

平成 30 年 5 月 12 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15762

研究課題名(和文) 歯の再植治療モデルマウスを用いた歯根膜再生への試み

研究課題名(英文) Change to regenerate the periodontal ligament using mouse tooth re-plantation model

研究代表者

岡 暁子 (OKA, KYOKO)

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号：60452778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：外傷などにより口腔内から脱落してしまった永久歯は、可能な限り抜歯窩に再植して固定し機能回復を図る試みがなされていますが、その成功率は高くはありません。再植した後に歯根と歯槽骨の間に歯根膜と呼ばれる結合組織を再生させる方法を確立させる目的でマウスを用いた研究を行いました。マウスの歯根が伸長する仕組みを解析するとともに、マウスの臼歯を人為的に抜歯し、再度抜歯窩に戻して固定する「歯の再植モデル」を作製して、歯根膜を人為的に効率よく再生させる薬剤の検討を行いました。

研究成果の概要(英文)：Avulsion is the severest type of dental trauma. The prognosis depends on the success of periodontal ligament regeneration after re-plantation. In re-plantation of an avulsed tooth, it has been thought that the viability of periodontal ligament cells on the root surface is a critical factor for PDL regeneration. We examined about mechanism of root development and regeneration of periodontal ligament tissue. For the clinical success of tooth re-plantation, we established 'mouse tooth re-plantation model', and investigate the effect of artificial material for periodontal ligament tissue regeneration.

研究分野：顔面発生

キーワード：歯の外傷 歯根発生 歯根膜再生

1. 研究開始当初の背景

小児の歯の外傷は、統計的に 1-2 歳、7-8 歳で好発することが多く報告されている。また永久歯外傷は、乳歯と比較して完全脱落の受傷様式を示す頻度が高く、予後が悪い場合は、学童期に前歯を失ってしまうことがある。歯の脱落の治療方法は、再植・固定が一般的であるが、感染や骨性癒着により歯根吸収が惹起され保存が難しい。そこで、歯根形成のメカニズムを解明するとともに、マウスを用いた歯の再植モデルを作製し、歯根膜再生に有利となる細胞外マトリックスの解明を試みた。

2. 研究の目的

歯根発生のカギを握るヘルトヴィッヒ上皮鞘の機能に着目し、歯根膜における細胞外マトリックス産生機能のメカニズムを解明するとともに、マウス再植歯モデルを用いて細胞外マトリックスの歯根表面添加効果を検証する。

3. 研究の方法

①歯根発生時の組織学的解析

生後 10 日齢の K14-cre;R26-tdTomato マウス下顎第一臼歯を用い、歯原性上皮細胞と TGF-β および Periostin の発現パターンを免疫染色にて観察した。

②マウスヘルトヴィッヒ上皮鞘由来細胞株を用いた細胞動態解析

HERS01a 細胞を用いた、上皮-間葉転換メカニズムの解析マウス HERS 由来細胞株である HERS01a 細胞を用い、培地に TGF-β1 (10ng/ml) を添加後 48、96 時間培養し、セメント芽細胞マーカー、歯根膜線維芽細胞マーカーの発現変化を RealtimePCR、Western blot 法、細胞免疫染色を用いて解析した。

③マウス再植歯モデルを用いた検討

4 週齢の C57Bl6 マウスを用いた。左側第 1 臼歯を抜歯・再植し、4 週後に歯根膜再生を形態学的に評価するため、Periostin、α smooth muscle actin (αSMA)、Bone sialoprotein (BSP) の免疫染色を行った。

Wnt1-cre の R26R ノックインおよび非ノックインマウスに交換再植を行い、X-gal 染色で再生歯根膜組織の由来を評価した。

fibrillin 標品の PBS 溶液と fibrillin 固相化 propylene glycol alginate (PGA) ゲルに歯を浸漬・塗布して再植し、炎症性歯根吸収と骨性癒着の発生頻度の評価、Azan 染色の観察、画像解析ソフトによる再生歯根膜面積の計測を行った。

培養ヒト歯根膜線維芽細胞に対する fibrillin 標品の細胞遊走効果を検討した。

4. 研究成果

①歯根発生時の組織学的解析

歯根形成中であるマウス生後 10 日齢の下

顎骨切片において、tdTomato 陽性の HERS は、象牙芽細胞は隣接しており、HERS の断裂は TGF-β を強く発現する象牙芽細胞層に沿って観察された。従って、歯根形成時には、象牙芽細胞における TGF-β 発現の上昇が HERS の断裂を促進することが示唆された (図 1)。

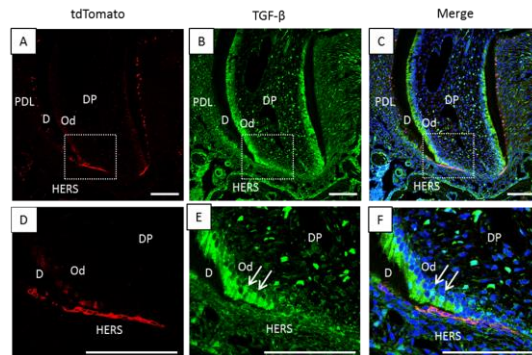


図1. Itaya et al. Biomed. Res. 2017

Periostin は、歯根膜に発現し tdTomato 陽性の断裂した HERS 周囲、歯根象牙質表面に発現がみられたのに対し、根形成端の HERS には認められなかった (図 2)。

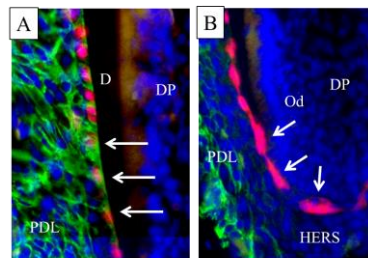


図2. Itaya et al. Biomed. Res. 2017

②マウスヘルトヴィッヒ上皮鞘由来細胞株を用いた細胞動態解析

HERS01a 細胞において TGF-β1 刺激は、E-cadherin の発現を抑制し、N-cadherin の発現を促進することが mRNA および蛋白発現により示されたことから、TGF-β が HERS の断裂を促進し、上皮-間葉転換を惹起することが示唆された。また、セメント芽細胞マーカーは TGF-β1 刺激では変化せず、歯根膜線維芽細胞マーカーの Fibronectin と Periostin は増加したことから、断裂した HERS 細胞はセメント質形成に重要な細胞外基質を発現することが示された。細胞免疫染色において、TGF-β1 刺激により Periostin の発現が誘導された HERS01a 細胞は、Cytokeratin の発現を抑制されることが示された (図 3)。

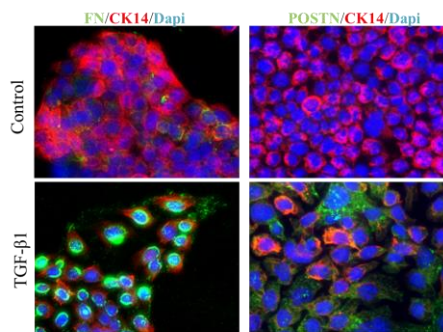


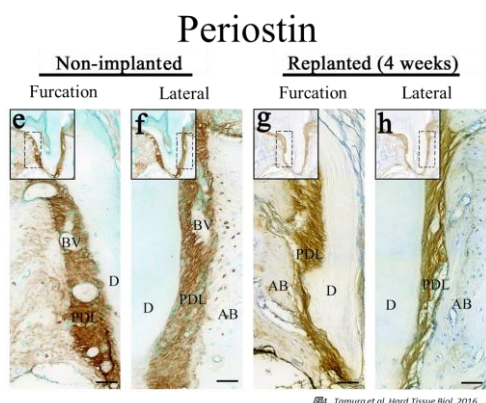
図3. Itaya et al. Biomed. Res. 2017

従って TGF-β1 により上皮-間葉転換した HERS01a 細胞は歯根膜線維芽細胞様細胞と

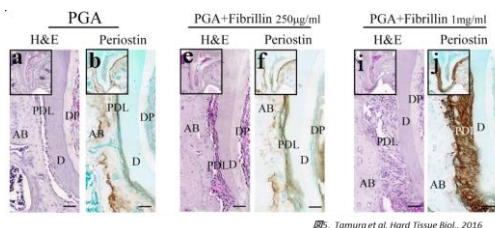
なり Periostin の発現に寄与する可能性が示された。

③マウス再植歯モデルを用いた検討

抜歯後すぐの再植では歯根表層からの外部吸収や骨性癒着は観察されず、periostinは再生歯根膜全体に、BSPは無細胞セメント質に発現していた。 α SMAは、健常歯根膜では血管平滑筋細胞に発現していたが、再生歯根膜では歯根膜全体に強い発現がみられた(図4)。



Wnt1-cre;R26R マウスを用いた交換再植における再生歯根膜には、X-gal 陽性と非陽性の細胞がどちらも観察された。Fibrillin 標品を用いた再植では、fibrillin-PBS 群で歯根表面の BSP の発現が失われ、30%以上に炎症性歯根吸収が生じていた。一方で、PGA 群では外部吸収は 20%に低下したが、40%に骨性癒着が観察された。Fibrillin-PGA 群では、外部吸収と骨性癒着は 6 例中 1 例のみに観察された。Fibrillin-PGA 群の再生歯根膜には、periostin が網目状に観察され、歯根膜面積は PGA 群の 3 倍であった。さらに、Azan 染色では、fibrillin-PGA 群の再生歯根膜に歯根表面から歯槽骨へと連続した密な膠原線維が観察され、健常歯根膜における斜走線維と同様の構造が示された。ヒト歯根膜線維芽細胞を用いた解析においては、fibrillin 標品の添加は細胞遊走能に明らかな効果を示さなかった(図5)。



一連の解析を通し、歯根発生および再生において、重要な働きを持つ細胞外マトリックスとして、Periostin および Fibrillin の重要性が示された。これらを外的に作用させる試みにおいては、現在のところ Fibrillin 蛋白がポジティブな結果を示しており、学術誌への報告を行うことができた。Periostin 蛋白の作用

についても今後解析を進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Higa A, Oka K, Kira TM, Tamura S, Itaya S, Toda M, Ozaki M, Sawa Y. Intracellular Signaling Pathway Activation via TGF- β Differs in the Anterior and Posterior Axis During Palatal Development. *Journal of Hard Tissue Biology* 2016 25(2) 195-204.

DOI: 10.1016/j.pdj.2016.02.001

2. Saitoh I, Inada E, Iwase Y, Noguchi H, Murakami T, Soda M, Kubota N, Hasegawa H, Akasaka E, Matsumoto Y, Oka K, Yamasaki Y, Hayasaki H, Sato M. Choice of Feeders Is Important When First Establishing iPSCs Derived From Primarily Cultured Human Deciduous Tooth Dental Pulp Cells. 2016 26(8) 9-23.

DOI: 10.3727/215517915X689038

3. Tamura S, Oka K, Itaya S, Kira-Tatsuoka M, Toda M, Higa A, Ozaki M. Effects of fibrillin application on periodontal ligament regeneration in mouse model of tooth replantation. *J. Hard Tissue Biol.* 2016 25 295-304.

DOI: 10.2485/jhtb.25.295

4. Itaya S, Oka K, Ogata K, Tamura S, Kira-Tatsuoka M, Fujiwara N, Ohtsu K, Tsuruga T, Ozaki M and Harada H. Hertwig's epithelial root sheath cells contribute to formation of periodontal ligament through epithelial-mesenchymal transition by TGF- β . *Biomedical Research.* 2017 38 61-69.

DOI: 10.2220/biomedres.38.61

[学会発表] (計 2 件)

1. Itaya S, Oka K, Tatuoka M, Fujiwara N, Harada H, Ozaki M. Hertwig's epithelial sheath cells through epithelial mesenchymal transition (EMT) interact with periodontal ligament development. 第 57 回 歯科基礎医学会学術大会 2015 年 09 月 11 日～2015 年 09 月 13 日 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

2. 岡 暁子 板家 智 緒方佳代子 戸田 雅子 藤原尚樹 大津圭史 立岡迪子 尾崎 正雄 原田英光 上皮-間葉転換を起こしたヘルトヴィッヒ上皮鞘は、歯根膜を構成する細胞外基質を産生する 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会 2016 年 08 月 24 日～2016 年 08 月 26 日 札幌市札幌コンベンションセンター

[図書] (計 1 件)

1. Honda MJ, Toriumi T, Oka K, Saito Y,
Isokawa K. Elsevier Dental Stem Cells
for Tooth Tissue Engineering 2016

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 暁子 (OKA KYOKO)
福岡歯科大学・口腔歯学部・成長発達歯
学・准教授
研究者番号：60452778

(2) 研究分担者

敦賀 英知 (TSURUGA EICHI)
弘前大学・保健学研究科・教授
研究者番号：30295901

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()