

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592206

研究課題名(和文) in vivo 実験系を用いた歯周組織再生を促進する因子の同定

研究課題名(英文) Identification of the factor inducing the regeneration of periodontal tissue by in vitro study

研究代表者

後藤 康治 (GOTO YASUHARU)

九州大学・大学院歯学研究院・准助教

研究者番号：00170473

研究成果の概要：

私達は、ヒト歯根膜組織に由来し、骨芽細胞ならびに脂肪細胞への分化能を有したクローン化した細胞株 1-11 細胞株の樹立に成功した。この細胞株を用いて免疫不全(SCID)マウスの背部皮下に TCP と共に移植した結果、TCP 周囲に歯根膜組織に特徴的な Sharpey 線維様の構造物を有した歯根膜様組織を構築することが明らかになった。しかしながら、この形成効率は、歯根膜組織再生因子の候補としてあげられるようになった塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)または enamel matrix derivative (EMD)によって高めることはできなかったことから、他の因子の関与が求められることが示唆された。また歯根膜細胞を機械的刺激下においた場合、angiotensin II, TGF-beta, alkaline phosphatase の発現が促進したことから、咬合力が負荷される歯根膜において、その恒常性の維持に angiotensin II の関与が重要であることが示唆された。さらにカルシウムには歯根膜細胞の石灰化を促進する働きがあることが明らかになったことから、歯根膜の再生の足場要素にはカルシウムの存在が重要であることが示唆された。これらの要素を複合することによって、歯根膜組織再生を促進することが可能になると

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

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。これまでに歯周組織再生を促す様々な誘導因子が報告されているが、より確度の高い歯周組織再生実現に向けて

は歯根膜再生を促進する因子あるいは歯根膜形成に必須の因子の同定が大きな命題である。これまでに歯根膜細胞に特異的に発現している遺伝子検出の報告は多数なされているものの、その詳細な機能に関しては解析が進んでいないのが現状である。その理由として、目的遺伝子の歯根膜組織形成能を検討するための *in vivo* 機能解析実験系が確立されていないことがあげられる。

## 2. 研究の目的

申請者らは、ヒト不死化歯根膜細胞株を樹立し、これより2種の幹細胞クローンを分離した。これらの歯根膜幹細胞クローンを用いた新たな SCID マウス移植実験系を確立し、この実験系を用いて歯根膜再生に重要な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している。

## 3. 研究の方法

歯根膜組織形成能を検討するための *in vivo* 機能解析実験系の確立

申請者らが樹立したヒト不死化歯根膜幹細胞クローンを足場となるハイドロキシアパタイトとともに SCID マウスの背部皮下に移植するとセメント質様構造物を含む歯根膜様組織を形成することを既に報告している(藤井ら・第84回国際歯科学会:2006年6月発表)。この実験系に改良を加え、より移植期間が短くセメント質様構造物形成量の多い SCID マウス移植実験系を確立するため、歯周組織再生能を有することが報告されている bFGF または EMD などの因子をコーティングしたハイドロキシアパタイトを用いて移植を行い歯根膜様組織形成までに要する期間や形成量を従来の SCID マウス移植実験系と組織学的に比較検討する。

移植部位の組織学的解析には、腱様構造物の検出にはアザン染色法、periostin など歯根膜組織に特異的に発現する各種遺伝子の発現については免疫染色法を、そして形成された構造物の由来種の同定には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。

歯根膜様組織形成に重要な因子の同定

歯根膜が通常負荷されている咬合力を模した機械的刺激を歯根膜細胞に付与し、その結果、検出される因子を同定しさらにその機能について解析し、歯根膜組織再生に重要な

因子について明らかにする。

歯根膜再生に関わる足場についての検討

これまでに歯根膜細胞の石灰化には足場としてカルシウムが関与することを報告しており、そのメカニズムについて解析することにより、歯根膜組織再生のための歯根膜細胞の足場の条件について解明する。

## 4. 研究成果

私達が樹立したクローン化したヒト歯根膜幹細胞株 1-11 細胞株は、骨芽細胞または脂肪細胞への分化能を有しており、この細胞株を TCP と共に SCID マウス背部皮下に移植することによって、2ヶ月後に TCP の周囲にオステオカルシンを含んだ硬組織を形成し、その表層にはコラーゲン線維が陥入した Sharpey 線維様の構造体を構築し、さらにこの線維は歯根膜組織に認められるペリオスチンを発現していたことから、1-11 細胞株は歯根膜様組織形成能を有した未分化な細胞株であることが示唆された。そこで、この細胞株を用いて、より効率よく歯根膜組織再生に働く因子について明らかにすることを目的として、近年歯根膜の再生能を持つと考えられている bFGF ならびに EMD に浸漬した TCP を 1-11 細胞株とともに SCID マウス背部皮下に移植したが、いずれも上記にあげたような歯根膜様組織の形成がさらに促進した結果は得られなかった。つぎに、Bone morphogenetic protein (BMP)2 または BMP4 に浸漬した TCP を、上述したように 1-11 細胞株とともに SCID マウス背部皮下に移植した結果、硬組織を伴った歯根膜様組織の形成が促進する傾向が認められた。また両因子による結果において、BMP2 が BMP4 と比較してやや効果が高い傾向が認められた。以上より、歯根膜組織再生には BMP2 の他に因子の関与が必要であることが示唆された。

初代ヒト歯根膜細胞(HPLF)に伸展力を負荷し、その結果発現する因子について検討した。細胞に付与する伸展率は、破骨細胞形成因子である RANKL の発現が抑制され、破骨細胞抑制因子である OPG の発現が促進するような伸展力を元にして、8%で負荷をかけることに決定した。その結果、機械的刺激後の HPLF において、Angiotensin II (ANG II)、TGF-beta そして Alkaline phosphatase (ALP) の遺伝子発現が促進することが確認された。ANG II 単味での HPLF 刺激においても、TGF-beta ならびに ALP 発現が促進することが明らかになった。またこの反応は、ANG II レ

セプターである AT2 のブロッカーによって、抑制され、同じく AT1 のブロッカーでは抑制されなかった。つぎに HPLF を AT1 または AT2 ブロッカーにて処理した後、伸展力を負荷した結果、ANG II にて刺激した場合と同様に、AT2 ブロッカーによって TGF-beta ならびに ALP の発現が抑制され、AT1 ブロッカーでは抑制反応が認められなかった。以上のことから、伸展力が負荷された歯根膜細胞において ANG II を介した経路が存在し、ANG II は歯根膜の恒常性に維持に関与していることが示唆された。

生体内で歯根膜の終末は歯根あるいは骨といった硬組織に両端をおいている。すなわち歯根膜は硬組織が存在する部位では、石灰化能を有していると考えられることから、本実験に同意が得られた患者のヒト歯根膜細胞を CaCl<sub>2</sub> 存在下で培養し、カルシウムが歯根膜細胞の分化に及ぼす影響について検討した。その結果、CaCl<sub>2</sub> がおよそ 5mM 程度で存在した場合に、オステオポンチン、オステオカルシンの mRNA 合成量を促進することが明らかとなった。また同様の条件下で同じ濃度の MgCl<sub>2</sub> と培養した場合には、何も添加していないコントロールと同じ結果であったことから、カルシウムが歯根膜細胞の骨芽細胞への分化を誘導することが示唆された。さらに CaCl<sub>2</sub> が歯根膜細胞の増殖に及ぼす影響について検討したところ、カルシウムの濃度依存的に促進することが明らかになった。さらに CaCl<sub>2</sub> によって、BMP2 の発現が亢進し、MgCl<sub>2</sub> は無添加のコントロールと同様に BMP2 の発現には影響しなかった。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 に作用し骨芽細胞への分化が促進したと考えられた。一方、BMP シグナルの antagonist である noggin の発現について CaCl<sub>2</sub> または MgCl<sub>2</sub> 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、CaCl<sub>2</sub> 投与群において BMP2 の発現は当初から促進していた。以上のことから、歯根膜組織再生には、足場材料としてカルシウムをある一定の割合で徐放する特性が必要とされ、これにより生体内ではその周囲に石灰化組織を構築することが可能とな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 10 件)

安田善之、大友栄二、前田英史、赤峰昭文、齋藤隆史：ワンステップボンディング材の歯髓細胞障害性および象牙芽細胞への分化に与える影響について 査読有り 日歯内療誌 28 巻 143-148 2007

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 13 件)

吉田桐枝、後藤康治、河田真裕子、前田英史、畦森雅子、赤峰昭文：水酸化カルシウム製剤貼薬根管における根尖封鎖性の検討(第 2 報)。第 127 回日本歯科保存学会。2007.11.8 - 9. 岡山

K. YOSHIDA, Y. GOTO, M. KAWATA, H. MAEDA, M. UNEMORI, and A. AKAMINE: Influence of calcium hydroxide intracanal medication on apical leakage. 86th General Session & Exhibition of the IADR/AADR/CADR. 2008. 7.2-5 Toronto, Canada

前田英史、友清淳、藤井慎介、島一也、中野嗣久、和田尚久、門野内聡、堀清美、赤峰昭文：MTA はヒト歯根膜細胞の BMP2 発現を誘導する。第 129 回日本歯科保存学会。2008.11.6-7. 富山

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

後藤 康治 (GOTO YASU HARU)  
九州大学・大学院歯学研究院・准助教  
研究者番号：00170473

(2)研究分担者

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

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

畦森 雅子 (UNEMORI MASAKO)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：90136490

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：