

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	東 京 歯 科 大 学	研究所名等	口腔科学研究センター
研究課題	新規の歯根膜幹細胞を活用した顎骨修復治療法の開発 －健康寿命を支える新たなインプラント治療法の確立－	研究分野	医 学
キーワード	①歯根膜幹細胞②抜歯窩③顎骨修復④インプラント治療⑤健康寿命⑥遺伝子改変マウス⑦細胞系譜解析⑧1細胞解析		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
溝 口 利 英	東 京 歯 科 大 学 口腔科学研究センター	准 教 授	研究の総括、セルソーティング実験、1細胞解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
東 俊 文	東 京 歯 科 大 学 生 化 学 講 座	教 授	遺伝子情報解析
澁 川 義 幸	東 京 歯 科 大 学 生 理 学 講 座	教 授	新規歯根膜幹細胞の組織学的解析
松 永 智	東 京 歯 科 大 学 解 剖 学 講 座	准 教 授	新規歯根膜幹細胞の組織学的解析
木 村 麻 記	東 京 歯 科 大 学 生 理 学 講 座	講 師	新規歯根膜幹細胞の組織学的解析
黄 地 健 仁	東 京 歯 科 大 学 生 理 学 講 座	助 教	セルソーティング実験、1細胞解析

# 新規の歯根膜幹細胞を活用した顎骨修復治療法の開発 ー健康寿命を支える新たなインプラント治療法の確立ー

## 1. 研究の目的

### 「インプラント治療に適した抜歯窩の石灰化修復を促進する新規技術の開発」

抜歯窩の修復には、歯根膜に局在する幹細胞が寄与することが明らかとなり、その幹細胞の性状に関する報告が散見される。しかし我々は、抜歯窩の硬組織形成には、既報の細胞ではなく、新たな幹細胞画分が寄与することを示す所見を得ている。

本申請研究では、生体内で標識した細胞の系譜を追うことを可能にする細胞系譜解析法、および1細胞レベルのRNAシーケンス解析を活用することにより、新規の歯根膜細胞画分を同定し、硬組織修復機構を包括的に理解する。さらに、得られた知見を基に、新規幹細胞の活用を基盤とした抜歯窩の修復法を適用した新たなインプラント治療法の提案に繋げる事を究極的な研究目標として掲げる。

## 2. 研究の計画

### (1) 歯根膜細胞に含まれる亜集団の解明

レプチン受容体(LepR)陽性の歯根膜(PDL)幹細胞を色素標識するために、LepR-Cre/flox-stop-flox-tdTomato(LepR;floxed-Tom)マウスを作製した。このマウスからPDLを回収し、1細胞RNA-seq解析を行った。1細胞ごとの遺伝子プロファイル情報をもとに細胞をクラスタリングし、PDLに含まれる細胞を解析した。

### (2) 擬時間解析によるPDL細胞における分化ヒエラルキーの解析

上記で得られた遺伝子プロファイル情報をもとに、擬時間軸に各クラスターを配置し、PDLに含まれる細胞の分化ヒエラルキーを解析した。

## 3. 研究の成果

### (1) 歯根膜細胞に含まれる亜集団の解明

LepR;floxed-Tomマウスにおける、PDL細胞の1細胞解析の結果、PDLには、PDL細胞の他、骨芽細胞/セメント芽細胞、上皮系細胞、および血管内皮細胞が存在することが示された。PDL細胞と骨芽細胞/セメント芽細胞の再クラスタリング解析の結果、PDLは5つの異なる遺伝子プロファイルを有する1-5のクラスター、および骨芽細胞/セメント芽細胞のクラスターに分類された。また、PDL3と5にLepR陽性PDL幹細胞が含まれることが明らかになった。

### (2) 擬時間解析によるPDL細胞における分化ヒエラルキーの解析

PDL細胞と骨芽細胞/セメント芽細胞の再クラスタリング解析により得られた5つのPDLクラスターと骨芽細胞/セメント芽細胞のクラスターを用いて擬時間解析を実施した。その結果、LepR陽性PDL細胞を含むクラスターPDL5を開始点として、PDL3を介して骨芽細胞/セメント芽細胞に分化することが示された。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 歯根膜細胞に含まれる亜集団の解明

① マウスの交配が予定通りに進まずに、やや計画に遅れが生じた。今後は効率的な交配計画を立て直す必要がある。

② PDLの1細胞解析から、これまで報告されたPDL幹細胞画分は完全には重複していないことが示唆された。

### (2) 擬時間解析によるPDL細胞における分化ヒエラルキーの解析

これまでLepR陽性のPDL幹細胞が、骨芽細胞やセメント芽細胞に分化することが、細胞系譜解析で示されていたが、今回、遺伝子情報解析によっても確認された。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Oka H, Ito S., Kawakami M, Sasaki H, Abe S, Matsunaga S, Morita S, Noguchi T, Kasahara N, Tokuyama A, Kasahara M, Katakura A, Yajima Y, Mizoguchi T.: Subset of the periodontal ligament expressed leptin receptor contributes to part of hard tissue-forming cells. *Sci Rep*, 13(1):3442, 2023 doi: 10.1038/s41598-023-30446-w.
- ② Seki Y, Takebe H, Mizoguchi T, Nakamura H, Iijima M, Irie K, Hosoya A.: Differentiation ability of Gli1+ cells during orthodontic tooth movement. *Bone*, 166:116609, 2023 doi: 10.1016/j.bone.2022.116609.
- ③ Shin M, Mori S, Mizoguchi T, Arai A, Kajiya H, Okamoto F, Bartlett JD, Matsushita M, Udagawa N, Okabe K.: Mesenchymal cell TRPM7 expression is required for bone formation via the regulation of chondrogenesis. *Bone*, 166:116579, 2023 doi: 10.1016/j.bone.2022.116579.
- ④ Nazmus S, Seki Y, Takebe H, Fujii S, Mizoguchi T, Nakamura H, Yoshida N, Yoshida K, Iijima M, Shimo T, Irie K, Hosoya A.: Gli1<sup>+</sup>-PDL cells contribute to alveolar bone homeostasis and regeneration. *J Dent Res*, 101(12):1537, 2022 doi: 10.1177/00220345221106921.
- ⑤ Ohyama S, Ouchi T, Kimura M, Kurashima R, Yasumatsu K, Nishida D, Hitomi S, Ubaidus S, Kuroda H, Ito S, Takano M, Ono K, Mizoguchi T, Katakura A, Shibukawa Y. Piezo1-pannexin-1 P2X3 axis in odontoblasts and neurons mediates sensory transduction in dentinal sensitivity. *Front Physiol*, 13:891759. doi:10.3389/fphys.2022.891759
- ⑥ Saito N, Kimura M, Ouchi T, Ichinohe T, Shibukawa Y. Gα<sub>s</sub>-Coupled CGRP Receptor Signaling Axis from the Trigeminal Ganglion Neuron to Odontoblast Negatively Regulates Dentin Mineralization. *Biomolecules*, 2022; 12(12):1747. doi.org/10.3390/biom12121747
- ⑦ Koresawa K, Matsunaga S, Hikita A, Okudera H, Yamaguchi A, Yajima Y, Abe S. Micro/nano structural properties in peri-implant jaw bone of human cadaver. *Int J Implant Dent*, 8:17, 2022. doi: 10.1186/s40729-022-00417-3.
- ⑧ Matsunaga S, Yamada M, Kasahara N, Noguchi T, Morita S, Kitamura K, Suzuki M, Tamiya Y, Yamamoto H, Abe S, Furusawa M. Japanese Maxillary First Molar Root Canal Morphology: An Ultrastructural Study Using Micro-Computed Tomography. *J Hard Tissue Biol*, 31:1-6, 2022. <https://doi.org/10.2485/jhtb.31.109>.
- ⑨ Oomura Y, Matsunaga S, Okamura M, Suzuki T, Kasahara N, Abe S, Nomura T. Effect of zoledronic acid on bone quality of the mandible in ovariectomized mice. *J Hard Tissue Biol*, 31:207-214, 2022. <https://doi.org/10.2485/jhtb.31.207>.
- ⑩ Nakamura Y, Onodera S, Takano M, Katakura A, Nomura T, Azuma T. Development of a targeted gene panel for the diagnosis of Gorlin syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2022 Nov;51(11):1431-1444. doi: 10.1016/j.ijom.2022.03.054.
- ⑪ Aoki H, Suzuki E, Nakamura T, Onodera S, Saito A, Ohtaka M, Nakanishi M, Nishimura K, Saito A, Azuma T. Induced pluripotent stem cells from homozygous Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation. *Med Mol Morphol*, 2022 Sep;55(3):174-186. doi: 10.1007/s00795-022-00317-w.
- ⑫ Takada K, Odashima A, Onodera S, Saito A, Aida N, Furusawa M, Azuma T. The effect of BMP4, FGF8 and WNT3a on mouse iPS cells differentiating to odontoblast-like cells. *Med Mol Morphol*, 2022 Sep;55(3):199-209. doi: 10.1007/s00795-022-00318-9.
- ⑬ Furukawa Y, Odashima A, Hoshino T, Onodera S, Saito A, Ichinohe T, Azuma T. Effects of KnockOut Serum Replacement on Differentiation of Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells into Odontoblasts. *Bull Tokyo Dent Coll*, 2022 Jun 15;63(2):75-83. doi: 10.2209/tdcpublication.2021-0042.
- ⑭ Hojo H, Saito T, He X, Guo Q, Onodera S, Azuma T, Koebis M, Nakao K, Aiba A, Seki M, Suzuki Y, Okada H, Tanaka S, Chung UI, McMahon AP, Ohba S. Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages. *Cell Rep*, 2022 Sep 6;40(10):111315. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111315.
- ⑮ Natsuko Aida, Tatsukuni Ohno, Toshifumi Azuma. Progress and current status in Hajdu-Cheney syndrome with focus on novel genetic research. *Int. J. Mol. Sci*, 2022, 23(19), 11374; doi.org/10.3390/ijms231911374.

(2) 口頭発表

(特別講演、シンポジウム)

- ①溝口利英：硬組織形成細胞の供給システム、第7回日本骨免疫学会ウインタースクール BONE シンポジウム、2023年1月31日 飯山市(斑尾高原ホテル)
- ②溝口利英：生体内における骨芽細胞供給システムの多様性、広島大学セミナー、2022年11月8日、広島市(広島大学歯学部)
- ③溝口利英：硬組織形成を司る幹細胞の in vivo 解析、第64回歯科基礎医学会学術大会 メインシンポジウム 2022年9月17日 徳島(徳島大学)
- ④溝口利英：The origin of hard tissue-forming cells: history of research and recent findings、公益法人ときわ会 先端医学研究センター (RIIM) 5周年シンポジウム、2022年6月5日 いわき市(公益財団法人ときわ会 常磐病院)
- ⑤溝口利英：骨と歯を調節する間葉系細胞のお話、九州臨床再生歯科研究会、2022年5月11日、(Web開催)  
(一般講演)
- ⑥高濱暁、関有里、佐藤幸平、建部廣明、溝口利英、八若保孝、細矢明宏：Gli1陽性歯髓細胞の象牙質再生過程における機能解析、第64回歯科基礎医学会学術大会、2022年9月17-19日 徳島(徳島大学)
- ⑦伊藤慎一郎、笠原典夫、北村啓、松永智、溝口利英、笠原正貴、山口朗：抜歯窩と大腿骨骨欠損の骨治癒過程における病理学的差異、第64回歯科基礎医学会学術大会、2022年9月17-19日 徳島(徳島大学)
- ⑧Zhifeng H, Mizoguchi T, Hiraga T, Nakamichi Y, Yamashita T, Koide M, Udagawa N, Kobayashi Y.: Macrophages promote bone regeneration through the activation of LepR (+) cells、第64回歯科基礎医学会学術大会、2022年9月17-19日 徳島(徳島大学)
- ⑨平賀 徹、溝口利英：顆粒球コロニー刺激因子は乳がん骨転移の開始と進展に対し相反する作用を示す、第40回日本骨代謝学会学術集会、2022年、7月22-23日 岐阜市(岐阜都ホテル)
- ⑩溝口利英：象牙芽細胞の細胞死は未分化前駆細胞の象牙芽細胞分化と石灰化を誘導する、第74回日本細胞生物学会 2022年6月28-30日 東京都(タワーホール船堀)
- ⑪山本悠太郎、渡辺 元次、高木 貴博、廣内英智、山本将仁、松永 智、阿部 伸一：コラゲナーゼ注入による筋腱接合部の再生・形態変化と筋機能への影響、第64回歯科基礎医学会学術大会、2022年9月17-19日、徳島県徳島市
- ⑫角田 航、松永 智、大津雄人、北村 啓、佐々木穂高、阿部伸一、関根秀志、矢島安朝：抜歯窩および歯槽骨周辺における知覚神経枝の再生、第52回日本口腔インプラント学会、2022年9月23-25日、愛知県名古屋市
- ⑬松永 智、野口 拓、森田純晴、廣内英智、小川雄大、北村 啓、笠原典夫、山本 仁、阿部伸一：口腔隔膜として機能する顎舌骨筋の構造解析および位置分類、第128回日本解剖学会総会・学術大会、2023年3月20日、東北大学川内北キャンパス  
第128回日本解剖学会総会・全国学術集会講演抄録集p207
- ⑭Yoshiaki Furusawa, Maki Kimura, Isao Okunishi, Takehito Ouchi, Tomoe Kato-Yamada, Ryuya Kurashima, Makoto Sugita, Yoshiyuki Shibukawa, Masahiro Furusawa: Mineralization-Promoting Ability of Hexaraphane® in Human Odontoblasts. 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition. March 15-18, 2023, Portland, USA. Abstract ID#: 3824195
- ⑮Seijin Kwon, Takehito Ouchi, Maki Kimura, Shiro Nakamura, Tomio Inoue, Yoshiyuki Shibukawa, Tatsuya Ichinohe: Expression of mechanosensitive ion channels in mesencephalic trigeminal nucleus neurons. 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition. March 15-18, 2023, Portland, USA. Abstract ID# 3824158
- ⑯間 奈津子、大野 建州、中村 貴、齋藤 暁子、小野寺 晶子、加藤 宏、青木 栄人、東 俊文：Hajdu-Cheney症候群疾患特異的iPS 細胞を用いた破骨細胞分化誘導、第54回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2022年11月4-5日
- ⑰秀島 樹、中村ゆり子、小野寺晶子、野村武史、高野正行、片倉 朗、東 俊文：歯原性角化嚢胞における分子遺伝学的検討 第54回日本臨床分子形態学会総会・学術集会2022年11月4-5日
- ⑱齋藤暁子、中村 貴、小野寺晶子、間 奈津子、岡田 寛之、北條 宏徳、長山 和亮、東俊文：

RUNX2による核膜関連タンパク質の発現調節を介した骨芽細胞分化制御機構. 第95回日本生化学会大会 2022年11月9-11日

- ⑱齋藤暁子、中村 貴、小野寺晶子、間 奈津子、岡田 寛之、北條 宏徳、長山 和亮、東俊文：  
RUNX2による核膜関連タンパク質の発現調節を介した骨芽細胞分化制御機構. 第45回日本分子生物学会年会 2022年11月30-12月2日

(3) 出版物

- ①松永 智, 阿部伸一 他 (分担執筆)

Crosslink言語聴覚療法学テキスト『発声発語・摂食嚥下の解剖・生理学』  
第1章 発声発語と摂食嚥下に関わる器官 3. 鼻腔・咽頭 4. 喉頭 5. 食道  
メジカルレビュー社, 東京, 2022

- ②溝口利英 (分担執筆)

骨髄間葉系細胞から骨芽細胞への分化  
日本臨牀増刊 最新の骨粗鬆症学 (第2版)-骨粗鬆症の最新知見-  
日本臨牀社, 東京, 2023