

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09995

研究課題名(和文) Shh-Gli1応答性歯根膜幹細胞分化機構の解明と歯槽骨再生への応用

研究課題名(英文) Mechanism of Shh-Gli1 pathway in periodontal ligament and alveolar bone regeneration

研究代表者

建部 廣明 (TAKEBE, Hiroaki)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：40638293

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)：歯根膜に存在する組織幹細胞における維持調節機構は不明な点が多い。本研究では歯根膜幹細胞のGli1陽性細胞とGli1の上流因子であるShhによる維持調節機構を明らかにすることを目的として研究を行なった。歯根膜に存在するGli1陽性細胞の幹細胞性を持つことを初年度に見出した(J Oral Sci, 2020)。次にBmi1が骨芽細胞分化因子である可能性を示した(ANAT REC, 2021)。最終年度に骨芽細胞分化においてGli1とShhの関連についての考察を報告した(Bone, 2022)。各研究成果は第63回歯科基礎医学会学術大会、第127回日本解剖学会総会・全国学術集会において発表を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜に存在する幹細胞は骨芽細胞への分化に関係していると考えられているが、詳細は明らかにされていない。また、幹細胞が骨芽細胞へと分化するメカニズムや分化を制御する因子についても明らかにされていない。本研究では歯根膜幹細胞動態の詳細と骨芽細胞分化制御因子の一部が明らかとなった。歯根膜幹細胞の骨芽細胞への分化調節機構を明らかにすることは、幹細胞を用いた歯周組織再生療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The regulation mechanism of mesenchymal stem cells in the periodontal ligament is not clear. The purpose of this study is to clarify the regulation mechanism and relationship between Gli1-positive cells in periodontal ligament stem cells and Shh, which is an upstream factor of Gli1. In the first year, we found that Gli1-positive cells in the periodontal ligament have stem cell characteristics (J Oral Sci, 2020). Next, we showed that Bmi1 might be an osteoblast differentiation factor (ANAT REC, 2021). In the final year, we reported on the relationship between Gli1 and Shh in osteoblast differentiation (Bone, 2022). Each result was presented at the 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology and the 127th Annual Meeting of the Japanese association of anatomists.

研究分野：骨再生領域

キーワード：歯槽骨 歯根膜 遺伝子改変動物 Gli1 Sonic hedgehog

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会において、長期にわたる咬合機能の維持は Quality of Life (QOL) の向上に不可欠であり、予知性の高い歯周組織再生療法の開発が急務となっている。歯槽骨を形成する骨芽細胞は、組織幹細胞から分化すると考えられる。しかし、歯根膜に存在する組織幹細胞における維持調節機構は不明な点が多い。これまでに本研究グループは、フェイトマッピング解析法を用い、歯根膜組織に歯槽骨を再生する細胞が存在することを明らかにした(図1; Hosoya A. et al., Bone 42:350-357, 2008)。また、この未分化細胞は転写因子 *Gli1* を発現し、幹細胞特性を有することを予備実験的に見出した。さらに、Sonic hedgehog (Shh) は *Gli1* の上流因子として知られている (Horikiri Y. et al., PLOS ONE 10; e76785, 2013)。これらのことから、*Gli1* 陽性歯根膜幹細胞の骨芽細胞への分化は、Shh による調節を受けている可能性が考えられる。しかし、骨芽細胞分化とどのような関連があるかは明らかにされていない。本研究グループはこれまで歯槽骨再生動物実験モデルを作製し、歯根膜に存在する Shh 陽性細胞が骨芽細胞に分化する可能性があることを報告してきた。歯根膜幹細胞の骨芽細胞への分化調節機構を明らかにすることは、幹細胞を用いた歯周組織再生療法の開発につながると考えられる。

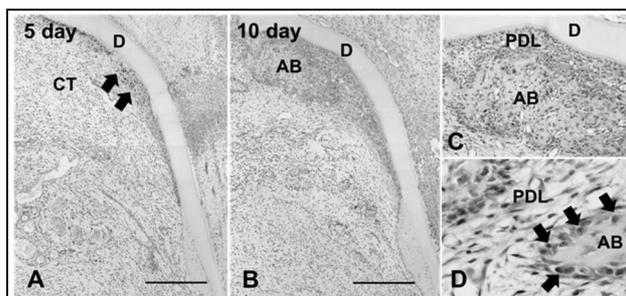


図1 歯槽骨再生のモデル実験

GFPラット臼歯を野生型ラット腹部皮下へ移植した。移植5日では、GFP陽性細胞が歯根膜でみられた(A; 矢印)。10日では歯槽骨が再生した(B, C)。再生骨芽細胞がGFP陽性であることから、新生歯槽骨は歯根膜由来であることが示された。
AB: 歯槽骨、CT: 結合組織、D: 象牙質、PDL: 歯根膜

2. 研究の目的

本研究グループのこれまでの予備実験結果から、*Gli1* 陽性細胞歯根膜幹細胞の骨芽細胞への分化は、Shh による調節を受けている可能性が考えられる (Takebe H. et al., Int J Mol Sci 21; 677, 2020)。従って本研究では、歯根膜に存在する *Gli1* 陽性細胞を歯根膜に存在する幹細胞マーカーと位置づけるための実験、骨芽細胞分化過程における *Gli1* および、Shh 発現の検索、*Gli1* 陽性歯根膜幹細胞の Shh による維持調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜の *Gli1* 陽性細胞の局在の検索および、幹細胞特性について

タモキシフェンを投与すると *Gli1* 陽性細胞および、その子孫細胞が Tomato 蛍光を発現する遺伝子改変マウス (*Gli1*-CreER^{T2} マウス) を用いる。タモキシフェン投与 1、2、4 週後の歯根膜での *Gli1* 陽性細胞の局在を組織学的に検索する。さらに、実験動物の歯根膜細胞を分取後、幹細胞培地に播種し、培養後のコロニー形成の有無を確認する。本実験は、マウス歯根膜に存在する *Gli1* 陽性細胞が幹細胞であることを証明する実験である。

(2) 骨芽細胞分化過程における *Bmi1* の局在の検索

胎生 14 日、16 日、18 日および生後 21 日の実験動物の脛骨の組織切片を作製する。*Bmi1* ならびに骨芽細胞分化マーカーとして *Osterix* (*Osx*) および *Runx2* による免疫組織化学染色にて、軟骨内骨化の骨芽細胞分化過程における *Osx*、*Runx2*、*Bmi1* の局在を検討する。

(3) 歯根膜における *Gli1* 陽性細胞の骨芽細胞分化についての組織学的検討

タモキシフェンを投与すると *Gli1* 陽性細胞および、その子孫細胞が Tomato 蛍光を発現する遺伝子改変マウス (*Gli1*-CreER^{T2} マウス) を用いる。歯根膜中での新生骨形成を検索するため、上顎大白歯に矯正力を与え、歯の移動を行なう。実験動物にタモキシフェン投与後、牽引側における *Gli1* 陽性細胞の局在検索を細胞系譜解析法にて行なった。

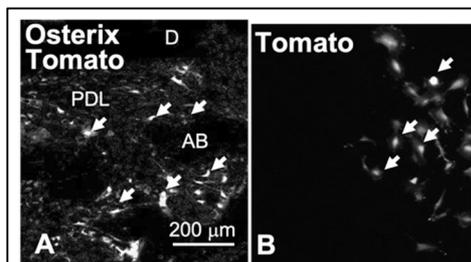


図2 歯槽骨再生実験における *Gli1* 陽性細胞の骨芽細胞への分化

再生歯槽骨周囲に *Gli1* (Tomato) が骨芽細胞分化マーカー *Osterix* と共局在を示した (A; 矢印)。また、幹細胞促進培地で *Gli1* 陽性細胞を培養するとコロニー形成を認めた (B; 矢印)。AB: 歯槽骨、D: 象牙質、PDL: 歯根膜

4. 研究成果

(1) タモキシフェン投与後の歯根膜には、多くの *Gli1* 陽性細胞の局在を認めた。また、骨芽細胞の分化マーカーとして知られる *Osterix* (*Osx*) の局在を検索すると無数の *Osx* 陽性細胞と *Gli1* 陽性細胞の

共局在を示した(図 1A)。この結果は、歯根膜の Gli1 陽性細胞が骨芽細胞に分化することを示す結果である。次にタモキシフェン投与後の実験動物の歯根膜に存在する Gli1 陽性細胞を分取し、幹細胞培地で培養するとコロニー形成を認めた(図 2B)。以上の結果から、Gli1 陽性細胞は幹細胞特性を持っているが、特に歯根膜に存在する Gli1 陽性細胞は骨芽細胞へと分化することが明らかになった。本研究結果は国際誌にて発表した(Shalehin N, Takebe H et al., JDR, 2022)。

(2) 脛骨発生時における Bmi1 の局在の検索では、脛骨が形成される部位に間葉細胞の凝集を認め、周囲の細胞で散在性に Bmi1 の陽性反応が認められた。胎生 18 日では骨芽細胞および、その周囲の間葉細胞に Bmi1 反応が認められた。また、骨芽細胞分化マーカーとして知られている Runx2 および Osterix (Osx) 陽性細胞も間葉組織中にみられた(図 3C、D)。脛骨形成初期から Bmi1 陽性反応がみられ、脛骨が成熟するにつれて、陽性局在範囲の減少を認めた(図 3B)。また、Runx2、Osx 陽性細胞と Bmi1 陽性細胞の共局在が認められたことから、骨芽細胞分化過程において Bmi1 は新たな骨芽細胞分化因子となる可能性が示唆された。本研究結果は国際誌にて発表した(Takebe H et al., Anat. Rec., 2021)。

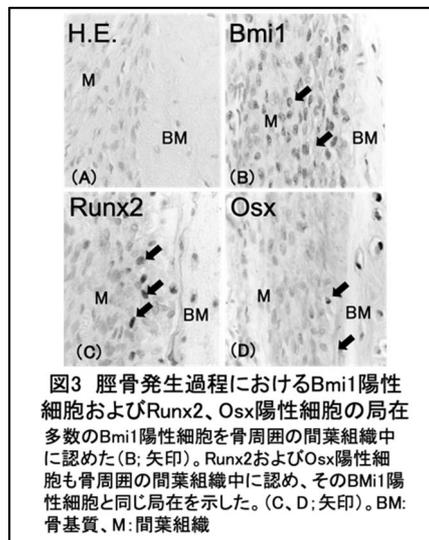


図3 脛骨発生過程におけるBmi1陽性細胞およびRunx2、Osx陽性細胞の局在。多数のBmi1陽性細胞を骨周囲の間葉組織中に認めた(B; 矢印)。Runx2およびOsx陽性細胞も骨周囲の間葉組織中に認め、そのBmi1陽性細胞と同じ局在を示した。(C、D; 矢印)。BM: 骨基質、M: 間葉組織

(3) 牽引側における歯根膜では、Gli1 陽性細胞が出現した(図 4A)。カルセイン投与による新生骨のラベリングを行なったところ、牽引側では厚いカルセイン沈着部位が認められたことから、歯槽骨の新生が認められた(図 4B)。また、新生骨中および表面には、骨芽細胞の分化マーカーである Osx 陽性細胞と Gli1 陽性細胞が多数認められた(図 4C)。さらに、骨基質中の多くの Gli1 陽性細胞が Osx 陽性細胞と同じ局在を示した(図 4C)。これらの結果は、歯根膜中の Gli1 陽性細胞が骨芽細胞に分化することを示している。本研究結果は、国際誌にて発表した(Seki Y, Takebe H et al., Bone, 2022)。

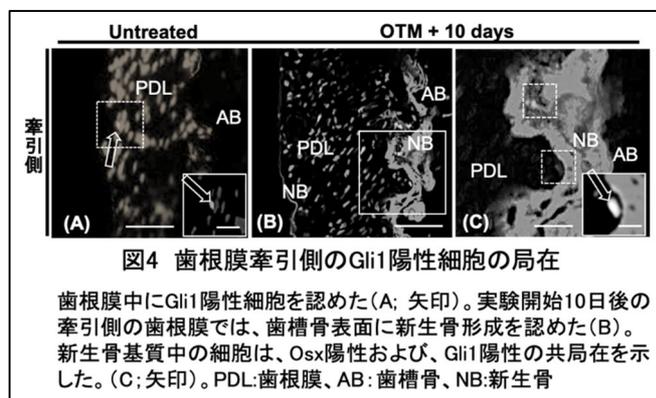


図4 歯根膜牽引側のGli1陽性細胞の局在

歯根膜中にGli1陽性細胞を認めた(A; 矢印)。実験開始10日後の牽引側の歯根膜では、歯槽骨表面に新生骨形成を認めた(B)。新生骨基質中の細胞は、Osx陽性および、Gli1陽性の共局在を示した。(C; 矢印)。PDL:歯根膜、AB: 歯槽骨、NB: 新生骨

< 引用文献 >

Horikiri, Y.; Shimo, T.; Kurio, N.; Okui, T.; Matsumoto, K.; Iwamoto, M.; Sasaki, A., Sonic hedgehog regulates osteoblast function by focal adhesion kinase signaling in the process of fracture healing. *PLoS One* 2013, 8, (10), e76785.

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 0件）

1. 著者名 Takebe Hiroaki, Irie Kazuharu, Hosoya Akihiro	4. 巻 305
2. 論文標題 Localization of Bmi1 in osteoblast lineage cells during endochondral ossification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 1112 ~ 1118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ar.24693	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 Akihiro Hosoya, Shalehin Nazmus, Hiroaki Takebe, Saki Fujii, Yuri Seki, Toshihide Mizoguchi, Tsuyoshi Shimo, Masahiro Iijima, Kazuharu Irie	4. 巻 62
2. 論文標題 Stem cell properties of Gli1-positive cells in the periodontal ligament.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of oral biosciences	6. 最初と最後の頁 299-305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.08.002	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 Shalehin N., Seki Y., Takebe H., Fujii S., Mizoguchi T., Nakamura H., Yoshida N., Yoshida K., Iijima M., Shimo T., Irie K., Hosoya A.	4. 巻 101
2. 論文標題 Gli1 ⁺ -PDL Cells Contribute to Alveolar Bone Homeostasis and Regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1537 ~ 1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345221106921	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuri Seki, Hiroaki Takebe, Toshihide Mizoguchi, Kazuharu Irie, Akihiro Hosoya
2. 発表標題 矯正学的歯の移動時においてGli1陽性歯根膜細胞は骨芽細胞に分化する
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuri Seki, Akihiro Hosoya, Nazmus Shalehin, Hiroaki Takebe, Toshihide Mizoguchi, Hideki Kitaura, Masahiro Iijima, Kazuharu Irie
2. 発表標題 Differential abilities of Gli1-positive cells in periodontal ligament during orthodontic tooth movement.
3. 学会等名 東京矯正歯科学会9th IOC
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 有里、建部廣明、北浦英樹、飯嶋雅弘、溝口 到、細矢明宏
2. 発表標題 矯正学的歯の移動時におけるGli1陽性歯根膜細胞の分化能
3. 学会等名 第79回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 有里、建部廣明、飯嶋雅弘、入江一元、細矢明宏
2. 発表標題 矯正学的歯の移動時におけるGli1陽性歯根膜細胞の組織学的解析
3. 学会等名 第39回北海道医療大学歯学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saki Fujii, Hiroaki Takebe, Tsuyoshi Shimo, Akihiro Hosoya
2. 発表標題 Lineage-tracing analysis of Gli1-positive cells in periodontal ligament after tooth extraction
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関 有里、建部廣明、溝口利英、入江一元、飯嶋雅弘、細矢明宏
2. 発表標題 矯正学的歯の移動時におけるGLI1陽性歯根膜細胞による歯槽骨形成
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	建部 二三 (TAKEBE Futami) (10534448)	北海道医療大学・歯学部・助教 (30110)	
研究分担者	志茂 剛 (SHIMO Tsuyoshi) (40362991)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	
研究分担者	入江 一元 (IRIE Kazuharu) (70223352)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	
研究分担者	細矢 明宏 (HOSOYA Akihiro) (70350824)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	

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