

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11848

研究課題名(和文) 齧歯類の切歯の発生を研究するための新たな移植方法の開発

研究課題名(英文) Development of new transplantation method for studying the rodent incisor development

研究代表者

坂上 竜資 (SAKAGAMI, Ryuji)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：50215612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：齧歯類の切歯は生涯にわたって伸び続け、その根尖部には上皮系の組織幹細胞の集団 apical budがある。GFP発現マウス(ほぼ全身の細胞が緑色の遺伝子改変マウス)から apical budを含む組織を採取し、野生型マウスが生きたままの状態置き換える実験モデルを作成した。その結果、解剖学的に正常像を示しGFP陽性細胞の一部がセメント芽細胞として存在しているのを観察した。さらに精度を上げて、apical budのみを採取、分散化し、極細の注射針で野生型マウス歯根膜腔に注入したところ、細胞はセメント質中に取り込まれているのが観察された。これらの所見は、歯の発生と再生に関わる重要な発見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の発生と歯根膜の恒常性維持のメカニズムに関しては、未だに最も基本的な部分で未解明な点が多々ある。近年、Hertwig上皮鞘の細胞(HERS細胞)が上皮間葉転換を起こしてセメント芽細胞(歯根表面で骨につながる組織を作る細胞)に分化するという説が提唱されている。しかし、証明手段が無かったために未だ確証が得られていない。われわれの開発した動物実験の手法により、メカニズムの解明が期待される。将来的にはHERS細胞をソースとした、画期的な歯の発生や歯周組織再生療法へと発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Rodent mandibular incisors have a unique epithelial tissue stem cell structure 'apical bud' that allows teeth to grow throughout the lifetime of the rodent. We had succeeded in making an animal experimental model that enables replacing the living wild type mice apical buds with GFP-positive mice ones. The tissue showed anatomically normal structure and some of the GFP-positive cells were observed as cementblast-like cells inside cementum. The experimental protocol has further tuned up as isolating pure apical bud cells from GFP-positive mouse, dispersing cells, and then injecting them to the periodontal ligament space of the wild type mouse. The injected cells survived in the periodontal ligament space and some were observed in cementum. These observations could be important findings that leads to understanding of tooth development and tissue regeneration.

研究分野：歯周病学

キーワード：セメント芽細胞 上皮間葉転換 apical bud Hertwig上皮鞘

1. 研究開始当初の背景

ヒトの歯の発生において、歯周組織を構成する細胞の動態はまだ完全に解明できていない。歯の発生メカニズムの解明は、再生医療の大きなターゲットの一つであり、この分野での研究進展は新たな産業の創出につながる。近年、Hertwig 上皮鞘 (Hertwig's Epithelial Root Sheath、以下 HERS) そのものが上皮間葉転換を起こしてセメント芽細胞にも分化するという説が提唱されている^{1,2,3)}。in vitro の多くの実験系において、この説を支持する多くの状況証拠がある。しかしセメント芽細胞に分化する HERS 細胞は無いが、あっても僅かであるとする研究もあり^{4,5)}、未だに結論が出ていない。この問いの解明のためには、ラベリングされた細胞がどのように分化したかを追跡することが必要である。そこで本研究では、ユニークな方法で in vivo の移植実験を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯胚の上皮系細胞を移植して動態を追跡することによって、歯の発生と分化のメカニズムを解明し、再生療法の発展につなげることである。生涯にわたって伸び続ける齧歯類上下顎切歯は独特な解剖学的構造をしており、唇側にエナメル質構造が形成され、舌側に歯根膜が形成される。切歯の最根尖側は、もともとは Labial cervical loop と呼ばれていたが、Harada らによって新たに apical bud と名付けられた上皮系細胞集団がある。この組織を移植材料として利用することは上皮間葉相互作用と細胞の分化を研究するための理想的なモデルになると考えられた。

apical bud 細胞は、エナメル芽細胞 / Hertwig 上皮鞘 / Malassez 残存上皮 (Epithelial cell rests of Malassez、以下 ERM) に分化するので、移植した細胞の動態を観察することで歯の発生機構を解明し、さらに細胞を用いた歯周組織再生療法につながる知見が得られる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) GFP を導入されたトランスジェニックマウス C57BL/6 (CAG-GFP) から下顎切歯の apical bud を含む根尖組織を摘出後、野生型マウスの根尖組織を移植して、川本法にて 4 μ の非脱灰凍結切片を作製、蛍光・レーザー顕微鏡で検索する。

(2) 研究の後半は、動物実験手法の改良に専念することとした。最大の変更点は、トランスジェニックマウスから得た apical bud を完全な形で単離し、さらに細胞の移植先を、野生型マウスの歯根膜とした点である。

4. 研究成果

(1) マウス下顎切歯 apical bud を含む組織の移植後の追跡

最初の研究においては、レシピエントの細胞をドナー由来 GFP 陽性細胞に置換し、分化した細胞の形質を判別するために podoplanin に対する免疫蛍光染色を行った。

実験には apical bud を含む、根尖から 200 μ m の大きさの移植片を使用した。摘出されたドナーの歯小嚢は実体顕微鏡下で可能な限り除去した。移植手術後 2 週間で移植した緑色蛍光細胞は生着し切端方向に向かって約 3mm 遊走していた (Fig. 1)。切歯の唇側において、レシピエントとドナー由来の構造が切端側と根尖側にそれぞれ見られた。緑色蛍光細胞は下顎切歯の唇側のみ見られ、エナメル芽細胞、象牙芽細胞、歯髓細胞に観察された。podoplanin は apical bud、前エナメル芽細胞、象牙芽細胞、神経鞘に観察された。切歯の根尖端において、移植された緑色蛍光組織はダメージを受けることなく生着し、正常像に近い連続した構造を切縁方向にのばしていた。

移植手術後 12 週では、舌側の緑色蛍光細胞は象牙質の近くのセメント質内に封入されていた (Fig. 2)。それらは、有細胞セメント質のみに位置し、歯根膜付近や歯根膜腔内には認められなかった。これらの緑色蛍光セメント細胞様細胞は HERS 由来の細胞と考えられた。この細胞が、類セメント質を分泌するセメント芽細胞/セメント細胞に分化しているのか、セメント質に埋められた上皮系細胞のままなのかは検証していない。しかしながら、その位置と形態からセメント芽細胞/セメント細胞に分化している可能性が高いと考えている。さらなる理解を得るためにセメント芽細胞/セメント細胞に特異的な分子マーカーを使用する必要がある。

(2) マウス下顎切歯 apical bud 単独の移植後の追跡

岩手医科大学の原田英光教授のご指導により、apical bud 単独での採取が可能となった。この技術を用いて、採取された apical bud を分散化して移植して極細針を用いて細胞を注入した。当初は apical bud に直接注入したが、手技上の限界から変更するに至った。細胞の移植先を白歯部歯根膜腔に変更することにより、細胞をトレースすることが可能となった。まだ研究途中ではあるが、術後 1 週のサンプルで、GFP 陽性細胞が、歯根膜腔と骨髓腔に沿って注入され、セメント質に取り込まれているのが観察された (データ未提示)。

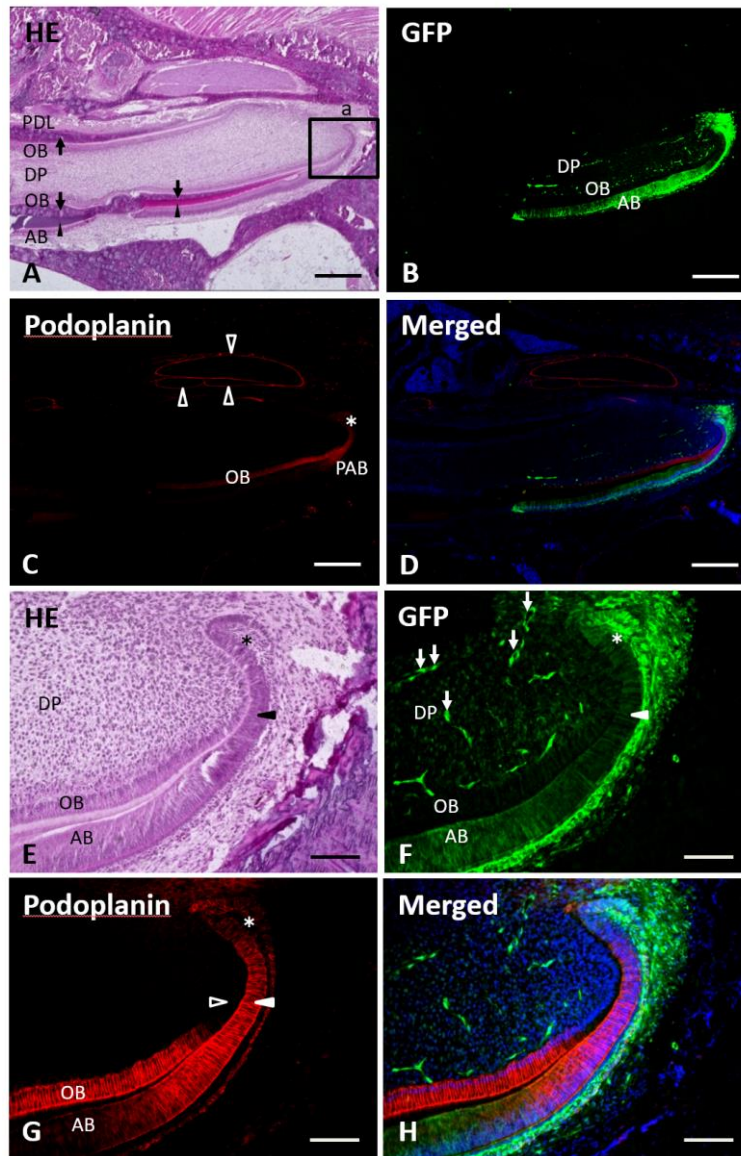


Fig 1. 移植手術後2週における下顎の非脱灰凍結矢状切片。
 各々のパネルにおいて上が舌側、下が唇側、左が切端側、右が根尖側。
 (A) HE染色像。切歯の舌側に象牙芽細胞(OB)、象牙質(黒矢印)、歯根膜(PDL)、唇側に象牙芽細胞(OB)、象牙質(黒矢印)、エナメル質(黒矢頭)、エナメル芽細胞(AB)を示す。
 (B) Aの蛍光組織像。緑色蛍光細胞が下顎切歯の唇側半分に見られている。緑色蛍光はエナメル芽細胞(AB)、象牙芽細胞(OB)、歯髓細胞(DP)で観察される。
 (C) Aの蛍光組織像。podoplanin発現がapical bud(*)、前エナメル芽細胞(PAB)、象牙芽細胞(OB)、神経鞘(白矢頭)で観察される。
 (D) GFPの緑色蛍光、podoplanin、DAPIの青色蛍光の重ね合せ。
 (E) A(a)の中倍率像。apical bud(*)、前エナメル芽細胞(黒矢頭)、歯髓細胞(DP)、象牙芽細胞(OB)、エナメル芽細胞(AB)が観察される。
 (F) Eの蛍光組織像。緑色蛍光がapical bud (*)、前エナメル芽細胞(白矢頭)、エナメル芽細胞(AB)、象牙芽細胞(OB)、歯髓細胞(DP)、歯髓の毛細血管(白矢印)に見られる。
 (G) Eの蛍光組織像。podoplanin抗体での免疫反応。Apical bud(*)、前エナメル芽細胞(白矢頭)、象牙芽細胞(OB)において強く、エナメル芽細胞(AB)と前象牙芽細胞(外枠矢印)において弱く発現している。
 (H) GFPの緑色蛍光、podoplanin、DAPIの青色蛍光の重ね合せ。
 スケールバー: A-D 500 μ m; E-H 100 μ m

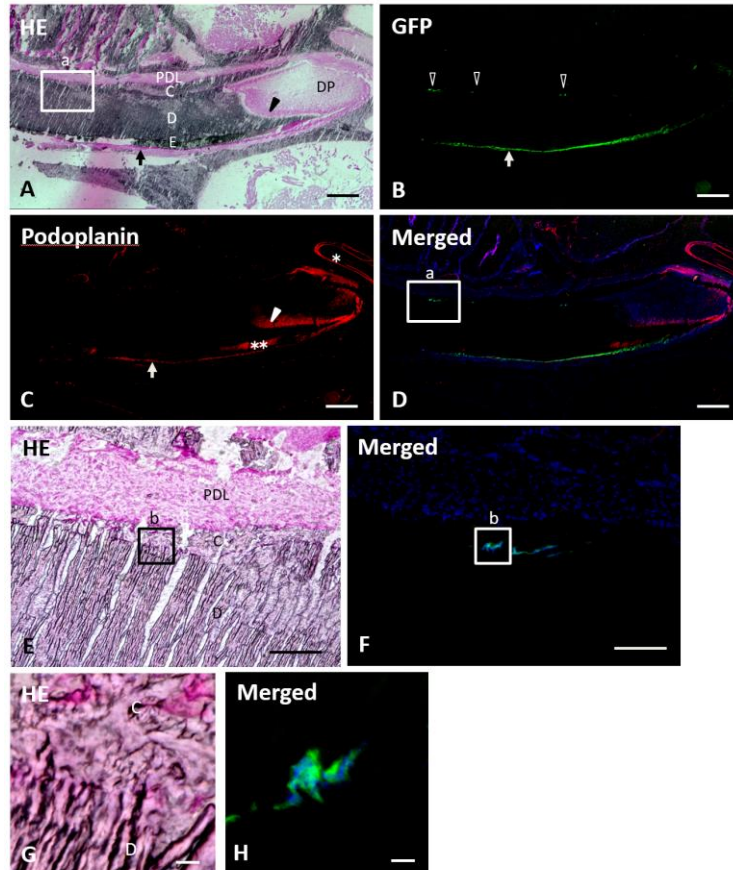


Fig 2. 移植手術後 12 週における下顎の非脱灰凍結矢状切片。
 各々のパネルにおいて上が舌側、下が唇側、左が切端側、右が根尖側。
 (A) HE 染色像。切歯の舌側に歯根膜(PDL)、セメント質(C)、象牙質(D)、象牙芽細胞(黒矢印)、歯髓(DP)、唇側に象牙芽細胞(OB)、象牙質(D)、エナメル質(E)、エナメル芽細胞(黒矢印)を示す。
 (B) A の蛍光組織像。green mouse 由来細胞の遊走を示す。唇側のエナメル芽細胞(白矢印)と舌側のセメント質(外形矢頭)に緑色蛍光を認める。
 (C) A の蛍光組織像。podoplanin 発現が神経鞘(*)、象牙芽細胞(白矢頭)、エナメル芽細胞(白矢印)に観察される。エナメル質基質(**)に交差反応が見られる。
 (D) 緑色蛍光、podoplanin、DAPI の青色蛍光の重ね合せ。
 (E) A(a)の中倍率像。歯根膜(PDL)、セメント質(C)、象牙質(D)。
 (F) E の蛍光組織像。緑色蛍光細胞はセメント質中に認めるが、歯根膜中には認めない。
 (G) E(b)の高倍率像。セメント質(C)、象牙質(D)。
 (H) G の蛍光組織像。GFP の緑色蛍光、DAPI の青色蛍光の重ね合せ。セメント質中にセメント細胞様細胞を認める。セメント質(C)、象牙質(D)。
 スケールバー: A-D 500 μ m; E-F 100 μ m; G-H 100 μ m.

(3) まとめ

歯と歯周組織の発生メカニズムの解明は、歯周組織の再生療法においても重要な知見をもたらす。歯周組織の再生においては、セメント質再生をともなう歯周組織の再生が目指すべきゴールとなっている。なぜならばセメント質は石灰化した歯周組織であり、歯根膜の主繊維の一端が Sharpy 線維として入り込み、もう一端は歯槽骨に入り込んで歯を保持するのに役立っているからである。セメント質の形成と恒常性の維持には、HERS と ERM の細胞が深く関わっているが、詳細については未だ不明である。本研究のテーマである HERS 細胞が EMT を生じてセメント芽細胞になるかどうかについても、さらなる検証が必要である。

HERS 細胞は canonical Wnt リガンドを発現している可能性もあり、この方面での研

究が進んでいる⁶⁾。本研究では HERS と ERM の細胞がセメント芽細胞に分化する可能性を示したが、歯周組織再生療法においてはそれ自身が分化することよりも、周囲の間葉系細胞を分化させる機能も重視することが必要と考える。

HERS 細胞には、上皮系の幹細胞に関係する遺伝子や、Oct-4、Nanog、SSEA-4 などの胚性幹細胞マーカーを認めるとの報告もあり⁷⁾、将来的には HERS や ERM などの細胞をソースとした歯周組織再生療法へと発展する可能性がある。

参考文献

- 1) Sonoyama W, Seo BM, Yamaza T, Shi S: human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J Dent Res*, 86, 594-599, 2007.
- 2) Huang X, Bringas Jr P, Slavkin H C, Chai Y: Fate of HERS during tooth root development. *Dev Biol*, 334(1), 22-30, 2009.
- 3) Akimoto T, Fujiwara N, Kagiya T, Otsu K, Ishizeki K, Harada H: Establishment of Hertwig's epithelial root sheath cell line from cells involved in epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 404(1), 308-312, 2001.
- 4) Luan X, Ito Y, Diekwisch TG: Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev Dyn*, 235(5), 1167-1180, 2006.
- 5) Lester K S: The incorporation of epithelial cells by cementum. *J ultrast res*, 27(1), 63-87, 1969.
- 6) 根本英二：歯周組織における Wnt シグナルの役割. *日歯周誌*, 58:16-24, 2016.
- 7) Nam H, Kim J, Park J, Park JC, Kim JW, Seo BM, Lee JC: Expression profile of the stem cell markers in human Hertwig's epithelial root sheath/Epithelial rests of Malassez cells. *Mol Cells*, 31(4), 355-360, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 丸尾直樹、坂上竜資	4. 巻 58
2. 論文標題 Hertwig 上皮鞘の細胞はセメント芽細胞に分化するか.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本歯周病学会会誌	6. 最初と最後の頁 58-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maruo N, Sakagami R, Yoshinaga Y, Okamura K, Sawa Y	4. 巻 11(3)
2. 論文標題 Development of an apical bud differentiation model using transgenic mice expressing green fluorescent protein as donor	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0150766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0150766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohgi K, Kajiya H, Goto-T K, Okamoto F, Yoshinaga Y, Okabe K, Sakagami R	4. 巻 171
2. 論文標題 Toll-like receptor 2 activation primes and upregulates osteoclastogenesis via Lox-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipids Health Dis.	6. 最初と最後の頁 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12944-018-0787-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arita S, Hatta M, Uchida K, Kta T, Okamura K, Ryu T, Murakami H, Sakagami R, Yamazaki J	4. 巻 53(5)
2. 論文標題 Peptidylarginine deiminase is involved in maintaining the cornified oral mucosa of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Periodont Res	6. 最初と最後の頁 750-761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sakagami R, Maruo N, Yoshinaga Y, Okamura K, Sawa Y
2. 発表標題 Apical bud transplantation model of rodent teeth for studying epithelial-mesenchymal transition.
3. 学会等名 102nd American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	丸尾 直樹 (MARUO Naoki) (40780127)	福岡歯科大学・口腔歯学部・研究補助員 (37114)	動物実験・病理組織作成の補助（かつて教室所属の大学院生、助教、現在は外部勤務の歯科医師）