

2023年度（第48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 歯 学 部	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 歯 学 部	教 授	遺伝子情報解析
澁 川 義 幸	東 京 歯 科 大 学 歯 学 部	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 歯 学 部	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 歯 学 部	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 歯 学 部	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 —健康寿命を支える新たなインプラント治療法の確立—

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) レプチン受容体(LepR)-cre で標識される歯根膜幹細胞画分の亜集団の解析

これまでRunx2プロモーターの下流でGFPを発現するマウス(Runx2-GFP)の歯根膜を解析し、様々な発現レベルのRunx2-GFP細胞を確認している。そこで、LepR-cre; flox-stop-flox; tdTomato (LepR-cre; floxed-Tom);Runx2-GFPマウスを作製し、歯根膜におけるLepR陽性細胞画分に含まれる亜集団を解析した。解析方法は、凍結切片を用いた共焦点顕微鏡によるイメージング解析、またはフローサイトメーターを用いて解析した。

(2) LepR 陽性歯根膜細胞クラスターの遺伝子プロファイリング解析

2022年度に実施したLepR-cre; floxed-Tomマウスの歯根膜を用いた1細胞解析から得られたデータを活用した情報解析をさらに進め、歯根膜でLepRを発現するクラスターおよびその他のクラスターにおける特徴的な遺伝子発現を調べた。

3. 研究の成果

(1) レプチン受容体(LepR)-cre で標識される歯根膜幹細胞画分の亜集団の解析

LepR-cre; floxed-Tom; Runx2-GFP マウスの上顎第一臼歯におけるイメージング解析の結果、歯根膜にRunx2-GFP発現が陽性および陰性のLepR-Tom⁺細胞が存在することが明らかになった。上顎第一臼歯を抜去し、コラゲナーゼにより歯根膜細胞を回収後、フローサイトメーターを用いた定量解析を行った。その結果、LepR-Tom⁺細胞の約半分(55.0 ± 6.8%)がRunx2-GFP陽性画分であることが明らかになった。以上より、歯根膜のLepR-Tom⁺細胞画分中には、Runx2-GFPが陽性および陰性の亜集団が存在することが示された。

(2) LepR 陽性歯根膜細胞クラスターの遺伝子プロファイリング解析

2022年度に実施したLepR-cre; floxed-Tomの歯根膜を用いた1細胞解析では、歯根膜細胞は、6つのクラスター(PDL1~6)に分類され、その内2つのクラスター(PDL3と5)においてLepRの発現が高いことを明らかにしている。今年度は、歯根膜幹細胞のマーカー遺伝子として知られているGli1とAxin2の分布を調べたが、これらが顕著に発現する歯根膜クラスターは認められなかった。一方、これまで、歯根膜幹細胞のマーカーとして報告されている分子であるThy1、Mfap5、Cygb(*Stem cells* 39:92-102, 2021)の発現は、LepR陽性のPDL3および5のクラスターで高いことが明らかになった。また、破骨細胞分化誘導因子(RANKL: Receptor activator of NF-kappaB ligand)の発現が高いPDLクラスターも見出され、今後はPDL誘導性の破骨細胞分化誘導機構についても解析を進める。

4. 研究の反省・考察

(1) レプチン受容体(LepR)-cre で標識される歯根膜幹細胞画分の亜集団の解析

LepR陽性歯根膜幹細胞画分における亜集団を見出したが、これら各クラスターの性状等については、マイクロダイセクションを活用して今後解析を進める。

(2) LepR陽性歯根膜細胞クラスターの遺伝子プロファイリング解析

今後は、破骨細胞分化誘導因子RANKLの発現をPDLクラスターで特異的に欠損する遺伝子改変マウスを作製し、解析を進めることにより、歯根膜の骨代謝制御機構を明らかにする。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Mizoguchi T. In vivo dynamics of hard tissue-forming cell origins: Insights from Cre/loxP-based cell lineage tracing studies. *The Japanese Dental Science Review*, 60:109–119, 2024 doi: 10.1016/j.jdsr.2024.01.003
- ② Nishijima T, Okuyama K, Shibata S, Kimura H, Shinozaki M, Ouchi T, Mabuchi Y, Ohno T, Nakayama J, Hayatsu M, Uchiyama K, Shindo T, Niiyama E, Toita S, Kawada J, Iwamoto T, Nakamura M, Okano H, Nagoshi N: Novel artificial nerve transplantation of human iPSC-derived neurite bundles enhanced nerve regeneration after peripheral nerve injury. *Inflamm Regen*. 2024, 44(1):6. doi: 10.1186/s41232-024-00319-4.
- ③ Nishimura S., Kariya H., Gakiya Y., Shinohara R., Nakamura Y., Mizoguchi T., Ohashi A., Motoyoshi M., Ninomiya T: LRP1-deficient leptin receptor-positive cells in periodontal ligament tissue reduce alveolar bone mass by inhibiting bone formation. *Archives of Oral Biology*, 158:105853, 2024 doi: 10.1016/j.archoralbio.2023.105853.
- ④ Li B, Lyu P, Tang J, Li J, Ouchi T, Fan Y, Zhao Z, Li L: The Potential Role and Therapeutic Relevance of Cellular Senescence in Skeletal Pathophysiology. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2024, 79(4):glae037. doi: 10.1093/gerona/glae037.
- ⑤ Watanabe G., Yamamoto M., Taniguchi S., Sugiyama Y., Hirouchi H., Ishizuka S., Kitamura K., Mizoguchi T., Takayama T., Hayashi K., Abe S: Chronological Changes in the Expression and Localization of Sox9 between Achilles Tendon Injury and Functional Recovery in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14):11305, 2023 doi:10.3390/ijms241411305.
- ⑥ Fujii S., Takebe H., Mizoguchi T., Nakamura H., Shimo T., Hosoya A: Bone formation ability of Gli1+ cells in the periodontal ligament after tooth extraction. *Bone*, 173:116786, 2023 doi: 10.1016/j.bone.2023.116786.
- ⑦ Nakamura T., Honda S., Ito S., Mizoguchi T., Yamamoto T., Kasahara M., Kabe Y., Matsuo K., Suematsu M: Generation of bicistronic Dmpl-Cre knock-in mice using a self-cleaving 2A peptide. *Journal of Bone Mineral Metabolism*, 41(4):470–480, 2023 doi: 10.1007/s00774-023-01425-y.
- ⑧ Li B, Li J, Li B, Ouchi T, Li L, Li Y, Zhao Z: A single-cell transcriptomic atlas characterizes age-related changes of murine cranial stem cell niches. *Aging Cell*. 2023, e13980. doi: 10.1111/accel.13980.
- ⑨ Kunioku Y, Kimura M, Ouchi T, Fukuda K, Shibukawa Y: Intracellular cAMP Signaling Pathway via Gs Protein-Coupled Receptor Activation in Rat Primary Cultured Trigeminal Ganglion Cells. *Biomedicines*. 2023, 11(9):2347. doi.org/10.3390/biomedicines11092347.
- ⑩ Kitayama E, Kimura M, Ouchi T, Furusawa M, Shibukawa Y: Functional Expression of IP, 5-HT4, D1, A2A, and VIP Receptors in Human Odontoblast Cell Line. *Biomolecules*. 2023, 13, 879. doi: 10.3390/biom13060879.
- ⑪ Nagai S, Kitamura K, Kimura M, Yamamoto H, Katakura A, Shibukawa Y: Functional Expression of Mechanosensitive Piezo1/TRPV4 Channels in Mouse Osteoblasts. *The Bulletin of Tokyo Dental College*. 2023, 64(1):1–11, 2023. doi: 10.2209/tdcpublication.2022-0015.
- ⑫ Kuroda H, Katagiri N, Kagawa K, Imaizumi U, Ishikawa N, Shibukawa Y, Morimoto Y, Sanuki Y: Comparison of Lidocaine and Mepivacaine for Variation in Regional Tissue Oxygenation in Stellate Ganglion Block: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial. *Cureus*. 2023, 15(10): e47938. doi: 10.7759/cureus.47938.
- ⑬ Hasegawa T, Ouchi T, Shibukawa Y, Asoda S, Nakagawa T: Etiology of Oral Potentially Malignant Disorders and Squamous Cell Carcinoma Based on Cellular

Stress Regulation and Matrix Stiffness. *Front. Biosci.* (Landmark Ed). 2023, 28(10), 265. doi: 10.31083/j.fbl2810265.

- ⑭ Ouchi T, Nakagawa T: Cellular Signaling for Dental Physiological Functions. *Biomolecules*. 2023, 13(8):1177. doi: 10.3390/biom13081177.
- ⑮ Li B, Li J, Fan Y, Zhao Z, Li L, Okano H, Ouchi T: Dissecting calvarial bones and sutures at single-cell resolution. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2023, 98(5):1749-1767. doi: 10.1111/brv.12975
- ⑯ Ouchi T, Orsini G, Kajiya M, George A: Editorial: Stem cells in oral cavity: from development to regeneration, Volume II. *Front Cell Dev Biol*. 2023, 11:1207744. doi: 10.3389/fcell.2023.1207744.
- ⑰ Onodera S, Azuma T: Hedgehog-Related Mutation Causes Bone Malformations with or without Hereditary Gene Mutations. *Int J Mol Sci*. 2023 17:24(16):12903. doi: 10.3390/ijms241612903.
- ⑱ Aida N, Saito A, Azuma T: Current Status of Next-Generation Sequencing in Bone Genetic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023 7:24(18):13802. doi: 10.3390/ijms241813802.
- ⑲ Shigematsu M, Takeda K, Matsunaga S, Sendai Y, Matsuura N, Suzuki R, Azuma T, Sasaki H, Okumura K, Sekine H, Yajima Y, Ohno T: Subgingival titanium wire implantation induces weak inflammatory responses but does not promote substantial T cell activation. *Dent Mater J*. 2023 29;42(5):633-640. doi: 10.4012/dmj.2022-258.
- ⑳ Hoshino T, Onodera S, Kimura M, Suematsu M, Ichinohe T, Azuma T: FGF4 and FGF9 have synergistic effects on odontoblast differentiation. *Med Mol Morphol*. 2023;56(3):159-176. doi: 10.1007/s00795-023-00351-2.
- ㉑ Ogura H, Nakamura T, Ishii T, Saito A, Onodera S, Yamaguchi A, Nishii Y, Azuma T: Mechanical stress-induced FGF-2 promotes proliferation and consequently induces osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023 3;684:149145. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.149145.
- ㉒ Aida N, Takeda K, Nakae S, Saito H, Okumura K, Azuma T, Ohno T: IL-33 deficiency suppresses alveolar bone loss in a ligature-induced periodontitis model. *Biomed Res*. 2023;44(1):9-16. doi: 10.2220/biomedres.44.9.
- ㉓ Koyachi M, Sugahara K, Tachizawa K, Nishiyama A, Odaka K, Matsunaga S, Sugimoto M, Tachiki C, Nishii Y, Katakura A: Enhanced precision in genioplasty: a novel intraoperative spatial repositioning using Computer-aided design and manufacturing technology and a holographic mixed reality application. *J Clin Med*. 12(23):7408, 2023 (doi: 10.3390/jcm12237408).
- ㉔ Hayashi Y, Tachiki C, Morikawa T, Aihara Y, Matsunaga S, Sugahara K, Watanabe A, Kawamata T, Nishii Y: Three-dimensional analysis of cranial base structure in patients with facial asymmetry. *Diagnostics*. 14(1):24, 2023 (doi: 10.3390/diagnostics14010024.).

(2) 口頭発表

(特別講演・シンポジウム)

- ① 澁川義幸: 歯の侵害受容機構と組織再生誘導: 歯髄/象牙質疾患への分子創薬戦略, 第101回日本生理学会大会、痛みのグループディナー, 2024年3月28日(北九州市)
- ② 澁川義幸: 口腔粘膜の機能: Revisiting 東京歯科大学 リカレント教育セミナー, 今どきの目で口腔粘膜を見直そう-口腔粘膜から見る医科との診療連携と歯科診療, 2024年3月3日(千代田区)
- ③ 溝口利英: 細胞系譜解析が紐解く硬組織形成細胞の供給システム 第8回骨免疫学会ウィーンスクール 2024年1月31日 長野県(朝日屋旅館)
- ④ 溝口利英: 硬組織の維持および修復を司るレプチン受容体陽性細胞の動態解析 第23回日本再生医療学会 シンポジウム: 間葉系組織の維持・再生を支える組織幹細胞の理解とその深化 2024年3月22日 新潟(朱鷺メッセ)
- ⑤ 溝口利英: 細胞系譜解析が紐解く硬組織形成機構のダイナミズム 第4回信州骨代謝多職

種セミナー 2023年5月27日 松本市 (深志神社 梅風閣)

- ⑥ 澁川義幸: 感覚情報-組織形成機能連関における象牙芽細胞機能制御系の解明, 第315回 東京歯科大学学会 例会、特別講演4、2023年6月3日 (千代田区) (一般講演)
- ① 徳山 彰秀, 伊藤慎一郎, 笠原 正貴, 溝口 利英: 抜歯窩修復骨に寄与する幹細胞画分の同定 第41回日本骨代謝学会学術集会、2023年、7月28日 東京 (都市センターホテル)
- ② 伊藤慎一郎, 徳山 彰秀, 笠原 正貴, 溝口 利英: 歯根膜のレプチン受容体陽性細胞は硬組織形成に寄与する 第41回日本骨代謝学会学術集会、2023年、7月28日 東京 (都市センターホテル)
- ③ Shinichirou Ito, Masataka Kasahara, Toshihide Mizoguchi: Identification of metaphyseal Nestin-GFPbright stromal cells as a skeletal stem cell subpopulation in growing trabecular bone
ASBMR 2023 Annual Meeting, October 15, 2023. Vancouver, BC, Canada (Vancouver Convention Center)
- ④ Shibukawa Y., Kurashima R., Kimura M., Ouchi T.: Piezo1 down-streaming TRP activation in odontoblasts, FAOPS2023, November 1-4th, 2023, Daegu, Korea, Program book p174
- ⑤ Kimura M., Nomura S., Ouchi T., Kurashima R., Kuroda H., Shibukawa Y.: Intracellular cAMP-induced Ca²⁺ Influx via Activation of Protein Kinase A in Odontoblasts, FAOPS2023, November 1-4th, 2023, Daegu, Korea, Program book p175
- ⑥ 黄地健仁, 倉島竜哉, 木村麻記, 澁川義幸: Piezo1陽性象牙芽細胞の発生起源と小胞体ストレス制御機構, 第77回 NPO法人 日本口腔科学会学術集会, 2023年5月11日-13日, 岡山市, 第77回 NPO法人 日本口腔科学会学術集会 プログラム・抄録集, p277
- ⑦ Kurashima R., Kimura M., Ouchi T., Shibukawa Y.: Functional Coupling Among Piezo1, TRPV1, and TRPA1 in Rat Odontoblasts, 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition, Abstract ID#: 3822325, March 15-18, 2023, Portland, USA
- ⑧ Kimura M., Ouchi T., Kurashima R., Kuroda H., Shibukawa Y.: Cyclic-AMP signaling activates Zn²⁺/Gd³⁺-sensitive Ca²⁺ channels in odontoblasts, 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition, Abstract ID#: 3822357, March 15-18, 2023, Portland, USA
- ⑨ Shibukawa Y., Kimura M., Ouchi T., Kurashima R., Kuroda H.: Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in odontoblasts mediates dentinogenesis, 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition, Abstract ID# 3822350, March 15-18, 2023, Portland, USA
- ⑩ Iwasaki R., Ouchi T., Kimura M., Nishiyama A., Kuroda H., Shibukawa Y., Katakura A.: Intercellular communication between trigeminal ganglion neurons and vascular endothelial cells via Gs coupled receptor axis, 日本生理学会第100回記念大会, 2023年3月14日-16日, 京都市, 日本生理学会第100回記念大会プログラム集, 189, 2023
- ⑪ 小野寺 晶子, 齋藤 暁子, 間 奈津子, 東 俊文: Long-ncRNA, RP11-399K21.11 はWnt依存性に骨芽細胞分化を制御する、第41回日本骨代謝学会学術集会 2023年 7月9日 (土)、都市センターホテル
- ⑫ 東 俊文, 齋藤 暁子, 長山 和亮, 小野寺 晶子, 間 奈津子, 岡田 寛之, 北條 宏徳, 加藤 茂明, Runx 2 によるLamina-LINC タンパク質発現の調節は、アクチンフィラメントによって発生する細胞内張力を介して骨芽細胞の機械的ストレス応答を調節する。ラミノパッチ骨病態との関係解明、第41回日本骨代謝学会学術集会 2023年 7月9日 (土)、都市センターホテル
- ⑬ 松永智, 野口拓, 森田純晴, 小川雄大, 鈴木龍, 大津雄人, 頼岡廣明, 阿部伸一 マウス抜歯窩治癒過程における新生骨形成に寄与する血管の局在性, 第53回日本口腔インプラント学会学術大会, 2023年9月16日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ⑭ 松永智, 笠原典夫, 北村啓, 小川雄大, 山本仁, 阿部伸一, マウス抜歯窩の治癒過程におけるType H血管の局在性, 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会講演抄録集