



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical distribution of α SMA immunoreactive cells in the periodontal ligament during tooth eruption and extrusion of first molars in murine maxillae [an abstract of entire text]
Author(s)	丸岡, 春日
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15000号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85302
Type	doctoral thesis
File Information	Haruhi_Maruoka_summary.pdf



学位論文内容の要約

学位論文題目

**Histochemical distribution of α SMA immunoreactive cells
in the periodontal ligament during tooth eruption and
extrusion of first molars in murine maxillae**

(マウス上顎第一臼歯の萌出および挺出時における
歯根膜 α SMA 陽性細胞の組織化学的分布について)

博士の専攻分野名称 博士（歯学） 氏名 丸岡 春日

歯根膜には、血管周囲以外に α SMA 陽性細胞が存在することが報告されており、これらの細胞は、歯根膜に加わる力学的負荷に応じて成熟した歯根膜線維芽細胞から α SMA 筋線維芽細胞に形質転換する可能性が示唆されている。しかし一方、 α SMA は未分化間葉系細胞にも発現することが報告されており、 α SMA 陽性細胞が神経堤由来の歯小嚢に局在すること、さらには、それらがセメント芽細胞、骨芽細胞や歯根膜線維芽細胞へ分化することが報告されている。このように、 α SMA 陽性細胞における発生学的由来、および、力学的負荷による分化・増殖については未だ不明な点が多い。本研究では、 α SMA 陽性細胞の歯の発生段階における分布、ならびに、力学的負荷が変化した場合の局在変化を明らかにするために、各発生段階のマウス上顎第一臼歯の歯根膜、および、対合歯を抜歯することで垂直方向に掛かる咬合力を軽減させた上顎第一臼歯の歯根膜における α SMA 陽性細胞の局在を組織化学的に明らかにすることを目的とした。

生後 7, 10, 12, 14, 21, 49 日齢 C57BL/6J マウスを麻酔下にて、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、上顎骨を摘出した。その後、10%EDTA 溶液にて脱灰、通法にてパラフィン包埋し、厚さ 5 μ m の矢状断パラフィン切片を作製した。これらの切片を用いて、H-E 染色および α SMA, endomucin, c-kit, PCNA の免疫組織化学、endomucin/ α SMA, c-kit/ α SMA 二重染色を行った。さらに、歯に対する垂直方向の力学的負荷を減じた挺出モデルとして、生後 49 日齢 C57BL/6J マウスの下顎右側第一・第二臼歯を抜歯し、抜歯後 1, 3, 7, 14, 21, 28 日経過後にパラホルムアルデヒド溶液にて固定および上顎骨の摘出を行い、マイクロ CT にて上顎臼歯を撮影した。その後、パラフィン切片を作成し、H-E 染色、 α SMA と endomucin の免疫組織化学、および、 α SMA/PCNA 二重染色を行った。また、上顎第一臼歯近心根根尖部歯根膜の幅 350 μ m、高さ 100 μ m の領域における PCNA 陽性細胞数と α SMA 陽性細胞面積を計測した。さらに、生後 28 週齢 Gli1-CreERT2/TdTomato マウスにタモキシフェンを 2 日間に亘って腹腔内投与した後、パラホルムアルデヒド固定し、上顎骨を OTC コンパウンド包埋し凍結切片を作製した。これら切片を用いて、 α SMA および Phospho1 免疫組織化学を施行した。

歯根形成前の生後 7 日および 10 日齢では、歯小嚢全体に α SMA 陽性反応が認められたが、歯根形成が開始する生後 12 日齢になると、 α SMA 陽性反応は根尖部歯根膜と歯小嚢の側方に観察され、歯冠部では減弱する傾向が認められた。歯冠萌出直前の生後 14 日齢では、 α SMA 陽性反応は主に根尖部周囲の歯根膜に限局し、その後、生後 21 日・49 日齢と経時的に減少する傾向が認められた。よって、根尖部に存在する α SMA 陽性細胞は歯小嚢由来の細胞である可能性、および、歯の成長とともに減少する可能性が示唆された。 α SMA 陽性細胞と endomucin 陽性血管との局在を比較すると、生後 12 日齢では endomucin 陽性血管が形成中の歯根膜を含む歯胚全体に分布しており、生後 14 日以降も endomucin 陽性血管は歯根膜や歯髓腔などに広範囲に局在したが、 α SMA 陽性細胞は根尖部歯根膜に限局し、かつ、その数は経時的に減少していた。このように、 α SMA 陽性細胞は、根尖部歯根膜に集積する線維芽細胞様の組織像を示す一方、endomucin 陽性血管を取り囲むことはなかった。次に、未分化間葉系細胞のマーカーである c-kit の局在を経時的に観察すると、 α SMA と同様に、生後 7 日および 10 日齢マウスの歯小嚢に局在するほか、歯乳頭にも発現を認めた。しかし、生後 12 日齢になると、c-kit 陽性反応は、歯小嚢よりも歯乳頭の象牙芽細胞層近傍で

観察され、根尖部歯根膜ではほとんど消失していた。生後 14 日齢以降の歯根膜では c-kit 陽性反応は認められず、c-kit 陽性反応と α SMA 陽性反応は共局在を示さなかった。一方、生後 28 日齢 Gli1-CreERT2/TdTomato マウスの根尖部歯根膜を観察すると、 α SMA 陽性細胞の一部が Gli1 陽性を示し、かつ、Gli1 陽性反応は Phospho1 陽性セメント芽細胞にも認められた。このことから、 α SMA 陽性細胞は c-kit 陽性歯小嚢由来であるが、発生段階で c-kit は歯乳頭の細胞に発現するのに対して、 α SMA 陽性細胞は歯根膜に限局するようになり、ここでは、セメント芽細胞などに分化しうる Gli1 陽性を示す細胞として存在する可能性が推測された。以上より、 α SMA 陽性細胞は成熟した歯根膜線維芽細胞ではなく、ある程度の分化能を有する細胞から分化することが示唆された。

次に、挺出モデルマウスの上顎第一臼歯のマイクロ CT 像を観察すると、抜歯後 14 日経過までは対照群上顎第一臼歯との間に明らかな変化を認めなかったが、抜歯 21 日および 28 日後には、第一臼歯と第二臼歯の歯冠頂の高さが異なっており、第一臼歯の挺出が示唆された。歯根膜に分布する endomucin 陽性血管を観察すると、抜歯 1 日後では明らかな変化は認められなかったが、抜歯 3 日から 28 日経過後に至るまで、endomucin 陽性血管径が拡大する傾向が認められた。また、生後 49 日齢対照群マウスの根尖部歯根膜では、ごくわずかな α SMA 陽性反応しか認められなかったが、抜歯 1 日経過後から α SMA 陽性細胞数が上昇し、抜歯 3 日後に最も増加していた。その後、 α SMA 陽性細胞は経時的に減少した。また、 α SMA 陽性細胞と同様に、PCNA 陽性細胞も抜歯 3 日後まで有意に増加し、その後、経時的に減少していた。

以上の結果から、 α SMA 陽性細胞は c-kit 陽性歯小嚢由来である可能性、一方、c-kit は発生段階とともに歯乳頭の細胞に限局するのに対して、 α SMA 陽性細胞は根尖部歯根膜に局在し、Gli1 を発現する細胞としてセメント芽細胞などに分化しうる可能性が推測された。また、歯の垂直方向の力学的負荷を軽減すると α SMA 陽性細胞数が上昇することから、牽引力などの力学的負荷に反応して増加する細胞であることが強く示唆された。