

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23023

研究課題名（和文）矯正の歯の移動に寄与する歯根膜幹細胞の新規同定法の開発

研究課題名（英文）Identification of periodontal ligament stem cells contributing to the orthodontic tooth movement

研究代表者

水越 優（Mizukoshi, Masaru）

新潟大学・歯学部総合病院・医員

研究者番号：20882731

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：矯正力の負荷によりマウス臼歯歯根膜組織中の増殖期細胞は一時的に増加し、増殖活性の変化は組織全域に認められた。またRGBowを用いた細胞追跡実験において、増殖活性を示す細胞クラスターの形成も組織全域に認められた。さらに増殖期細胞は種々の分化マーカーを発現し、多様な細胞群から構成されていた。

本研究により、機械的刺激の負荷されたマウス臼歯歯根膜の細胞供給は特定の細胞が担うのではなく、多様な細胞が担っていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が示した歯根膜細胞の力学的刺激に対する特性は、歯科臨床における組織恒常性の理解と、革新的な治療法の開発における基礎的知見として極めて意義の高いものである。

研究成果の概要（英文）：Proliferating cells in the periodontal ligament temporarily increased with orthodontic force, and changes in proliferative activity were observed throughout the tissue. In cell tracking experiments using RGBow, clusters of proliferatively active cells were formed throughout the tissue. Furthermore, proliferating cells expressed various differentiation markers and were composed of diverse cell groups.

This study indicates that the cellular supply of the mouse molar periodontal ligament under mechanical stimulation is not carried by specific cells, but by a variety of cells.

研究分野：歯科矯正学分野

キーワード：歯根膜 増殖活性 幹細胞 矯正の歯の移動

1. 研究開始当初の背景

矯正力による歯根膜組織改変に寄与する組織幹細胞

歯根膜は歯と歯槽骨を結合する線維性結合組織であり、豊富な細胞成分を含む。歯根膜は咬合機能に重要なだけでなく、力学的刺激に鋭敏に反応する細胞特性により、矯正歯の移動を可能にしている。適正な矯正力は圧迫側における骨吸収と牽引側における骨添加を亢進することにより、歯の移動を可能にしていると考えられているが、その際の細胞動態、中でも幹細胞の局在と細胞供給の詳細は依然として不明である。幹細胞の同定には幹細胞マーカーを使用した検出方法が一般的であるが、歯根膜については未だ絶対的な幹細胞マーカーは存在しない。したがって、歯根膜における組織幹細胞の解析には、特定の幹細胞マーカーに依存しない方法の開発が必要であると考へた。

幹細胞の分化過程における細胞増殖特性の変化

一般に生理的条件下の幹細胞の組織中での増殖活性は極めて低い。しかしマウス切歯の基部に存在する幹細胞は、非対称性分裂により幹細胞を維持しながらも、活発な増殖活性を示す Transit-amplifying cell(TAC)を産生し、組織構成細胞の供給を行っている。このようにマウス切歯では、極めて増殖活性の低い組織幹細胞が、必要に応じて細胞増殖活性の高い TAC を生み出す組織代謝メカニズムが存在する(図 1)。そこでこの細胞増殖活性の違いにより、歯根膜の組織幹細胞を、細胞マーカーに依存しない方法で検出できるのではないかと着想した。

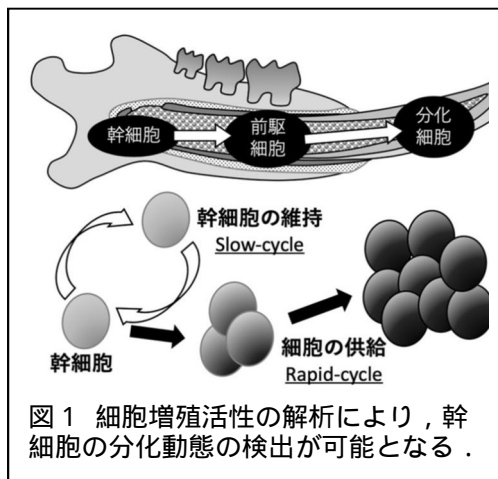


図 1 細胞増殖活性の解析により、幹細胞の分化動態の検出が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、矯正力による歯根膜組織改変に寄与する組織幹細胞を、細胞増殖活性の変化に基づく方法により検出し、その存在および分化挙動を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

矯正力に誘導される高増殖活性細胞(TAC)の検出と特性解析

矯正歯の移動モデルにより、歯根膜中に増殖細胞を誘導する。増殖細胞における TAC マーカーならびに分化マーカーの発現により特性解析を行い、TAC を特定する。

歯根膜の組織幹細胞に由来する細胞クラスターの分化軌跡解析

全ての細胞を3色の蛍光によりランダムに標識可能な RGBow: UBC-CreERT² マウス(以下 RGBow マウス)を用い、細胞のクラスター解析を行う。RGBow マウスでは細胞分裂によって生み出される全ての娘細胞が母細胞と同じ色の蛍光を発現することから、幹細胞に由来する細胞群の特定と局在、長期追跡による分化軌跡解析を可能とする。

4. 研究成果

矯正歯の移動中の増殖細胞の変化

マウス臼歯歯根膜細胞の増殖活性は、ヒトと同様に生理的条件下では極めて低い。マウス臼歯歯根膜における細胞の増殖活性を明らかにするために、コイルにより一定の機械的負荷で組織のリモデリングを促進する矯正歯の移動(OTM: Orthodontic tooth movement)モデルを用いた(図 2 a)。コントロール群では、第一臼歯と第二臼歯の距離は $0.0 \pm 0.0 \mu\text{m}$ であった。1週間後と2週間後にはそれぞれ $95.0 \pm 52.0 \mu\text{m}$ と $238.6 \pm 83.0 \mu\text{m}$ ($n = 5$) に増加した(図 2 b, c)。第一臼歯が近心に移動することにより、歯根の近心側歯根膜が圧迫され、遠心側歯根膜が牽引されていることが確認された。本研究ではマウス上顎第一臼歯遠心根遠心側歯根膜を観察領域とした(図 2 b, 白枠)。

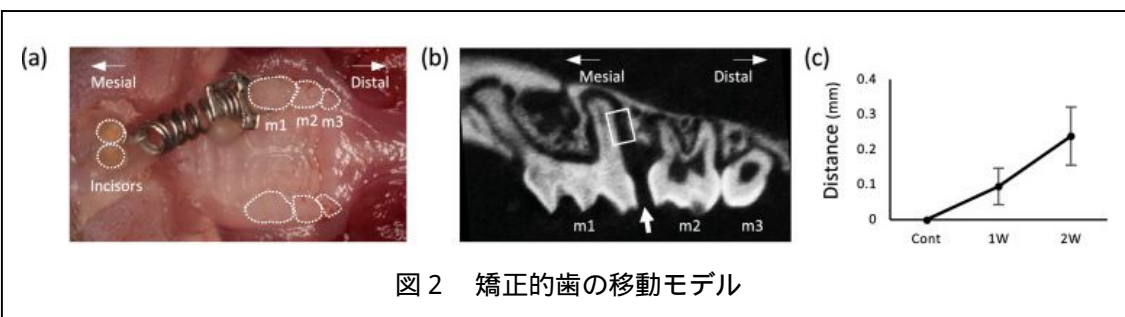


図 2 矯正歯の移動モデル

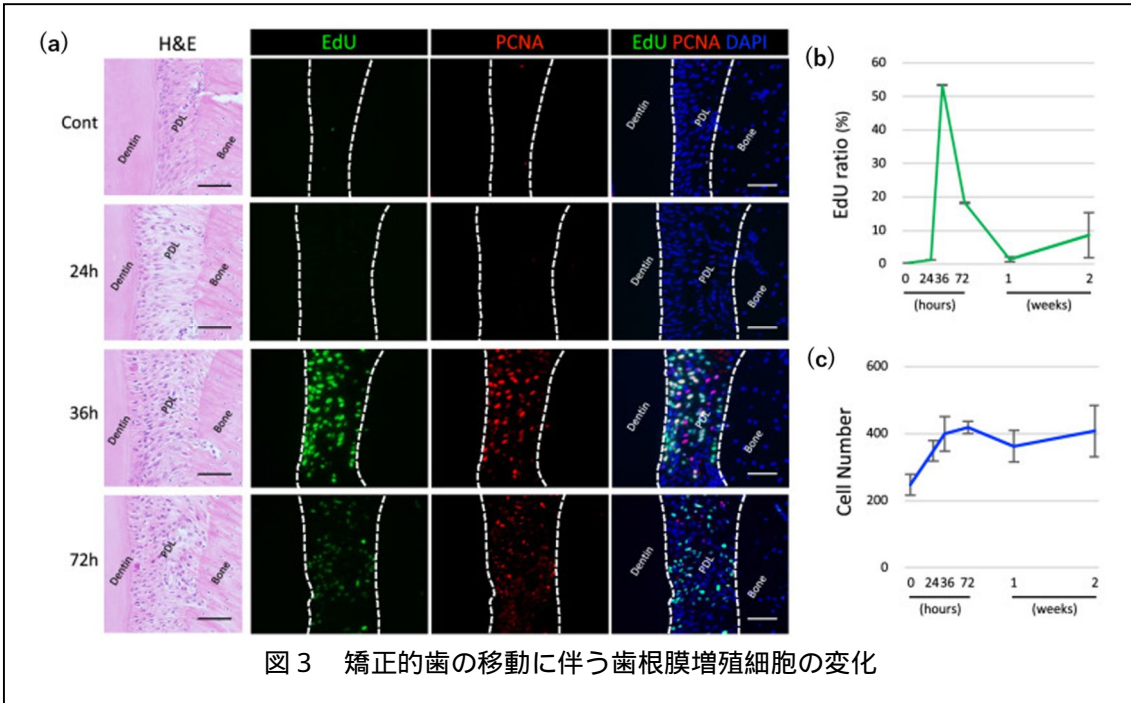


図3 矯正歯の移動に伴う歯根膜増殖細胞の変化

ヘマトキシリンエオジン(H&E)染色により、歯根膜線維の伸展はOTM開始24時間という早い段階で検出可能であった。歯根膜細胞のうち増殖している細胞は、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) の取り込みとPCNA抗体を用いて検出した(図3a)。EdU陽性細胞はコントロール群ではほとんど検出されなかったが、OTM36時間後には指数関数的に増加し、その後時間経過とともに減少した(n=3)(図3b)。PCNA陽性細胞も同様の傾向を示したが、36時間後の重ね合わせ画像に示すようにEdU陽性細胞と完全に重なることはなかった。増殖細胞は歯根膜内に均一に分布し、血管や石灰化組織境界などの構造的な特徴との関連は観察されなかった。さらにOTMによる増殖細胞の増加と関連して歯根膜中の総細胞数は増加していた(n=3)(図3c)。

矯正歯の移動中の増殖細胞の特性

OTMによって歯根膜に誘導された増殖細胞の特性を明らかにするために、免疫組織化学染色によって各種細胞マーカーの発現を解析した(図4)。歯根膜幹細胞はGli1、TACsはRing1b、歯根/歯根膜形成細胞はNfic、Cbfa1、Osxにより検出した。図4に、OTM36時間後のそれぞれの抗体に対する陽性細胞(赤)と増殖細胞(緑)の代表的な画像を示す。OTM36時間後、歯根膜細胞全体に占めるマーカー陽性細胞の比率を解析したところ、コントロール群(n=3)と比較して有意な差は認められなかった。さらに、EdU陽性の増殖細胞にお

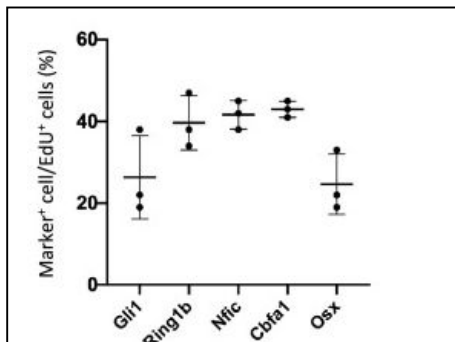


図5 矯正歯の移動に伴う歯根膜増殖細胞の変化

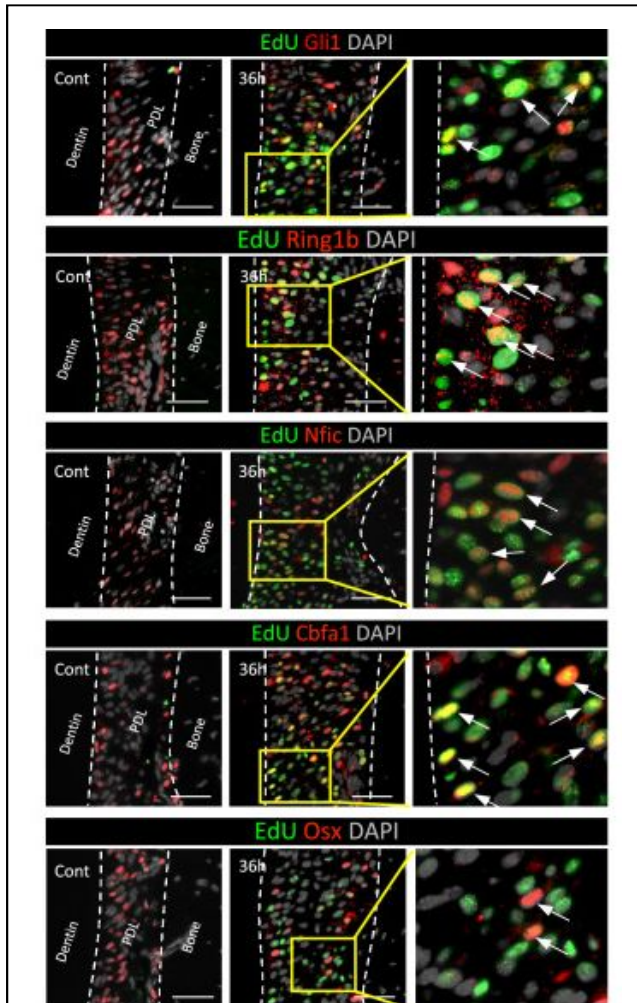


図4 矯正歯の移動中の増殖細胞の特性

けるマーカー陽性細胞の比率は多様であり，増殖細胞は幅広い種類の細胞から構成されていることが示唆された ($n = 3$) (図 5)。

矯正の歯の移動に誘導された増殖細胞の追跡

RGBow: UBC-CreERT2 (RGBow) マウスを用いて、*in vivo* で細胞クローン解析を行った。このマウスでは，すべての細胞がタモキシフェン誘導性でランダムに 3 種類の蛍光プローブを発現する (図 6 a)。8 週齢の RGBow マウスに OTM を開始し，OTM の 3 日前にタモキシフェンを腹腔内注射した。2 週間の OTM 後，2 週間追跡してクラスター形成を組織学的に分析した (図 6 b)。単一細胞由来の細胞群を 3 色の擬似カラー (赤、緑、青) で可視化した。各クラスター内の細胞数は，OTM によって 1.5 ± 0.9 から 2.2 ± 1.6 へと有意に増加し，OTM に誘導された増殖細胞のさらなる分裂が確認された ($n = 3$) (図 6 d)。増殖細胞の分布と同様に，歯根膜内では単一細胞由来のクラスターが非特異的に分布していることが確認された。また細胞クラスターは歯根膜コラーゲン線維の方向に沿って成長する傾向があった。

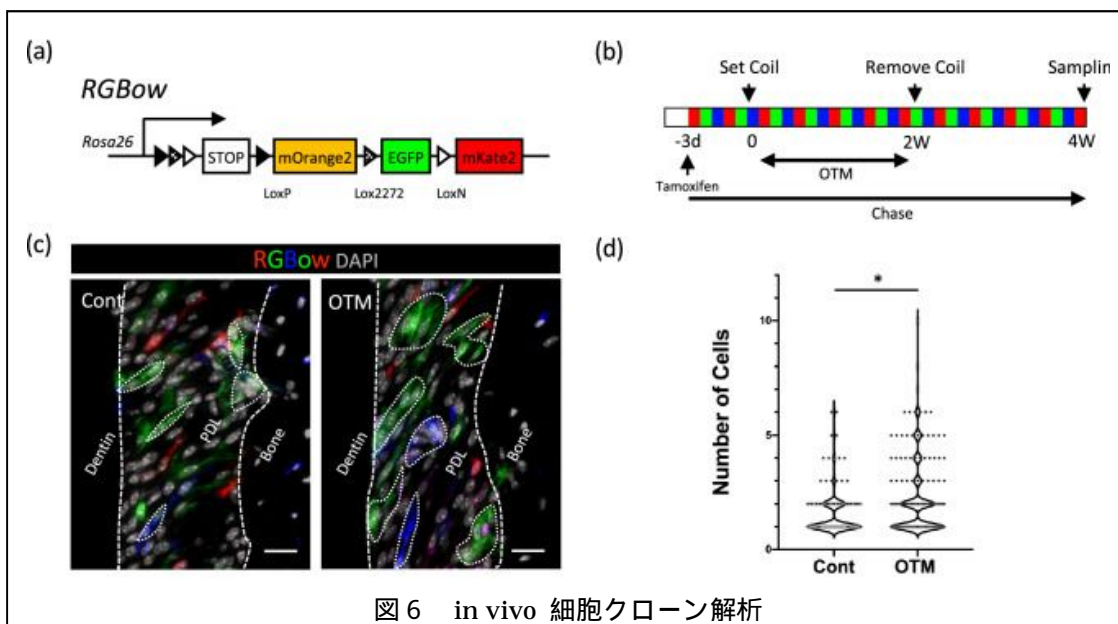


図 6 *in vivo* 細胞クローン解析

考察

細胞増殖は、組織リモデリングの初期段階で起こり，細胞供給の維持に重要な役割を果たす。機械的負荷条件下での細胞増殖の促進はこれまでも報告されているが，どの細胞が増殖能を獲得するのか，またその細胞の起源は不明なままであった。本研究で，OTM 後 36 時間で増殖細胞が指数関数的に増加することを明らかにした。OTM によって誘導された増殖細胞は歯根膜全域に出現し，幹細胞が存在するとされる血管近傍との相関は認められなかった。さらに，RGBow マウスの単一細胞由来のクラスターは増殖した細胞の娘細胞であるが，特異的な分布パターンを示さなかった。OTM に誘導された増殖細胞は，TAC マーカーである *Ring1b* をはじめ，*Gli1*，*Nfic*，*Cbfa1*，*Osx* など様々な分化マーカーを発現していた。これらの結果や，様々なマーカーが歯根膜組織に均一に分布・発現していることから，OTM 誘導増殖細胞は特定の細胞種や場所から発生するものではないことを示唆していた。

本研究により，歯根膜細胞が機械的負荷に応答し，その増殖状態が劇的に変化することを示されたが，マウス切歯で確認されているような低増殖活性の MSCs から高い増殖活性を示す TACs への移行は検出されなかった。一方，増殖細胞は歯根膜全域で様々な細胞から発生していると考えられることから，歯根膜細胞の分化可塑性を有していることが示唆された。

本研究では，機械的負荷による組織リモデリング中のマウス臼歯歯根膜における増殖細胞の解析を行った。その結果，機械的刺激が歯根膜全域での増殖細胞の増加を起し，増殖した細胞が組織リモデリングに寄与していることが示唆された。さらにこれらの知見は，*in vivo* における歯根膜細胞の分化可塑性を示唆するものであった。今後さらなる研究が必要であるが，本研究成果により機械的負荷条件下におけるマウス臼歯歯根膜の細胞分化軌跡の一部を明らかにすることが出来た。このような細胞動態の理解は，臨床的に組織恒常性の維持を考慮する際や，革新的な再生戦略を開発するために極めて重要であると考えている。

引用文献

Mizukoshi, M., Kaku, M., Thant, L., Kitami K, Arai M, Saito I, Uoshima K: *In vivo* cell proliferation analysis and cell-tracing reveal the global cellular dynamics of periodontal ligament cells under mechanical-loading. *Sci Rep* 11, 9813, 2021.

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 Mizukoshi Masaru, Kaku Masaru, Thant Lay, Kitami Kohei, Arai Moe, Saito Isao, Uoshima Katsumi	4. 巻 11
2. 論文標題 In vivo cell proliferation analysis and cell-tracing reveal the global cellular dynamics of periodontal ligament cells under mechanical-loading	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89156-w	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 Masaru Mizukoshi, Masaru Kaku, Kohei Kitami, Moe Arai, Katsumi Uoshima, Isao Saito
2. 発表標題 Characterization of Label Retaining Cells in Periodontal Ligament
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress
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
---------	---------