、線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞が増殖本態であり、これらはいずれも移植骨髓細胞に由来するものであることが分かった。

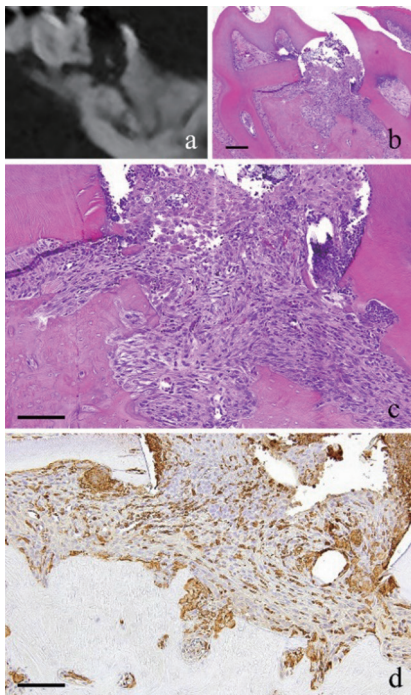


Fig.1. 術後2週間
a: m_CT 術直後矢状断面像
b, c: 髓床底部病理組織像 (H-E)
d, e: 免疫染色像 (GFP)

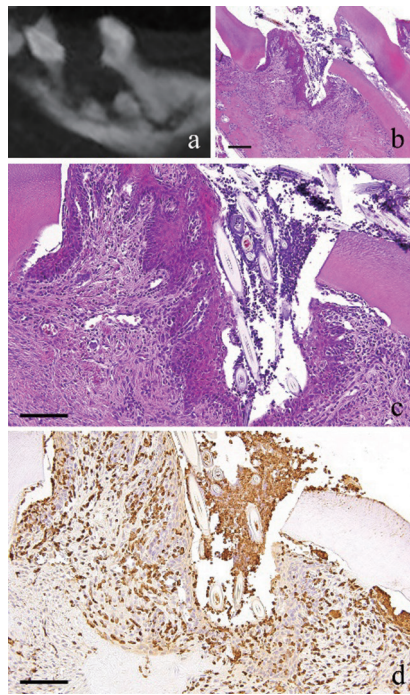


Fig.2. 術後1か月
a: m_CT 術直後矢状断面像
b, c: 髓床底部病理組織像 (H-E)
d, e: 免疫染色像 (GFP)

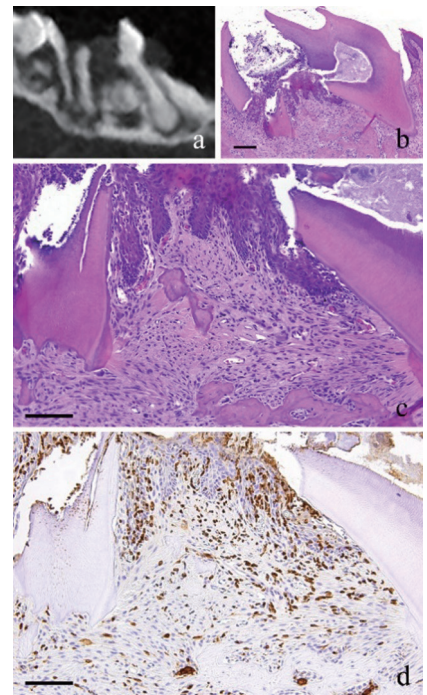


Fig.3. 術後6か月
a: m_CT 術直後矢状断面像
b, c: 髓床底部病理組織像 (H-E)
d, e: 免疫染色像 (GFP)

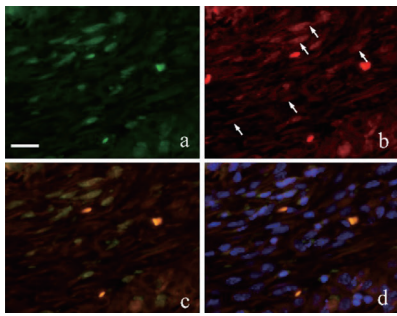


Fig.4. 術後2週間
 a : GFP (緑)
 b : S100A4 (赤)
 c : GFP + S100A4 (橙)
 d : GFP + S100A4 + DAPI (青)

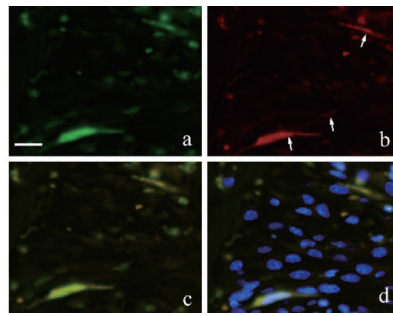


Fig.5. 術後2週間
 a : GFP (緑)
 b : Runx2 (赤)
 c : GFP + Runx2 (橙)
 d : GFP + Runx2 + DAPI (青)

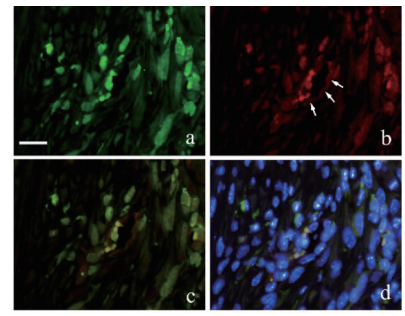


Fig.6. 術後2週間
 a : GFP (緑)
 b : CD31 (赤)
 c : GFP + CD31 (橙)
 d : GFP + CD31 + DAPI (青)

成果発表：

著書：

- 1 : Chapter 9. Injury and recovery of the periodontal ligament : From a view point of developmental biology. In *Advances in Medicine and Biology*, Vol 111. Berhardt LV ed., Nova Biomedical Publisher, NY, USA, pp173-220, January 2017. Kawakami T, Tsujigiwa H, Takaya T, Kaneko K, Mimura H, Matsuda S, Muraoka R, Tomida M, Okafuji N, Fujii T, Nakano K and Nagatsuka H.

発表論文：

- 1 : Migration and Differentiation of GFP-transplanted Bone Marrow-derived Cells into Experimentally Induced Periodontal Polyp in Mice (2016) Saeka Matsuda, Masahito Shoumura, Naoto Osuga, Hidetsugu Tsujigiwa, Keisuke Nakano, Norimasa Okafuji, Takanaga Ochiai, Hiromasa Hasegawa and Toshiyuki Kawakami. *I Journal of Medical Science* 13 : 500-506.
- 2 : Overview of Cytological Daynamic of Periodontal Ligament Inflammatory Lesions (2016) Saeka Matusuda, Keisuke Nakano, Hidetsugu Tsujigiwa, Kiyofumi Takabatake, Norimasa Okafuji, Masahito Shoumura, Naoto Osuga, Hitoshi Nagatuka, Toshiyuki Kawakami. *I Journal of Dentistry and Oral Science* S9 : 001, 1-7.

学会発表：

- 1 : 10th Biennial Confernce of the Pediatric Dentistry Association of Asia (東京) 2015年5月
 GFP Transplanted Bone Marrow-Derived Cell Migration and Differentiation into Periodontal Polyp in Mice : Saeka Matsuda, Atsuko Matsuda, Akio Kida, Keita Moriyama, Yukiko Yokoi, Masahito Shoumura, Naoto Osuga
- 2 : 13th Biennial Congress of EAOM (Italy) 2016年9月
 Cell Migration and Differentiation of BMDCS into Periodontal Polyp : Saeka Matsuda, Masahito Shoumura, Naoto Osuga, Hidetsugu Tsujigiwa, Keisuke Nakano, Norimasa Okafuji, Takanaga Ochiai, Hiromasa Hasegawa, Toshiyuki Kawakami.
- 3 : 第55回 日本小児歯科学会 2017年5月 ポスター発表予定
 歯根膜の慢性増殖性炎における骨髄由来未分化間葉細胞の局所特有の線維芽細胞への分化 : 松田紗衣佳, 松田厚子, 紀田晃生, 水島秀元, 森山敬太, 横井由紀子, 正村正仁, 大須賀直人