

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390506
 研究課題名（和文） 歯根膜再生の鍵を握る細胞とその因子は何か？
 研究課題名（英文） What are the factor and the cells to be involved in the periodontal regeneration?
 研究代表者
 赤峰 昭文（AKAMINE AKIFUMI）
 九州大学・大学院歯学研究院・教授
 研究者番号：00117053

研究成果の概要：

ヒト歯根膜組織再生医療を開発することを目的として、歯根膜組織の再生機構について明らかにするために、クローン化したヒト歯根膜幹細胞株の樹立を試みた。その結果、間葉系幹細胞が有する表面抗原を発現し、なおかつ歯根膜に特徴的な因子を発現する 2 種の細胞株、1-11 細胞株ならびに 1-17 細胞株の樹立に成功した。各々分化段階が異なっており、1-11 細胞株は *in vivo* において歯根膜様組織形成能を有しており、1-17 細胞株は神経細胞に対してその分化を指示するような働きを有していた。また歯根膜は機械的刺激によって *angiotensin* を発現し歯根膜の恒常性の維持に関与することが示唆された。さらに再生の足場としてカルシウムの存在が重要であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎や歯周病によって喪失した歯周組織の再生は困難であることから、失われた歯根膜および歯槽骨の再生を積極的に促す方法の確立が待望されている。歯周組織の再生実現に向けては歯根膜の特徴及び機能の解明が大きな命題である。これまでに歯根膜再生を目的とした様々な研究が報告されているが、1) 歯根膜は様々な細胞により構成されているが、その中でどの細胞が歯根膜再生の鍵を握っているのか？

2) 歯根膜再生に必須の因子は何か？、とい

ったことに関しては、未だに解明されていないのが実状である。

2. 研究の目的

申請者らが樹立したヒト不死化歯根膜細胞株よりクローン細胞群を分離し、それを SCID マウスに移植し *in vivo* において歯根膜様組織形成能を有するクローン細胞を選び出す。このクローン細胞のキャラクタリゼーションを行い、歯根膜形成において重要な細

胞の特徴を明らかにする。そしてこのクローン細胞に特異的に発現する遺伝子を検出し、これらの遺伝子の機能解析を行い歯根膜様組織形成に必須の遺伝子を同定する。以上より、歯根膜再生に必須の細胞と因子を明らかにして歯根膜再生機構について解明し、新しい歯根膜再生療法の開発へと繋げていくことを本研究の目的とする

3. 研究の方法

(1) 歯根膜様組織形成能を有するクローン細胞の樹立

・ in vivo アッセイ

ヒト不死化歯根膜細胞株よりクローン細胞群を分離し、これらの細胞を SCID マウスの背部皮下にヒドロキシアパタイトとともに移植し in vivo にてクローン細胞の歯根膜様組織形成能について組織学的に検討する。腱様構造物の検出にはアザン染色法、各種遺伝子の発現については in situ hybridization 法を用いて検討を行う。

移植後の組織内にはヒト歯根膜細胞クローン由来の細胞とマウス由来の細胞が混在しており、形成された構造物の由来種の同定が重要であるため、ヒト由来の細胞に反応する抗ビメンチン抗体を用いて免疫組織学的に検討する。

(2) 選択クローン細胞のキャラクタリゼーション

・ 表面抗原の比較

CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, CD166 (骨髄の間質系幹細胞の表面抗原として知られている) の選択クローン細胞による発現について検討するために蛍光抗体法を用いて検討する。

・ 歯根膜に特徴的な因子の発現解析

硬組織関連因子〔アルカリ性フォスファターゼ (ALP)、osteocalcin、collagen、runt-related transcription factor-2 (Runx2) 等〕及び腱組織関連因子 (scleraxis) 等の発現について RT-PCR 法を用いて検討する。

4. 研究成果

現在、組織の再生には3つの要素、細胞 (幹細胞)、形態形成因子、そして足場が必要とされている。これらの要素に基づいて成果を報告する。

(1) 再生に必要な細胞成分と形態形成因子について

矯正治療を目的として来院した患者 (20 歳女性) より抜歯した小白歯歯根の中央3分の1より採取した歯根膜組織を in vitro にて培養し、遊走してきた細胞をプライマリーのヒト歯根膜細胞 (HPLF) とした。つぎに HPLF に SV40 large T 抗原をコードする遺伝子 (SV40T-Ag) とヒトテロメラーゼ逆転写酵素をコードする遺伝子 (hTERT) とを導入し不死化した細胞 (STPLF) を作製した。さらに STPLF をクローニングし、in vitro にて骨芽細胞および脂肪細胞様細胞への分化能を示す未熟な細胞株 (1-11) を樹立した。1-11 細胞株は STR0-1 及び CD146 を表面抗原として発現した。また未分化な細胞の表面抗原として報告されている CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, CD166 を有意に発現していたが、CD18, CD34 の発現はほとんど検出されなかった。さらに、Runx2, collagen I, ALP, osteopontin, osteocalcin, RANKL, OPG, scleraxis, periostin, collagen XII を発現していた。つぎに β -TCP と共に免疫不全 (SCID) マウスの背部皮下に移植した結果、4 週間後に β -TCP 周囲にセメント質様の硬組織を形成した。さらに移植期間を延長し 8 週間後には、 β -TCP 周囲に、既に観察された硬組織に加えて、その中に陥入した Sharpey 線維様の線維束を持った歯根膜様の構造体を形成した。この時 1-11 細胞株は、periostin ならびに osteocalcin を分泌し、おのおのが線維束ならびに硬組織に局在していた。さらに collagen XII ならびに α -SMA の発現も観察された。以上のことから、1-11 細胞株は歯根膜内に存在する未熟な細胞に由来しており、SCID マウス内にて歯根膜様組織の形成能を持つ細胞株であり、歯根膜組織再生機構を解明していく上で、有用な細胞株であることが示唆された。

つぎに 1-11 細胞株よりもさらに分化の程度が低いクローン細胞株 1-17 細胞株の樹立に成功した。この細胞株は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞そして神経細胞への分化能を有しており、Oct3/4 ならびに Nanog といった ES 細胞に特徴的な因子を発現する一方で、periostin および scleraxis といった歯根膜細胞に特徴的な因子も発現していたことから、私達はこの細胞株を歯根膜幹細胞株と判断した。さらにこの細胞株の石灰化様式について検討したところ、骨芽細胞誘導培地では分化が促進されたが、歯周組織再生因子の候補としてあげられている basic fibroblast growth factor (bFGF) の添加によって、その分化が抑されることが明らかとなった。しかしながら、1-17 細胞を骨芽細胞様細胞へ分化を進めたあとに bFGF で処理することによって、骨芽細胞様細胞への分化が促進することが確認された。また歯根膜組織は多様な細胞から構成されるヘテロな細胞集団である

ことから、1-17 細胞株をヒト骨芽細胞株 (SaOS) とともに共培養を行ったところ、培養当初から分化が誘導されることが判明した。この結果について、詳細に解析した結果、SaOS 由来の bone morphogenetic protein 4 (BMP4) によって分化が誘導された可能性が高いことが示唆された。つぎに 1-17 細胞株が発現する表面抗原の解析を FACS にて行った結果、1-11 細胞株と同様に CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, CD166 を有意に発現していたが、CD18, CD34 の発現はほとんど認められなかった。さらに 1-17 細胞株は、神経細胞に関連した分子を多く発現することがわかった。歯根膜組織には咬合力を瞬時に調節するためのセンサーとしての神経が分布しており、歯根膜の再生には、この神経の再生を考慮する必要性が高いと考えられることから、この 1-17 細胞株が神経細胞の分化に及ぼす影響について検討するために、神経細胞への分化能を持つラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞を用いて実験を行った。1-17 細胞との共培養により、PC12 細胞の神経細胞への分化が促進された。さらに PC12 細胞を、固定し失活させた 1-17 細胞株と共培養した場合、分化は促進されたが、生活している細胞との共培養の場合ほどではなかった。しかしながら、1-17 細胞株の培養上清を添加した場合には、PC12 細胞の分化が強く誘導された。また分離共培養を行った場合、PC12 細胞の遊走能を促進することが明らかとなった。以上のことから、1-17 細胞株は神経細胞分化を誘導し、また神経細胞前駆細胞の走化性を促進する液性の因子を分泌していることが示唆された。

以上のことから、私達が樹立した分化段階の異なる 1-11 細胞株と 1-17 細胞株とが発現する遺伝子の相違について検討することによって、歯根膜細胞前駆細胞に特徴的な表面抗原について明らかにすることを企図して cDNA マイクロアレイ法を用いて検討した結果、1-11 細胞株において CD37 ならびに CD83 の発現が促進しており、一方 CD99 ならびに CD9 の発現は抑制されていることが判明した。したがって、歯根膜細胞前駆細胞にはこのような表面抗原の発現様式を有した細胞が候補としてあげられることが示唆された。また形態形成因子として BMP の関与が必要であることが示唆された。

また、歯根膜は通常、口腔内において咬合力という付加がかかった条件下でその恒常性が維持されていることから、初代ヒト歯根膜細胞 (HPLF) に適当な伸展力を負荷し、HPLF において発現する遺伝子について検討した結果、Angiotensin II (ANG II)、TGF-beta そして ALP の遺伝子発現が促進することが確認された。つぎに ANG II を負荷をかけていない HPLF に投与したところ、負荷がかから

れた時と同様に TGF-beta および ALP の発現が促進した。さらにこれら一連の反応は ANG II のレセプターである AT2 のブロッカーによって阻害されることが明らかになった。以上の結果から、歯根膜の恒常性の維持には ANG II が関与している可能性が示唆された。

(2) 足場について

歯根膜細胞の足場には、歯根膜細胞によってその表面に硬組織が形成され、さらにその上に Sharpey 線維が構成される、という条件が必要がある。そこで、私達は mineral trioxide aggregate (MTA) という歯内治療用薬材に着目した。この MTA は HPLF と共培養した際に、その周囲に局して石灰化物を形成させる働きを有していることが判明した。この MTA はカルシウムを徐放しており、その速度は経時的に低くなることが確認された。そこで、HPLF にカルシウムを添加した結果、石灰化が促進することが確認された。この現象について詳細に検討したところ、MTA ならびにカルシウムによって、BMP2 の発現が亢進することが確認された。HPLF は BMP2 レセプターの type IA ならびに type II を発現していたことから、HPLF はカルシウム刺激によって BMP2 を発現し、さらにこれは autocrine または paracrine に作用し石灰化が促進したと考えられた。また osteopontin および osteocalcin の発現も MTA ならびにカルシウムによって促進することが明らかになった。そして MTA と共培養した HPLF では BMP シグナルに関与する Smad1 の抑制因子である Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) の発現が抑制されていることが明らかとなった。一方、BMP シグナルの antagonist である noggin の発現についてカルシウムを添加して培養した HPLF を用いて検討した結果、培養初期においてその発現は無刺激の細胞と変化はない一方で、BMP2 の発現は当初から促進していた。以上より、歯根膜の再生には足場要素としてカルシウムの存在が重要であることが示唆された。

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19件)

Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y, Akamine A. Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T-antigen and hTERT gene transfer. 査読有り Cell Tissue Res 324 巻 117-125, 2006

Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Wada N, Shima K, Akamine A. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. 査読有り Differentiation 76 巻 337-347 2008

Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. 査読有り J Cell Physiol 215 巻 743-749 2008

〔学会発表〕(計 39 件)

Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Akamine A: Characterization of clonal human periodontal ligament cell lines. 84nd General Session & Exhibition of the IADR/AADR/CADR. 6.28-7.1, 2006. Brisbane, Australia

友清淳、前田英史、藤井慎介、和田尚久、鳥一也、赤峰昭文：多分化能を持つヒト歯根膜クローン細胞株の樹立とキャラクターゼーション。第 125 回日本歯科保存学会。2006.11.9-11.10. 鹿児島

H. MAEDA, A. TOMOKIYO, S. FUJII, N. WADA, S. MONNOUCHI, T. NAKANO, and A. AKAMINE: MTA induces mineralization of human periodontal ligament cells. 86th General Session & Exhibition of the IADR/AADR/CADR. 2008. 7.2-5 Toronto, Canada

〔図書〕(計 2 件)

赤峰昭文 共著 医歯薬出版 「歯内治療学 第3版」 2008年

赤峰昭文 共訳 クインテッセンス出版 「バイオロジーに基づいた実践歯内療法学」 2008年

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤峰 昭文 (AKAMINE AKIFUMI)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：00117053

(2)研究分担者

前田 英史 (MAEDA HUIDEFUMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：10284514

藤井 慎介 (FUJII SHINSUKE)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：60452786

(3)連携研究者
該当者なし

()

研究者番号：