

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10162

研究課題名(和文) マウス切歯apical bud細胞の臼歯への移植による細胞動態の観察

研究課題名(英文) Observation of cell movement after the implantation of mouse incisal apical bud cells to molars

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスなどげっ歯類の前歯は生涯にわたって伸び続けるが、その理由は前歯根尖部に組織幹細胞が存在することによっている。われわれは、これを顕微鏡下にてGFPマウスから採取し、野生型マウスに移植して6ヶ月にわたって観察した。その結果、この組織幹細胞は上皮系から間葉系へと変化し、歯と周囲の組織をつなげる役割を果たすセメント芽細胞に分化することが明らかになった。この細胞分化のメカニズムを応用することによって、歯の再生や歯周病で失われた組織の再生に応用できると展望している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抜け落ちた歯の再生、歯周病によって失われた歯周組織の再生は、再生療法における次の大きなターゲットである。歯はセメント質と歯根膜を介して、周囲の歯槽骨とつながっている。セメント質を形成するセメント芽細胞の由来については、これまで間葉系細胞由来であると一般的に考えられてきた。われわれの研究によって、組織幹細胞が移植後に上皮間葉転換を生じてセメント芽細胞となることを初めて検証できた。このメカニズムを応用することで、今後の再生医療の展開につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The anterior teeth of rodents such as mice continue to grow throughout their lives, due to the presence of tissue stem cells at the apex of the anterior teeth. We collected this from GFP mice under a microscope, transplanted it into wild-type mice, and observed it for up to 6 months. As a result, it was revealed that these tissue stem cells shows epithelial-mesenchymal transformation and differentiate into cementoblasts that play a role in connecting the teeth and surrounding tissues. By applying this mechanism of cell differentiation, it could be applied to the regeneration of teeth and the regeneration of tissues lost due to periodontal disease.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：apical bud セメント質 Hertwig上皮鞘 Malassezの上皮遺残 上皮間葉転換

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 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、今日に至っても未だ十分に解明されていない。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ことを期待される。

生涯にわたって伸び続けるゲツ歯類の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 apical bud と名付けられ、ここには上皮系幹細胞からなる細胞集団がある。apical bud を移植材料として利用することは、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。

われわれは、研究費申請時においてすでに、GFP 陽性トランスジェニックマウスの切歯 apical bud 細胞を顕微鏡下で大まかに採取し、野生型マウス切歯根尖部に移植して生着する手技の開発に成功し、その成果を報告していた<sup>1)</sup>。apical bud 細胞は、エナメル芽細胞/Hertwig 上皮鞘 (Hertwig's Epithelial Root Sheath、以下 HERS) /Malassez 残存上皮 (Epithelial cell rests of Malassez、以下 ERM) へと分化するが、近年 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有力となってきている。<sup>1-4)</sup> *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、あっても僅かであるとする研究もあり<sup>5,6)</sup>、とくに移植した apical bud 細胞がどのような動態をとるのかについては結論が出ていなかった。そこで野生型マウス臼歯に GFP にてラベリングされた apical bud 細胞を移植し、6ヶ月にわたって動態を観察することで、この問いの解明をめざすこととした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯胚の上皮系の幹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。今回申請した研究計画では、GFP 陽性マウス切歯の apical bud 細胞を顕微鏡下にて単離し、これを採取後に分散化して、野生型マウスの臼歯歯根膜腔と臼歯歯胚とに注入することとした。

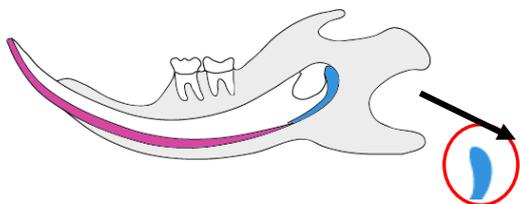
apical bud 細胞は、エナメル芽細胞/HERS/ERM に分化する。HERS は、歯小囊の間葉系細胞をセメント芽細胞に分化させ、このセメント芽細胞は断裂した HERS の隙間を通して歯根面上にセメント質を形成する。HERS は、最終的に歯根膜中に残存して ERM となるが、一部はアポトーシスに至る。歯根膜中に残された ERM の働きは、歯根膜腔の維持、根吸収とアンキローシスの防止、歯根膜の恒常性の維持、無細胞セメント質の形成誘導など多岐にわたると考えられている。

一方で歯の発生段階においては、HERS の一部が上皮間葉転換を生じてセメント芽細胞に変化することは、Cre-Loxp システムを用いた *in vivo* 実験にてすでに証明されている<sup>3)</sup>。しかし、外部から移植された HERS においても上皮間葉転換が生じる能力を有するのか、またそのような細胞移植がセメント質再生をとまなう組織再生にも応用できるかどうかは不明であった<sup>7)</sup>。そこで apical bud 細胞を臼歯の歯周組織に移植し、移植した細胞の動態を6ヶ月間にわたって観察し、石灰化の状況を示すオステオカルシン、セメント芽細胞に特徴的なタンパクでるセメンタム1などを1次抗体として蛍光抗体染色することによって細胞動態を観察することとした。

### 3. 研究の方法

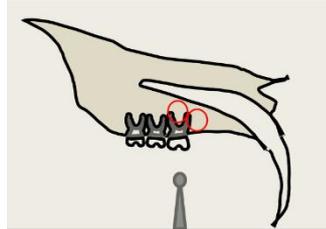
(1) ドナーとして GFP 遺伝子を導入した10日齢のグリーンマウス C57BL/6-TG(CAG-EGFP)、レシピエントとして6週齢のオスの野生型マウス C57BL/6 を使用した。動物は福岡歯科大学アニマルセンターSPF 実験室にて飼育し、同施設のガイドラインに従い12時間の明暗サイクルで、ドナーは親マウスと一緒に飼育した。実験は動物福祉に配慮し福岡歯科大学動物実験指針に沿って行なわれた (福岡歯科大学動物実験承認番号第 20007 号)。

(2) 10日齢のグリーンマウスをイソフルラン過麻酔吸入により安楽死させた後、実体顕微鏡下にて下顎骨を取り出し、そこから前歯を抜き、歯を 1500PU/ml 濃度の Dispase が入った 37°C 生食に 20 分間浸透させ、根尖部から apical bud のみを単離した。さらに単離した apical bud を Accumax® 1 mL 中で室温にて 10 分間インキュベートし、細胞分散後に遠心分離にて回収した。



Apical bud から赤丸  
で示す部分のみを  
実体顕微鏡下で採取

(3) 全身麻酔科で6週齢の野生型マウスに開口器を装着後、エンジンドリルにてΦ0.5mm、深さ1.5mmの穴を上顎臼歯部歯根膜に開け、歯根膜部および骨欠損部に細胞を注入した。移植量は1欠損につきドナー3箇所分3μLとした。移植後1、4、12、24週にて動物を安楽死させ（各週n=8）、左右の上顎骨を取り出し、4%パラホルムアルデヒド緩衝液にて固定した。

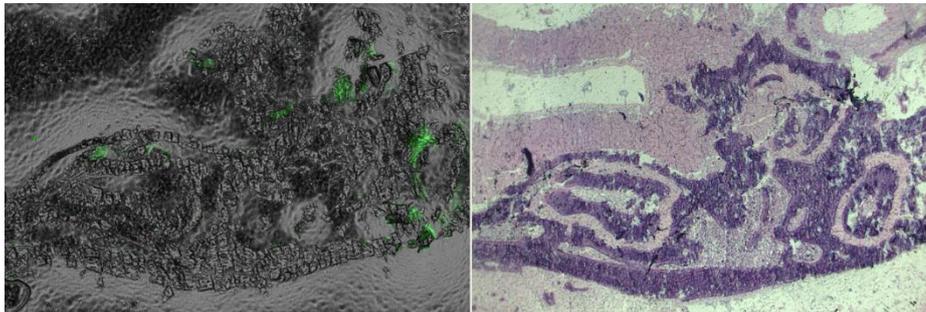


上顎臼歯根分岐部（赤丸）に骨欠損を作り3μLの細胞を注入

(4) 包埋容器（クライオモールド）に未脱灰のままの上顎骨を咬合面が上面になるように設置し、凍結包埋剤SCEM®を入れ液体窒素にて凍結した。凍結切片はLeica社製のクライオスタットCM3050S®の庫内温度を-30度にて設定し、マウス上顎第1臼歯の歯根分岐部を基準として上下200μmを根尖側から歯冠側に向かってタングステンナイフで切り出し、厚さ4μmにて川本法（フィルムトランスファー法）にて作製した。組織学的な形態については、作製した標本をHE染色及び免疫蛍光染色法にて観察を行った。HE染色の手順は通法に従い、レジンの包埋剤にて光重合で封入した。免疫染色法においては1次抗体として、抗Osteopontinウサギ抗体、抗Cementum-1ウサギ抗体、チキンAnti-GFP抗体、2次抗体として抗ウサギAlexafluor568抗体、抗チキンAlexaFluor488抗体を使用し、DAPI入りVectorShield®にて封入した。組織切片はキーエンス社製の蛍光顕微鏡BZ-X710®にて観察した。

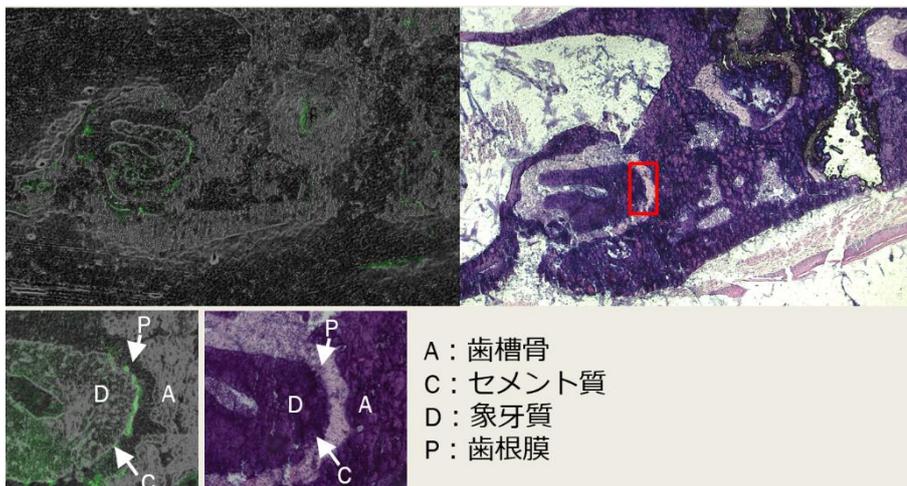
#### 4. 研究成果

- (1) 以下に移植後1週から24週までの代表的な所化を示す。
- (2) 移植後1週の像を下に示す。1週、2週では移植した細胞がGFP陽性となって確認された。ここには示していないが、1週ではGFP陽性細胞の一部にはOsteocalcinを発現しているものとしていないものが認められたが、4週以降では全てがOsteocalcin陽性であった。



左図が位相差像にGFP陽性の蛍光顕微鏡像に重ねた画像。緑色蛍光部位にGFP陽性細胞が留まっている。右図が連続切片のHE像。HE像の左が近心、右が遠心、写っている3根は第1臼歯で、下側に頬側の2根、上側に口蓋の1根を示す。

(3) 移植後12週は、歯根膜内に遊走した細胞の一部は歯根膜腔内に認められた。さらにセメ

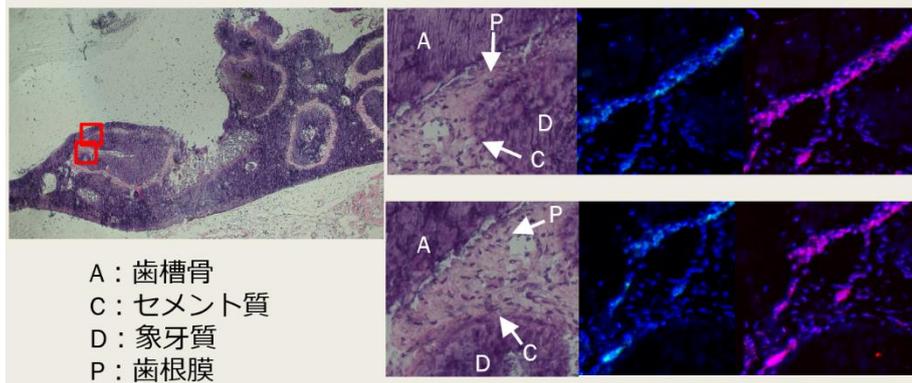


A: 歯槽骨  
C: セメント質  
D: 象牙質  
P: 歯根膜

ント質の表面で **Osteocalcin** 陽性を示した。HE 像にて細胞の周囲にセメント基質様構造を生じていることを認めた。

前ページ左上図：位相差像に **GFP** 陽性の蛍光顕微鏡像を重ねた画像。右上図：連続切片の HE 像。HE 像の左側が近心、右側が遠心、写っている 3 根は第 1 臼歯で、下に頰側の 2 根、上に口蓋の 1 根を示す。下の 2 枚は赤枠部分の拡大像。近心頰側根の分岐部側にセメント質様細胞が配列していることが確認できる。

(4) 移植後 2 4 週も同様に歯根膜内にセメント芽細胞様細胞が生じ、HE 像にて細胞の周囲にセメント基質様構造を生じた。**GFP** 陽性の細胞は、歯根表面のセメント質側にも、歯根膜を挟んで歯槽骨側にも認められた。また、ココには示していないが、**Cementum-1** による蛍光免疫染色においても、同様の所見が認められた。

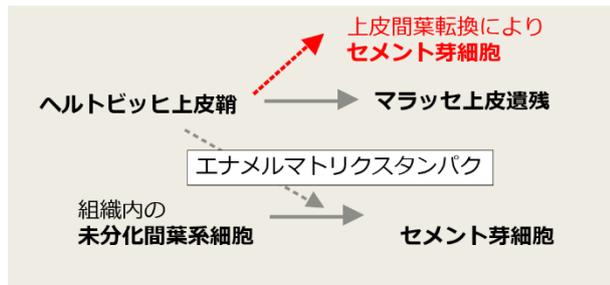


左上が弱拡大の HE 像。右に近心頰側根の近心側の赤枠部分 2 箇所が強拡大を示す。右の上下段とも、HE 像、DAPI 陽性と **GFP** 陽性部位の重ね合わせ、DAPI 陽性と **Osteocalcin** 陽性の重ね合わせ。

#### (5) 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、これまでは不明であった。本研究では、上皮系組織幹細胞の移植後の動態を、**GFP** 蛍光を追跡することにより調べた。その結果、細胞は歯根膜腔に遊走し、歯根膜細胞、セメント芽細胞様細胞に分化していた。細胞の一部はセメント質の表面で **Osteocalcin** 陽性を示しておりセメント基質様構造を生じていた。

これまでにエナメル芽細胞を作る上皮系幹細胞が放出するエナメルマトリクスタンパクによって、未分化間葉系細胞がセメント芽細胞に誘導されることが定説として認められている。ブタから抽出したエナメルマトリクスタンパクの加熱処理剤（エムドゲインゲル®）はこの目的で臨床応用されている。われわれの研究結果から、**apical bud** 由来の細胞は細胞そのものが上皮間葉転換を生じてセメント芽細胞様細胞に分化することが確認された。この細胞はエナメル芽細胞としての性質も持っていることから、自分自身がセメント芽細胞になるとともに、周囲の間葉系細胞をセメント芽細胞に誘導する 2 重の働きを期待できる。



われわれの観察では、移植した細胞の一部は、歯根表面ではセメント芽細胞様細胞になり、歯槽骨に取り込まれた部分では骨芽細胞様になっていることが判明した。また、骨芽細胞様細胞に分化している細胞でも **Cementum-1** 陽性となっていることは大変興味深い。今回のわれわれの研究の反省点は実験動物に比べて骨欠損が大きすぎたために、侵襲が過度にかかっており、組織再生のためのコントロールされた研究としては少しばらつき出ている点である。今後は骨欠損を作らずに口蓋側のフラップ形成のみを行って細胞移植を行うことで、さらに検証したいと考えている。

#### 参考文献

- 1) Maruo N, Sakagami R, Yoshinaga Y, Okamura K, Sawa Y :Development of an apical bud differentiation model using transgenic mice expressing green fluorescent protein as donor, PLoS ONE 11(3): e0150766. doi:10.1371/journal.pone.0150766, 2016.
- 2) 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.
- 3) Huang X, Bringas Jr P, Slavkin H C, Chai Y: Fate of HERS during tooth root development. Dev Biol, 334(1), 22-30, 2009.
- 4) 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.
- 5) Luan X, Ito Y, Diekwisch TG: Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. Dev Dyn, 235(5), 1167-1180, 2006.
- 6) Lester K S: The incorporation of epithelial cells by cementum. J ultrast res, 27(1), 63-87, 1969.
- 7) 丸尾直樹, 坂上竜資: Hertwig 上皮鞘の細胞はセメント芽細胞に分化するか. 日歯周誌. 58.2 : 58-64, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Arita Y, Yoshinaga Y, Kaneko T, Kawahara Y, Nakamura K, Ohgi K, Arita S, Ryu T, Takase M, Sakagami R	4. 巻 55
2. 論文標題 Glyburide inhibits the bone resorption induced by traumatic occlusion in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Periodontal Res	6. 最初と最後の頁 in printing
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12731	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 -

1. 著者名 Kawahara Y, Kaneko T, Yoshinaga Y, Arita Y, Nakamura K, Koga C, Yoshimura A, Sakagami R	4. 巻 99
2. 論文標題 Effects of Sulfonylureas on Periodontopathic Bacteria-Induced Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dent Res	6. 最初と最後の頁 in printing
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034520913250	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 笠孝成, 内田邦敏, 岡村和彦, 八田光世, 山崎純, 坂上竜資	4. 巻 63
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalisがヒト口腔粘膜上皮細胞に与える影響の3次元構築モデルによる解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 144-155
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高瀬稔, 廣松亮, 有田晴一, 大城希美子, 吉永泰周, 坂上竜資
2. 発表標題 HERS の細胞の歯周組織再生の解明
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大城希美子, 吉永泰周, 山本南奈, 廣松亮, 有田晴一, 脇田祥平, 坂上竜資
2. 発表標題 Toll-like Receptor 2 刺激は酸化LDL 受容体を介して破骨細胞形成を促進する
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------