

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19042

研究課題名(和文) マウスにおける歯槽骨再生に寄与する組織幹細胞の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the tissue stem cells that contribute to alveolar bone regeneration in mice

研究代表者

堀部 寛治 (Horibe, Kanji)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70733509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜の細胞は、非常に高い骨形成能を有することが培養実験や、細胞移植による異所性骨形成などで報告されており、歯根膜中の幹細胞が歯槽骨再生に重要であると考えられている。しかし、実際に歯根膜幹細胞がどのように歯周組織再生に寄与するかは不明であった。我々は、歯根膜の細胞で発現するOsterixを標識として用い、歯槽骨再生時における歯根膜中のOsx陽性細胞とその子孫細胞の動態を解析する細胞系譜解析を、抜歯および歯周病後の組織治癒で経時的に行った。

その結果、歯根膜中のOsx陽性細胞が歯周組織の治癒・再生時において盛んな増殖活性を示し、骨組織のみならず粘膜上皮の再生にも寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の保持において歯周組織、特に歯槽骨の存在は最も大きい。歯の喪失の最大の原因である歯周病は不可逆的な歯周組織破壊を引き起こす。これは、歯の脱落による摂食機能の喪失へと繋がる。したがって、歯周病の発生予防と共に、歯周病罹患後の歯周組織の再生による健康状態への復帰は、食機能維持によるQOL向上を目的とする歯科臨床において最も重要な課題の一つである。

今回、我々の研究により歯根膜中のOsterix陽性細胞が抜歯および歯周病後の口腔粘膜上皮および、歯槽骨の再生に直接寄与することが明らかとなった。この結果は、歯周組織・歯槽骨再生に寄与する細胞の特性の解明や、細胞療法の発展に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported through analysis of cultured cells and ectopic bone formation experiments using cell transplantation that periodontal ligament-derived cells have a very high osteogenic potential, and stem cells in the periodontal ligament are thought to be important for alveolar bone regeneration. However, it has been unclear how periodontal ligament stem cells actually contribute to periodontal tissue regeneration. Using Osterix expressed in periodontal ligament cells as a label, we analyzed the cell lineage of Osterix-positive cells and their progeny in the periodontal ligament over time during tissue healing after tooth extraction and periodontal disease.

The results suggested that Osterix-positive cells in the periodontal ligament showed proliferative activity during periodontal tissue healing/regeneration, and contributed to the regeneration of not only bone tissue but also mucosal epithelium.

研究分野：歯科

キーワード：歯槽骨 歯周組織 歯周病 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

健康寿命の延長は、医療政策の柱の一つであり、食習慣を維持することの重要性、需要は今まで以上に高まっている。歯の保持において歯周組織は必須であり、特に歯槽骨の存在は最も大きい。歯槽骨破壊を惹起し、歯の喪失の最大の原因である歯周病は成人で最も罹患率の高い疾病の一つであり、病態の進行により不可逆的な歯肉粘膜と歯根の付着の喪失、歯槽骨の吸収、そして最終的には歯の脱落による摂食機能の喪失へと繋がる。したがって、歯周病の発生予防と共に、歯周病罹患後の歯周組織の再生による健康状態への復帰は、歯科臨床において最も重要な課題の一つである。歯周組織・歯槽骨再生に寄与する細胞の同定と特性を解明することは、細胞療法や骨再生を活性化する低分子化合物の探索に発展させることができる。現在、Osterix(Osx)を発現し、高い骨形成能力を有する歯根膜の細胞が歯槽骨再生に寄与すると考えられているが、その具体的な機序は明らかとなっていない。我々は歯槽骨再生時の歯根膜細胞の寄与を解析することを目的に、Tamoxifen 投与により Osx 陽性細胞に蛍光色素 tdTomato を発現させ、その子孫細胞を追跡できる Osx-Cre^{ert2};tdTomato マウスを用いた実験計画を策定した。

2. 研究の目的

歯周組織において歯根膜由来の細胞は、非常に高い骨形成能を有することが *in vitro* 実験(*J Dent Res.* 74:1374, 1995)、および細胞移植による異所性骨形成実験などで報告されている(*J Bone Miner Metab.* 27:149, 2009)。歯根膜では硬組織形成に関与するとされるタンパク質 Periostin(*J Bone Miner Res.* 14:1239, 1999)や前骨芽細胞・骨芽細胞のマーカーとなる Osterix(*Development.* 142:787, 2015)が発現し、矯正移動時の骨添加側の歯根膜(*Cell Tissue Res.* 312:345, 2003, *Development.* 142:787, 2015)や抜歯窩(*J Dent Res.* 97:803, 2018)での遺伝子発現上昇や陽性細胞の増加が報告されている。これらの報告から、歯根膜の細胞が歯槽骨の再生に重要であると考えられている。しかしながら、前述のように歯周病による歯槽骨破壊は不可逆性であり、病原細菌の除去や炎症の消退により歯周病が寛解したとしても、その後の歯周組織、歯槽骨の劇的な自然再生は起こらない。現在、歯周組織の再生療法に FGF2 製剤(リグロス®)が臨床現場で応用されているが、どのような細胞に作用して組織再生に寄与しているかは明らかとなっていない。我々は、歯根膜の細胞で高発現する Osterix を標識として用い、歯槽骨再生時における歯根膜中の Osx 陽性細胞とその子孫細胞の動態を解析し、歯根膜幹細胞の歯槽骨再生における役割の解析を目的として実験を行った。

3. 研究の方法

本研究では、Tamoxifen 投与により Osx 陽性細胞が時期特異的に tdTomato を発現し、その子孫細胞も標識される Osx-Cre^{ert2};tdTomato マウスを対象に、抜歯後の抜歯窩治癒と歯周病後の FGF2 製剤による歯槽骨再生の二種類の歯槽骨実験モデルを用いて解析を行う

(1) 抜歯窩歯槽骨再生における細胞系譜解析

Tamoxifen を三日間前投与した 8 週齢の Osx-Cre^{ert2};tdTomato マウスを全身麻酔下にて上顎臼歯の抜歯を行う。抜歯後、3日から14日の期間で経時的に上顎骨の回収を行う。回収後、抜歯窩の骨新生の状態をマイクロ CT 撮影により評価を行う。その後、凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡にてそれぞれの時期における歯肉粘膜上皮および、抜歯窩内の新生骨組織における tdTomato を発現している Osx 陽性細胞およびその子孫細胞の局在を共焦点レーザー顕微鏡に

て観察する。その際、増殖細胞のマーカーである Ki67 の蛍光免疫染色も併せて行う。

(2) 歯周病誘導後の歯槽骨再生における細胞系譜解析

8週齢の *Osx-Cre^{ert2}*;tdTomato マウスの上顎第二臼歯に絹糸を結紮することで、プラーク付着による細菌性の歯槽骨破壊を誘導する。結紮から 14日後、絹糸を除去し歯面の清掃を行う。Tamoxifen を三日間投与した後、口蓋粘膜を切開し、粘膜弁の形成を行う。粘膜弁を咽頭方向に剥離することで、歯槽骨吸収部を露出する。コラーゲンスポンジを用い、歯槽骨吸収部へ FGF2 製剤の局所投与を行う。粘膜は、復位した後、外科用接着剤で接着させる。処置後、4週後に上顎骨を回収し、骨新生の状態をマイクロ CT 撮影により評価を行う。その後、凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡にて FGF2 投与後の再生歯周組織における tdTomato 発現細胞および Ki67 陽性細胞の局在を観察する。

4. 研究成果

(1) 定常時における歯周組織での *Osx* 陽性細胞の局在

Tamoxifen を三日間投与した 8週齢の *Osx-Cre^{ert2}*;tdTomato マウスの上顎の歯と歯周組織を共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。tdTomato を発現細胞 (*Osx* 陽性細胞およびその子孫細胞) は、歯髄内の象牙芽細胞、歯槽骨、そして歯根膜に少数の陽性細胞の局在が確認された (図 1)。歯根膜で *Osx* 陽性細胞が少ないことは、外傷・炎症が存在していない状態での歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化およびセメント芽細胞分化は限局的であることが考察される。

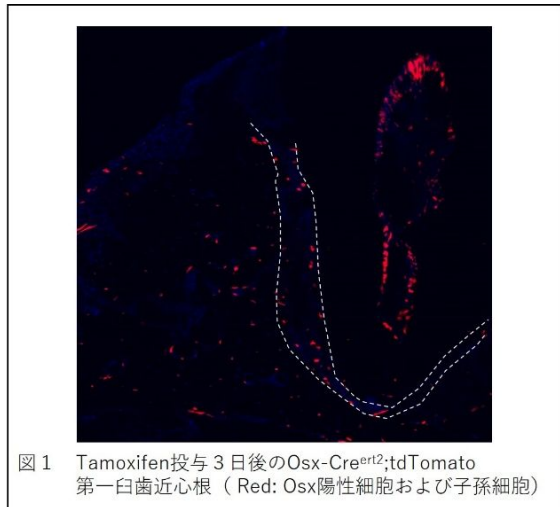


図 1 Tamoxifen投与 3日後の*Osx-Cre^{ert2}*;tdTomato 第一臼歯近心根 (Red: *Osx*陽性細胞および子孫細胞)

(2) 抜歯窩歯槽骨再生における細胞系譜解析

Tamoxifen 前投与の翌日に抜歯を行い、その後の抜歯窩歯槽骨の経時的観察を行った。マイクロ CT 撮影像では、抜歯後 3日目の抜歯窩内部の骨新生を示す不透過像はごく少数である (図 2)。共焦点レーザー顕微鏡像では、赤色蛍光を発する tdTomato 陽性の *Osterix* 陽性およびその子孫細胞の局在が抜歯窩で確認できた。その細胞数は抜歯前の歯根膜 (図 1) よりも増加しており、Ki67 との共局在を示した。抜歯から 7日後、マイクロ CT 像で、不透過度の低い幼若骨の形成が抜歯窩内部全体で確認された。この時点で tdTomato 発現細胞は抜歯窩の新生骨表面の骨芽細胞のみならず、再生した歯肉粘膜上皮でも局在が認められた。

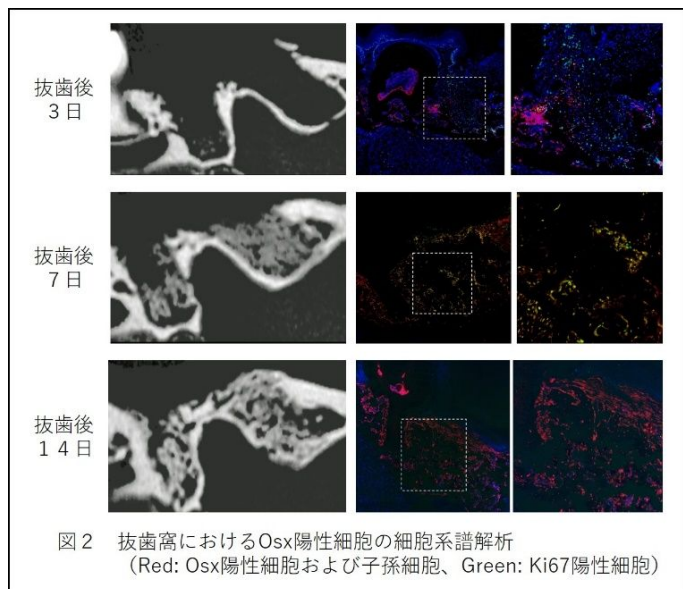


図 2 抜歯窩における *Osx* 陽性細胞の細胞系譜解析 (Red: *Osx* 陽性細胞および子孫細胞、Green: Ki67 陽性細胞)

それらの細胞の大部分は Ki67 との共局在を示し、盛んな細胞増殖を行っていることを示した。治癒反応が落ち着いた抜歯 14日後では、抜歯窩内の新生骨のマイクロ CT 像は不透過度を増し、

骨としての成熟度が増していることを示した。共焦点レーザー顕微鏡像では、7日目と同様に粘膜上皮、抜歯窩新生骨で広汎な局在が見られた。一方で、Ki67 陽性細胞はごく少数であった。これらの結果から、外傷性の骨欠損である抜歯の治癒において、残存歯根膜中に存在する Osx 陽性細胞が抜歯窩の骨形成のみならず、粘膜上皮の治癒の主体となる細胞であることが示唆された。

(2) 歯周病誘導後の歯槽骨再生における細胞系譜解析

絹糸による歯周病誘導により、上顎臼歯では、動揺を伴う歯槽骨吸収が認められた。FGF2 製剤の骨吸収部への直接塗布は、4週間後に明らかな新生骨形成がマイクロ CT 像で認められた(図3)。また、共焦点レーザー顕微鏡で新しく形成された骨周囲の細胞で tdTomato の蛍光が認められた。この結果は、FGF2 製剤塗布による歯周組織再生治療において歯根膜中の Osx 陽性細胞が骨芽細胞へと分化することで骨形成を行っていることを示唆している。

以上の結果より、外傷性の抜歯窩の粘膜治癒と骨新生、炎症性骨吸収である歯周病後の FGF2 刺激による歯周組織再生、いずれの場合においても、血

流を介して外部より遊走される間葉系幹細胞ではなく、歯根膜中の幹細胞が主体となって組織治癒・再生を行っていることが示唆された。

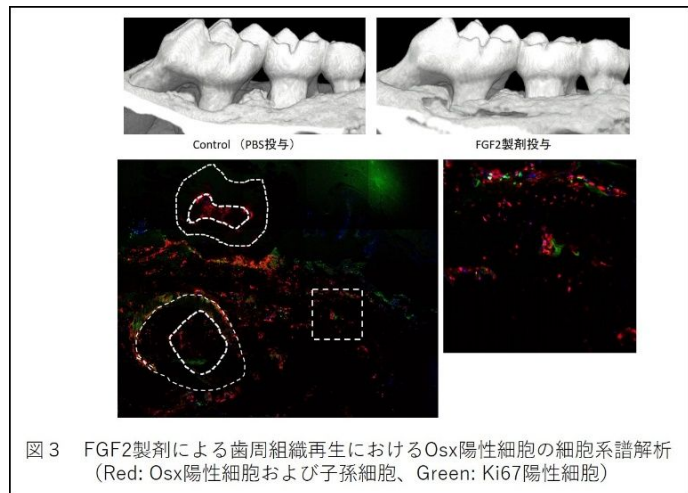


図3 FGF2製剤による歯周組織再生におけるOsx陽性細胞の細胞系譜解析 (Red: Osx陽性細胞および子孫細胞、Green: Ki67陽性細胞)

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

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