

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09502

研究課題名(和文) 歯根膜におけるメカノ・ケミカル機構の解明 直交する二つの細胞外線維の考証

研究課題名(英文) Evaluation of mechano-chemical mechanism in periodontal ligaments

研究代表者

敦賀 英知 (Tsuruga, Eichi)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：30295901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜のオキシタラン線維の走行は歯軸に平行に存在し、コラーゲン線維はオキシタラン線維とほぼ直交するように観察される。歯根膜細胞の培養系を用いて、オキシタラン線維とコラーゲン線維の位置関係を解析した。線維を捕捉するインテグリン ν 3 と ν 5 と ν 1 はオキシタラン線維とコラーゲン線維ともに共存する傾向が認められた。また、細胞と線維の關係に着目してメカノ-シグナル系因子およびケミカル-シグナル系の解析を通して歯根膜特有の分子指標を肺胞線維芽細胞を比較対照群として解析した。その結果、PAKについて、歯根膜特有の特徴を示した。本研究結果は分子間解析を通して組織再生の標的分子として臨床応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜におけるオキシタラン線維は、主線維であるコラーゲン線維とともに咬合力の干渉の役割を有すると考えられる。一方、肺胞においてもオキシタラン線維とコラーゲン線維は存在し、前者は呼吸運動に、後者は形態維持に関与する。両組織の線維系を比較することにより、歯根膜オキシタラン線維に特徴的な分子をターゲットとして再生治療に直接的な応用が期待される。また、呼吸器系領域においても肺胞線維芽細胞が効率的に両線維を新生することに応用でき、機能的肺胞維持の研究に貢献できるものとする。

研究成果の概要(英文)：The periodontal ligaments contain oxytalan fibers. The appearance of the periodontal ligaments is parallel to the tooth axis. The appearance of collagen fibers, which are representative of extracellular fibers, in the periodontal ligaments with oxytalan fibers and is observed to be almost orthogonal. Then, using cell culture system, the relationship between oxytalan fibers and collagen fibers was analyzed. Integrin ν 3 and ν 5 ν 1 tend to coexist with oxytalan and collagen fibers in periodontal fibroblasts. Additionally, focusing on the relationship between cells and fibers, we used alveolar fibroblast as a comparative control group for molecular indicator peculiar to periodontal fibroblasts through analysis of mechano-signal and chemical-signal system factors. As a result, PAK among them showed characteristic peculiar to periodontal ligament. These results can be expected to be clinical applications as a target molecule for tissue regeneration through intracellular analysis.

研究分野：解剖学

キーワード：歯根膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の細胞外線維には、コラーゲン線維、弾性系線維、細網線維がある。歯周組織の中の歯根膜組織には、主線維であるコラーゲン線維とともに弾性系線維が存在する。弾性系線維は、直径12nmの微細線維とエラスチンから構成され、その構成比率から微細線維のみから成るオキシタラン線維、微細線維に少量のエラスチンが沈着したエラウニン線維、微細線維に多量のエラスチンが沈着した弾性線維の3種の線維が存在する。歯根膜組織には微細線維のみから構成されるオキシタラン線維が存在し、その走行は主線維であるコラーゲン線維と交叉しており、一定の角度を有しているように観察される。

一方、呼吸に関係する肺の肺胞には、コラーゲン線維と弾性系線維が存在しており、それぞれの線維はランダムに走行している。また、肺胞にはオキシタラン線維、エラウニン線維、弾性線維の3種の弾性系線維がすべて存在する。歯根膜組織と肺胞における細胞外線維は、ともに機能圧の干渉という役目を担っているが、機能的なコラーゲン線維と弾性系線維の相対的な走行に着目した報告はない。歯根膜と肺胞の弾性系線維はともにその弾性力を用いて組織特有の機能を発揮していると考えられる。そこで、オキシタラン線維とコラーゲン線維の走行の規則性を規定する候補分子に焦点を当て、細胞膜上で細胞外線維を補足するインテグリンおよびメカノケミカル機構の構成分子の解析を試みた。すなわち、歯根膜と肺胞において細胞外線維を形成する線維芽細胞を用いた細胞培養系で、歯根膜と肺胞のオキシタラン線維の細胞外とメカノケミカル機構の細胞内の関連分子を比較解析することにより、歯根膜組織の固有の特徴を明らかにし、その特異性を解明できると考えた。

2. 研究の目的

歯根膜組織と肺胞の機能に重要な役割を果たす細胞外線維であるコラーゲン線維と弾性系線維に着目した。生体のコラーゲン線維と弾性系線維を再現する細胞培養系を用いることで、これらの線維の方向性を規定する分子群の解析比較が可能である。着目した分子は、歯根膜線維芽細胞と肺胞線維芽細胞の細胞膜上のインテグリンの構成要素を最初に同定した。また、細胞膜インテグリンと細胞内 f-actin 間のメカノ-シグナル分子とケミカル-シグナル分子が、選択的に機械的刺激に相互反応し、線維の配向に影響を及ぼすと考えた。歯根膜線維芽細胞と肺胞線維芽細胞におけるメカノ-シグナル系因子 (①talins ②vinculin ③actinin) およびケミカル-シグナル系 (①FAK ②LIMK1 ③PAK) の比較解析を通して、機能的な歯根膜オキシタラン線維の形成に必要な構成分子を明らかにし、歯根膜の再生に必要なデータを提供することを目指す。

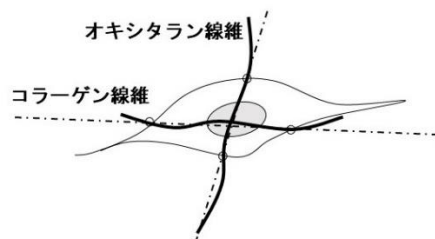
3. 研究の方法

(1) 細胞培養系

使用細胞は、ヒト歯根膜線維芽細胞 (Lonza 社) とヒト肺胞線維芽細胞 (Science Cell Research Laboratories) を用いて、10% 仔牛血清含有 DMEM 培地、37°C、5%CO₂ の条件下で4週間培養を行った (Tsuruga E et al., Connect Tissue Res 53:521-527)。培地は3日に一度交換し、細胞の状態を位相差顕微鏡で確認した。ヒト歯根膜線維芽細胞とヒト肺胞線維芽細胞ともに3継代から5継代の細胞を用いた。

(2) コラーゲン線維とオキシタラン線維のアングル解析

オキシタラン線維の同定には微細線維の主要構成分子である Fibrillin-1 抗体を用いた。免疫組織化学染色は、4%パラホルムアルデヒドにて15分室温にて固定後、ブロッキングを1時間、一次抗体はブロッキングバッファーにて希釈して (Fibrillin-1: 1:1000, Thermo Fisher Science 社は2000倍、Type I collagen: Rockland Immuno. 社は500倍) 2時間室温にて反応させた。洗浄後、二次抗体を同様に1000倍希釈して1時間室温にて反応させ洗浄、封入後、蛍光顕微鏡 IX71N-22PH (オリンパス) にて観察した。



(図の説明) オキシタラン線維: オキシタラン線維と細胞膜の交点を結んだ線; コラーゲン線維:

コラーゲン線維と細胞膜の交点を結んだ線；オキシタラン線維とコラーゲン線維のなす角は鋭角を用いた。

任意のヒト歯根膜線維芽細胞およびの肺胞線維芽細胞のオキシタラン線維は当該細胞膜とオキシタラン線維の2接点間を結んだ直線を線維上のオキシタラン線維とみなした（上図参照）。同様にコラーゲン線維においても当該細胞膜とコラーゲン線維の2接点間を結んだ直線を線維上のオキシタラン線維とみなした。オキシタラン線維とコラーゲン線維のなす角度は鋭角を用いた。

(3) インテグリンの比較解析

ヒト歯根膜線維芽細胞とヒト肺胞線維芽細胞を4週まで培養して、インテグリン構成分子 αv 、 $\beta 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ （いずれも抗ヒト抗体、Abcam 社）について免疫組織化学染色を用いて解析した。培養細胞層を4%パラホルムアルデヒドにて15分室温にて固定後、ブロッッキングを1時間、一次抗体はブロッッキングバッファーにて希釈して（ αv 、 $\beta 3$ は500倍、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ は100倍）2時間室温にて反応させた。洗浄後、二次抗体を同様に1000倍希釈して1時間室温にて反応させ洗浄、封入後、蛍光顕微鏡 IX71N-22PH（オリンパス）にて観察した。

(4) メカノ-シグナル分子とケミカル-シグナル分子の比較解析

ヒト歯根膜線維芽細胞とヒト肺胞線維芽細胞を4週まで培養して細胞培養層を回収、メカノ-シグナル系因子（①talin ②vinculin ③actinin）（抗体はいずれも Abcam 社）およびケミカル-シグナル系（①FAK ②LIMK1 ③PAK）（抗体はいずれも Abcam 社）についてウェスタンブロット法を用いて半定量解析した。黒化度の解析は Image J program を用いた。

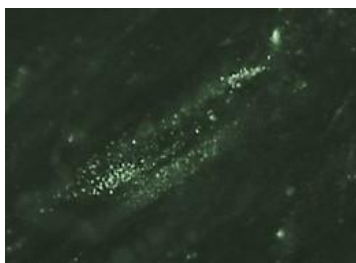
4. 研究成果

(1) コラーゲン線維とオキシタラン線維のアンクル解析

歯根膜線維芽細胞において、コラーゲン線維とオキシタラン線維の角度は、 73 ± 15 度（ $n = 20$ ）であり、直交にはほぼ近い数値に収束した。一方、肺胞線維芽細胞におけるコラーゲン線維とオキシタラン線維の角度については収束した値が確認されなかった。

(2) インテグリンの比較解析

インテグリン αv と $\beta 3$ および $\alpha 5$ と $\beta 1$ は歯根膜線維芽細胞においてはオキシタラン線維とコラーゲン線維ともに共存する傾向が認められた。肺胞線維芽細胞では αv と $\beta 3$ とオキシタラン線維には強い共存傾向が認められ、 $\alpha 5$ と $\beta 1$ とコラーゲン線維との共存傾向が認められた。



（図の説明）歯根膜線維芽細胞において αv 抗体を用いて免疫染色像。細胞表面にドット状に陽性反応が認められる。

	歯根膜線維芽細胞		肺胞線維芽細胞	
	$\alpha v / \beta 3$	$\alpha 5 / \beta 1$	$\alpha v / \beta 3$	$\alpha 5 / \beta 1$
オキシタラン線維	++	++	++	-
コラーゲン線維	++	+	-	++

（免疫染色の相対的な蛍光強度を示した）

(3) メカノ-シグナル分子とケミカル-シグナル分子の比較解析

歯根膜線維芽細胞と肺胞線維芽細胞の培養細胞・細胞外基質層を回収し、メカノ-シグナル系の細胞内因子（①talin ②vinculin ③actinin）の解析を行った結果、三分子においては歯根膜線維芽細胞と肺胞線維芽細胞間の差異は観察されなかった。一方、ケミカル-シグナル系（①FAK ②LIMK1 ③PAK）のリン酸化の解析を行った。歯根膜線維芽細胞では主に PAK のリン酸化が顕著

であった。一方、肺胞線維芽細胞では FAK の発現が顕著であり、PAK では有意な差は確認されなかった。

メカノ-シグナル系

歯根膜線維芽細胞			肺胞線維芽細胞		
talin	vinculin	actinin	talin	vinculin	actinin
++	+	+	+	+	+

ケミカル-シグナル系

歯根膜線維芽細胞			肺胞線維芽細胞		
FAK	LIMK1	PAK	FAK	LIMK1	PAK
±	±	++	++	±	±

(歯根膜線維芽細胞の vinculin の黒化度を基準に相対評価した。0-10% : + ; 11-20% : ++)

以上の結果から、歯根膜線維芽細胞においてはオキシタラン線維とコラーゲン線維間に一定の位置的關係が存在しており、それぞれの線維を補足するインテグリンにも特徴的な結果が示された。さらに、メカノケミカル分子の解析を通して歯根膜線維芽細胞と肺胞線維芽細胞の違いが浮き彫りになった。本研究結果と細胞と線維の關係が直接的または間接的に関与するか否かは更なる解析が必要になる。今後、少なくともメカノケミカル分子間の關係を解析することにより、歯根膜で強調される分子群が組織再生のターゲット分子として臨床的に応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	岡 暁子 (Oka Kyoko) (60452778)	福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授 (37114)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関