

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18462

研究課題名（和文）歯根嚢胞モデルマウスの確立と治療法開発に向けた発症・成長メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis and growth mechanisms for the establishment of periapical cyst model mice and the development of therapeutic methods

研究代表者

熊上 深香（坂野深香）（Kumakami, Mika）

岩手医科大学・歯学部・常任研究員

研究者番号：30710826

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：歯根嚢胞の上皮細胞は、ヘルトビッチ上皮鞘（HERS）あるいはマラッセ残存上皮（ERM）に由来すると考えられている。SemaphorinとTGF- β によるRhoシグナルを介したHERSの上皮間葉転換（EMT）とERM発生機構とさらに嚢胞発症との関連を調べた。その結果、Semaphorinは上皮性維持に働き、一方TGF- β はpartial EMTを誘導してERMの発生に働く。また移植実験ではHERSのEMTによって嚢胞形成や石灰化が誘因された。HERSの上記シグナルによるEMT制御機構の破綻が、歯根嚢胞・腫瘍の発生の一因にあると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根嚢胞は、慢性炎症に起因するヘルトビッチ上皮鞘（HERS）あるいはマラッセ残存上皮の増殖が原因と考えられており、根管治療が終了して数年後に発症することから歯科医師を悩ませる疾患である。歯根嚢胞が発症すると再度の感染根管処置や歯根端切除による嚢胞摘出術を施さねばならないが、嚢胞の消退や発症を予防するための薬剤は存在しない。本研究により、HERSの動態決定にはSemaphorinとTGF- β シグナルの下流のRhoによるEMT制御が重要であり、歯根嚢胞発症はこのシグナルの制御機構の破綻が原因だと考えられた。将来的にこれらのシグナルに対する分子標的薬が開発されれば、治療法の開発につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：Radicular cysts are thought to be odontogenic cysts caused by proliferation of Hertwig's epithelial root sheath (HERS) or epithelial rest of Malassez (ERM) due to chronic inflammation of the root apex. We sought to elucidate the mechanism of ERM development and the basis of cyst development via Rho signaling by semaphorin and transforming growth factor beta (TGF- β), which regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in HERS. The results showed that semaphoring signal plays a role of maintenance of epithelial morphology, while TGF- β induces partial EMT and ERM development. The disruption of EMT regulation of HERS may be associated with the development of cysts.

研究分野：口腔組織学

キーワード：ヘルトヴィッチ上皮鞘 マラッセ上皮遺残 細胞遊走 歯根形成 上皮間葉転換 partial EMT Rhoシグナル 歯根嚢胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯根嚢胞は、根尖の慢性炎症に起因したヘルトビツヒ上皮鞘 (Hertwig's epithelial root sheath : HERS) あるいはマラッセ残存上皮(Epithelial rest of Malassez : ERM)の増殖による歯原性嚢胞と考えられており、根管治療終了後、数年経過した後に発症することから歯科医師を悩ませている。歯根嚢胞が発症すると再度の感染根管処置や根尖部切除による嚢胞摘出術を施さねばならない。さらに嚢胞が大きい場合は、開窓処置を施して嚢胞の縮小を図るようなことも行われる。このように、外科的に除去する以外は根治的治療法がなく、嚢胞の消退や発症を予防するための薬剤は存在しない。歯根嚢胞が歯の根尖部の炎症に起因することから、過去に行われた研究の多くは、ケラチノサイトのような上皮細胞を用いて細胞の増殖や遊走性と IL-6 やプロスタグランディンなどの炎症性メディエーターとの関係を調べることが中心に行われているが、予防や治療法開発につながる研究はほとんど報告がない。そこで HERS や ERM の細胞特性に着目して、これらの細胞の特性と嚢胞発症の潜在的原因の関連性を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

- (1) 「なぜ、歯原性上皮細胞は他の上皮細胞と比べて嚢胞を発症しやすいのか」という疑問を解決する目的で、HERS から ERM が発生する分子機構を解明することでこれらの細胞特性を明らかにしていく。

歯根嚢胞の発症をホスト側の HERS あるいはマラッセ残存上皮(Epithelial rest of Malassez : ERM)の細胞特性と嚢胞発症に至る細胞の変化に着目した。歯冠形成終了後、エナメル器から発生したヘルトビツヒ上皮鞘 (Hertwig's epithelial root sheath : HERS) は、歯根象牙質の形成を誘導する。歯根形成中の HERS は増殖と伸長を繰り返しながらも歯冠側では断裂を引き起こし、マラッセの上皮遺残 (epithelial rests of Malassez : ERM) を形成する。ERM 形成のメカニズムとして、HERS の上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) が深く関わっていると考えられているが、EMT を制御する分子機構は明らかでない。一方で HERS が上皮として維持されるメカニズムについても不明である。そこで本研究では、ERM 発生と HERS 維持との関係を制御する分子機構の一端を明らかにすることを目的として、細胞骨格制御に関わる Rho シグナルに着目し、Semaphorin (Sema) と transforming growth factor beta (TGF- β) による Rho シグナルを介した ERM 発生機構を解明する。その結果をもとに上記の疑問点を考察する。

- (2) 「嚢胞が形成される過程によって HERS あるいはマラッセ残存上皮の細胞にどのような変化が生じているか」である。本来もっている細胞特性に加えて、炎症などの周囲環境が細胞にどのような変化を引き起こさせて、嚢胞を形成するようになるのか、である。この原因が解明されれば、嚢胞発症の治療法が見いだせると考えている。Sema シグナル、TGF- β シグナルを介した Rho シグナルの破綻が細胞に与える影響を解明して、嚢胞発症との関係を考察する。

- (3) 「その内容物を内腔に分泌あるいは輸送している分子メカニズムは何か」である。この分泌や輸送のメカニズムは、まさに嚢胞成長の原因の一端を担っており、このメカニズムの機能抑制が嚢胞の成長を止めることができるはずである。歯根嚢胞モデルマウスにおいて嚢胞腔内の物質を同定してその分泌・細胞内輸送メカニズムを明らかにする。またエナメル上皮細胞株 (mHAT9d) と比較しながら、嚢胞上皮細胞の細胞膜に存在するポンプやチャネル、イオントランスポーターなどの発現を網羅的に解析して、内腔への物質輸送の全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 歯根形成過程の 3 次元的観察

HERS と ERM を観察するために、生後 10 日の CK14cre/R26-tdTomato mouse の下顎第二臼歯を採取し、実体顕微鏡下で観察した。

- (2) HERS と ERM 形成過程の細胞特性を比較するため、生後 10 日のマウス下顎第二臼歯の前頭断面の歯根成長領域において、cytokeratin 14 (CK14)・E-cadherin の発現、さらに生後 11 日のマウスの下顎第一臼歯における Sema4A・Sema4D および活性型 RhoA の発現を免疫組織化学的に解析した。また HERS における TGF- β の発現、phosphorylated Smad2

(pSmad2) および phosphorylated Smad3C (pSmad3C) を免疫組織化学的に分析した。また TGF- β が HERS01a のリン酸化を誘導するか検証するために、pSmad2 の免疫蛍光染色を行った。

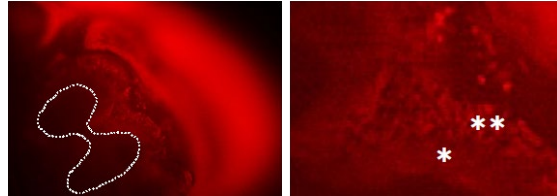
- (3) Sema4A, Sema4D, TGF- β が RhoA 活性化に与える影響を検証するために、HERS01a

(HERS 細胞株) における Sema4A, Sema4D, TGF- β 存在下の活性型 RhoA と E-cadherin の発現を免疫蛍光染色で調べた。また同条件における RhoA の活性化レベルを ELISA 法にて定量解析した。

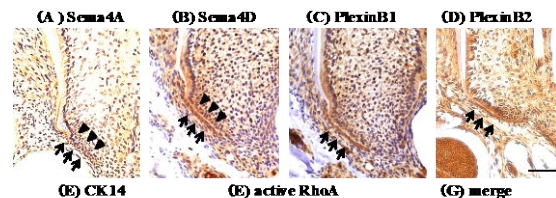
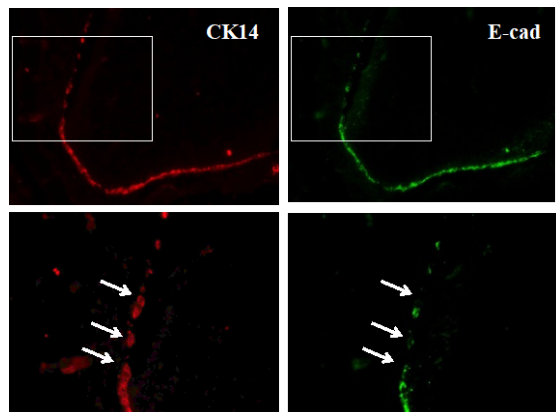
- (4) Sema4A・Sema4D・TGF- β による細胞動態を調べるため、HERS01a の遊走性試験を行った。
- (5) tDTomato (赤色蛍光) を発現する新たな HERS 細胞株 HERS02T を樹立してマウス頭部下に移植して HERS 由来の嚢胞形成モデルを作製して、嚢胞の発症と HERS 細胞動態変化を調べた。

4. 研究成果

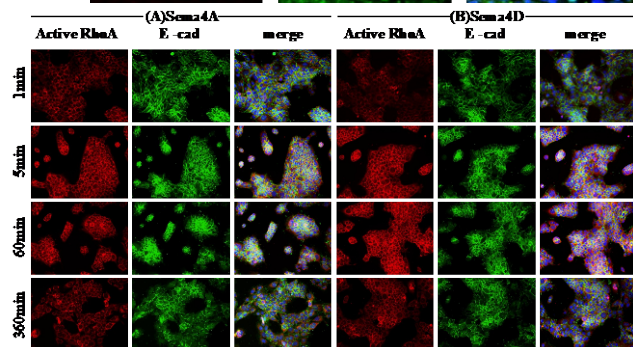
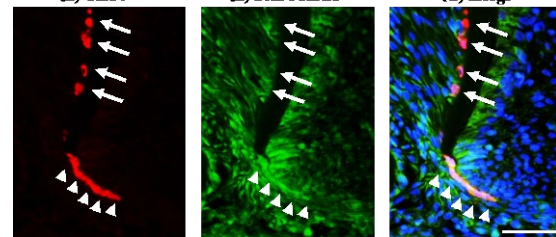
- (1) 歯根発生期を実体顕微鏡で根尖側から観察すると HERS は発達途中の歯根を囲むように帯状(*)に存在し、上皮の連続性を認めた。一方 HERS の歯冠側には Tomato 陽性細胞が散在している(**)のが観察された。



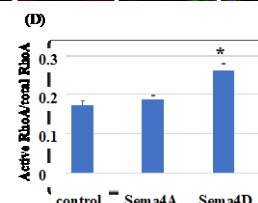
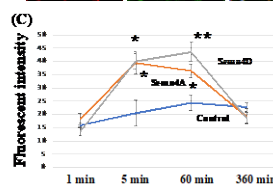
- (2) 歯根形成期の HERS は CK14 と E-cadherin を強く発現していた。一方 HERS 歯冠側の細胞および HERS から離れた細胞(矢印)は、CK14 を発現していたが E-cadherin を発現していなかった。HERS 細胞は Sema4A・Sema4D およびその受容体 PlexinB1・PlexinB2 を発現していた。PlexinB1・PlexinB2 は HERS 先端で強く検出され、HERS に隣接する歯乳頭細胞では Sema4A・Sema4D の発現が観察された。また、HERS では活性型 RhoA が高発現しており(矢頭)、CK14 と共発現していた。HERS から離れた CK14 陽性細胞(矢印)では、活性型 RhoA の発現が減少していた。TGF- β は歯周組織全体で観察され、特に HERS の歯冠側に隣接する歯乳頭細胞でその発現が顕著であった。また、HERS 歯冠側の細胞核には pSmad2 と pSmad3C が高発現しており、TGF- β の発現と Smad のリン酸化との関連性が示唆された。HERS01a においても TGF- β は Smad2 のリン酸化を誘導すると同時に細胞質から核への移動を促した。



- (3) HERS01a において、Sema4A または Sema4D を 5-60 分間処理すると活性型 RhoA の発現が上昇した。ELISA の解析から、HERS01a を Sema4D で処理すると RhoA 活性が顕著に上昇した。HERS01a における免疫蛍光染色により TGF- β と Rho-associated protein kinase 阻害剤 (Y27632) 存在下では、活性型 RhoA と E-cadherin の発現が減少した。ELISA の解析から TGF- β ・Y27632 処理により Rho の活性が低下することが示された。



- (4) 遊走性試験の結果から、TGF- β は HERS01a の遊走を活発に誘導した。一方で Sema4A・Sema4D は細胞間接着を維持した状態で遊走する様子を示した。



- (5) 赤色蛍光 (tdTomato) 発現 HERS の細胞株 HERS02T を作製した。この細胞株を Rho キナーゼ抑制剤で処理してマウスに移植すると、石灰化を伴う嚢胞 (腫瘍) 様構造物を作ることを見いだした。また現在 HERS02T の発現遺伝子を網羅的に解析中である。

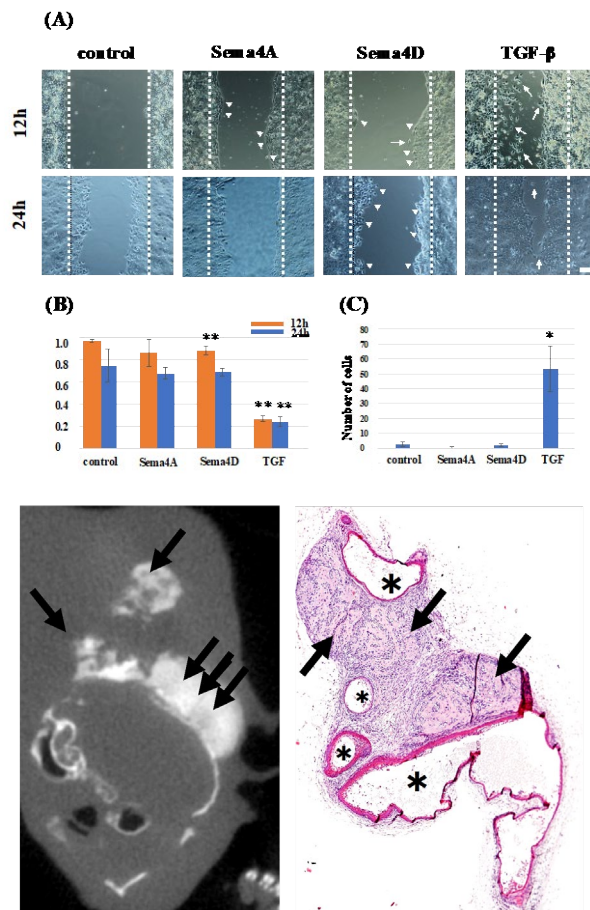
考察

本研究では、ERM の発生と HERS の維持との関係を制御するメカニズムについて検討した。Sema4A・Sema4D とその受容体および活性型 RhoA の発現パターンを分析すると、HERS の根尖側で Sema4A・Sema4D および活性型 RhoA の発現上昇が認められた。Sema4A・Sema4D は HERS01a における Rho の活性を上げ、EMT を抑制して細胞が離脱することを抑制したことから、Semaphorin-RhoA シグナルは HERS の上皮維持に働いていることが示された。また、遊走性試験においては HERS01a が細胞間接着を維持しながら移動していく様子が観察され、collective cell migration の動態が HERS 維持と増殖伸長に寄与していると考えられた。

一方、歯冠側 HERS では活性型 RhoA の発現が弱い傾向にあった。また TGF- β は HERS 歯冠側に隣接する歯乳頭細胞で顕著に発現を認めた。さらに歯冠側の HERS 細胞核でリン酸化した Smad2 および Smad3C が検出されたことから、歯冠側においては TGF- β シグナルが亢進している。この HERS 歯冠側の細胞の中には CK14 に陽性でありながらも E-cadherin に陰性を示す細胞が存在している。また、遊走性試験においては、HERS01a が線維芽細胞様の変化を伴いながら遊走することが示された。したがって HERS 歯冠側の細胞では、TGF- β シグナルにより partial EMT が誘導され、細胞の遊走性が亢進していると考えられる。

さらに、HERS02T の Rho シグナルを抑制して EMT を誘導した上でマウス頭部に移植すると嚢胞形成や石灰化を引き起こすことが示され、HERS の細胞動態が歯根嚢胞の発症の病因になることが実験で示されたと考える。

以上の結果から、HERS の細胞動態は Semaphorin シグナルと TGF- β シグナルの相反する作用によって制御されている。Semaphorin は HERS が一定の長さや形態を維持することに働き、一方 TGF- β は partial EMT を誘導し ERM の発生に働く。今回の研究結果による HERS の制御メカニズムから推測すると、歯根の形態異常や嚢胞・腫瘍の発生には、HERS の上皮性維持と EMT とのバランスの破綻が一因にあると考えられた。将来的にこれらのシグナルに対する分子標的薬が開発されれば、上記疾患の治療法の開発につながると思われる。



HERS02Tを移植した歯原性嚢胞モデルの μ CT像と組織切片を示す。矢印は石灰化している部位、*は嚢胞を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Marii Azumane, Shojiro Ikezaki, Keishi Otsu, Mika Kumakami-Sakano, Haruno Arai, Hiroyuki Yamada, Paivi Kettunen, Hidemitsu Harada	4. 巻 58(1)
2. 論文標題 Semaphorin-RhoA signaling regulates HERS maintenance by acting against TGF-β-induced EMT	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 184-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.13080	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東根まりい, 池崎晶二郎, 熊上深香, 稲葉陽, 荒井春乃, 山田浩之, 大津圭史, 原田英光
2. 発表標題 セマフォリンシグナルは, 上皮間葉転換を抑制することでHertwig上皮鞘を維持している
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	原田 英光 (Harada Hidemitsu)		
研究協力者	大津 圭史 (Otsu Keishi)		
研究協力者	池崎 晶二郎 (Ikezaki Shojiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	東根 まりい (Azumane Marii)		

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