

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32710
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592491
 研究課題名（和文） 歯牙形態保持因子の解明および発現の解析と再生歯牙への応用
 研究課題名（英文） The investigation of factors related to odontoblast differentiation and morphology preservation, and analysis of expression
 研究代表者
 藤原 久子（HISAKO FUJIHARA）
 鶴見大学・歯学部・助教
 研究者番号：80396746

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯牙の形態保持および間葉系幹細胞の分化において Parp-1 の発現の関与を示唆する結果を得た。マウスの歯牙を経時的に解析した結果、Parp-1 欠損と老化の 2 つの因子が組み合わさると、歯牙内部の形態異常を引き起こすことが分かった。さらに、in vitro において、間葉系幹細胞を骨細胞へ分化誘導したところ、Parp 活性を阻害した細胞群においては骨細胞への分化が認められなかった。

研究成果の概要（英文）：In this report, Parp-1 was suggested to involve in odontoblast/osteoblast differentiation from mesenchymal stem cell (MSC) and factors related to morphology preservation. Through the time course analysis of mice teeth, dysplasia and malformation inside the teeth were found based on the two factors – Parp-1 deficiency and aging. In vitro differentiation inducement from MSCs, odontoblast and osteoblast differentiation was not observed under the inhibition of Parp activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学、ポリ ADP-リボシル化反応、

1. 研究開始当初の背景

近年の歯科医療の発達や「8020 運動」などの予防歯科の啓蒙により、わが国における歯の喪失率は著しく減少したものの、依然として、う蝕、歯周病、外傷や先天性疾患に起因する歯牙欠損を認めることは少なくない。歯牙欠損は、発音・咀嚼などの機能面や審美面で支障をきたすのみならず、精神面での苦痛を伴うこともあるため、失

われた歯を補う優れた治療法の開発は、歯科界に課せられた永遠のテーマであるともいえる。現在臨床で広く用いられている義歯・ブリッジ・デンタルインプラントなどの補綴療法では、十分に満足いく機能や審美的回復が達成出来ないこともあるため、従来法を凌駕する新たな治療法として、歯牙再生医療の発展に期待が寄せられている。元来歯牙は、外胚葉系のエナメル質なら

びに間葉系の象牙質、歯髄、セメント質、歯根膜が複雑且つ精巧に組み合わされて構築されており、細胞から再生することが非常に困難な組織に位置づけられている。しかし近年になって、ブタ歯胚から単離した上皮系ならびに間葉系の細胞を担体と共にラットへ移植することにより、エナメル質様・象牙質様・歯髄様・セメント質様組織を含有する歯牙様構造物を形成することに成功したという報告がなされ、大きな話題となった (Young et al. J Dent Res 2002)。

更に別の研究グループも、マウス胎仔の歯胚由来上皮系細胞と間葉系細胞をコラーゲンゲルに混和し培養することにより、in vitro で再生歯牙を作製することに成功しており (Nakao et al. Nat Method 2007)、歯牙再生医療の臨床応用への現実味が増してきている。しかし、これらの再生歯牙においてエナメル質や象牙質などの歯牙様構造物が認められとはいえ、歯冠や歯根の形態、構成要素の厚みや位置関係などの制御はなされておらず、天然歯と同等の肉眼的・組織学的形態を有する歯牙の再生には至っていない。従って、臨床応用可能な歯牙再生の実現化に向けて、歯牙形成時の細胞配列や細胞分化の制御メカニズムを明らかにすると共に、その知見を歯牙再生医療に反映させる方法の確立が必要である。

Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) 遺伝子は、遺伝子安定性や細胞死誘導、細胞間シグナル、DNA 修復、テロメアの安定性や細胞増殖・分化など、多種多様な生命現象に関与している遺伝子である。*Parp-1*^{-/-} ES 細胞をヌードマウスに皮下注射して腫瘍形成させたところ、ES 細胞からは分化することはあり得ない trophoblast が認められたことから、*Parp-1* の分化への関与が示唆された (Nozaki et al. PNAS 1999)。従って、未分化で増殖能が高い細胞では、*Parp-1* の欠損によって細胞分化に異常をきたすことを予想し、歯髄由来細胞から構成される歯牙の精査を行った。その結果、老化した *Parp-1* ノックアウトマウスの切歯に、ワイルドタイプのマウスには認められない歯根形態の異常、象牙芽細胞・セメント芽細胞の配列不正、髄腔内の象牙芽粒などの歯牙異常を認めることが分かった。

2. 研究の目的

Parp-1 遺伝子の欠損でこのような歯牙の形態異常や形成不全を生じることから、*Parp-1* 遺伝子により誘導される因子が、歯牙の細胞配列や細胞分化の制御に関与している可能性があるとして推測される。そこで本申請では、*Parp-1* ノックアウトマウスおよび野生型マウスの歯牙形態を経時的に比較

検証するとともに、発現している歯牙関連因子を in vitro/in vivo で検索した。それにより、歯牙構造の形成・維持に関与している因子を検索し、将来的にその機能を明らかにすると共に、その知見を再生歯牙の作製に反映させることにより、再生歯牙医療の発展に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) *Parp-1* ノックアウトマウスの歯牙の経時的形態変化の追跡：*Parp-1* 遺伝子型の違による歯牙形態の変化について、組織学的・三次元構造的な検討を行った。

① 国立がんセンター研究所生化学部において開発した *Parp-1* ノックアウトマウスの供与を受け、2系統のマウス (ICR/129Sv mixed genetic background と C57BL/6) での *Parp-1* ノックアウトマウスを作製した。
② 組織学的・三次元構造的解析：得られた *Parp-1* ノックアウトマウスと通常のマウスにおいて、歯牙形態を組織学的・形態学的に経時的評価を行った。評価時期は 16 週令時・41 週令時・110 週令時とした。歯牙形態の三次元的構造を解析するために、動物用マイクロ CT (GE Healthcare 社) で頭部のスキャンを行った。CT 画像は DICOM データとして保存し、三次元構築ソフトを用いて骨バージョンでの三次元構築を行った。3次元構築された画像をスクリーン上で前頭断方向にスライスし、歯牙形態の構造解析を行った。

③ *Parp-1* ノックアウトマウスの形態異常を起こした歯牙の組織学的検討を行い、通常のマウスとの比較を行った。HE 染色・トルイジンブルー染色を行い歯牙形態の特性・象牙芽細胞配列について比較検討した。次に Parp 抗体で免疫染色を行い、歯牙組織内における Parp の局在を調べた。

(2) 骨髄由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) における骨形成因子の発現解析

① マウス大腿骨骨髄より、通法通りに間葉系幹細胞を採取し、 α -MEM, FBS, アスコルビン酸 2リン酸とグルタミン・抗生剤を添加した培地で培養した。

② 次に骨形成細胞への分化誘導：BMP・デキサメタゾン添加培地を用いて行い、Parp 阻害剤の有無による分化誘導の変化を調べた。細胞を継代する毎に、それぞれの passage において、分化誘導を行った。経時的に 0W, 1W, 2W, 3W, 4W と 1 週間ごとに von Kossa 染色を行うとともに細胞より RNA の抽出を行った。

③ RNA を調整し、cDNA の作製とリアルタイム PCR を行い、Parp 阻害剤の有無による細胞の分化レベルへの関与を調べた。

4. 研究成果

(1) *Parp-1* ノックアウトマウスの歯牙の経時的形態変化の追跡:

Age	ICR/129Sv			C57/BL6
	16W	41W	110W	80-118 W
<i>Parp-1^{+/+}</i>	5	5	13	6
<i>Parp-1^{+/-}</i>	0	0	0	4
<i>Parp-1^{-/-}</i>	5	7	9	10

① マウス頭部をマイクロ CT 撮影を行い、*Parp-1* 遺伝子欠損の有無による歯牙構造形態の変化を経時的に観察した。実験に用いたマウスの内訳を上に表示するように、ICR/129Sv と C57BL/6 の 2 系統のマウスを用いた。

② ICR/129Sv マウスの系時的解析

ICR/129Sv マウスの解析の系時的解析を行った。16 週令および 41 週令のマウスに

Genotype	No. of animals	Incidence (%)	
		Denticle	Dysplasia
<i>Parp-1^{+/+}</i>	13	* 4 (30.8)	* 4 (30.8)
<i>Parp-1^{-/-}</i>	9	8 (88.9)	9 (100.0)

おいては、*Parp-1^{+/+}* および *Parp-1^{-/-}* ともに、マウスの歯髓内の形態変化は認められなかった。次に 110 週令のマウスの歯牙形態の変化を解析したところ、*Parp-1^{+/+}* マウスでは 13 匹中 4 匹 (30.8%) に歯髓内の石灰化物が認められたのに対し、*Parp-1^{-/-}* マウスでは 9 匹中 8 匹 (88.9%) に歯髓内の石灰化物が認められた。また、歯髓腔内の形態変化 (dysplasia) は *Parp-1^{+/+}* マウスでは 13 匹中 4 匹 (30.8%) に認められたのに対し、*Parp-1^{-/-}* マウスでは 9 匹中 9 匹 (100%) に認められた。発症率について統計学的検証を行ったところ、*Parp-1^{-/-}* マウスにおける歯髓内石灰化物および形態変化の発症率は、*Parp-1^{+/+}* マウスに比較して有意に増加していた。両 genotype ともに、歯牙外形の変化は認めら

れなかったことから、*Parp-1* は歯髓内の幹細胞が象牙芽細胞へ分化する際の分化機構に関与していることが示唆された。

③ C57BL/6 マウスの解析

C57BL/6 における老化マウスの歯牙形態の解析を行った。*Parp-1* の遺伝子型に関らず、歯牙外形の形態変化は認められなかった。

genotype	No. of animals	Incidence (%)	
		Dysplasia	Denticle
<i>Parp-1^{+/+}</i>	6	* 2 (33.3)	* 2 (33.3)
<i>Parp-1^{+/-}</i>	4	1 (25.0)	0 (0.0)
<i>Parp-1^{-/-}</i>	10	9 (90.0)	7 (70.0)

*p = 0.018, **p = 0.152

歯髓内の石灰化物の発症率については、*Parp-1^{+/+}* マウスでは 6 匹中 2 匹 (33.3%)、*Parp-1^{+/-}* マウスでは 4 匹中 0 匹 (0%)、*Parp-1^{-/-}* マウスでは 10 匹中 7 匹 (70%) に認められた。また、歯髓内の dysplasia については、*Parp-1^{+/+}* マウスでは 6 匹中 2 匹 (33.3%)、*Parp-1^{+/-}* マウスでは 4 匹中 1 匹 (25.0%)、*Parp-1^{-/-}* マウスでは 10 匹中 9 匹 (90%) に認められた。統計学的に比較検証を行ったところ、歯髓内石灰化物の発症率については *Parp-1^{+/+}* マウスでも *Parp-1^{-/-}* マウスでも有意差は認められなかった。しかし、統計学的検証を行ったところ、歯髓内の形態変化 dysplasia については、*Parp-1^{+/+}* マウスに比較して *Parp-1^{-/-}* マウスにおいて有意に上昇しており、P = 0.018 であった。以下に C57BL/6 における歯髓内石灰化物と dysplasia の発症率をまとめた表を示す。

従って、ICR/129Sv および C57BL/6 の解析より、*Parp-1* および老化の因子によって、歯髓内の形態変化 (石灰化物形成および dysplasia) の発症率が上昇することが分かり、*Parp-1* 遺伝子が関与していることが示唆された。

(2) HE 染色・抗 *Parp* 抗体免疫染色

HE 染色を行い、CT 検査で認められた *Parp-1^{-/-}* マウスにおける形態異常を調べた。その結果、*Parp-1^{-/-}* マウスの歯髓内における象牙芽細胞の配列が不整になっている箇所が見られたことから、*Parp-1* が細胞の配列決定機序へも関与していることが示唆された (data not shown)。また抗 *Parp* 抗体で免疫染色を行ったところ、*Parp-1^{-/-}* および *Parp^{+/+}* マウスの歯牙切片では陰性であ

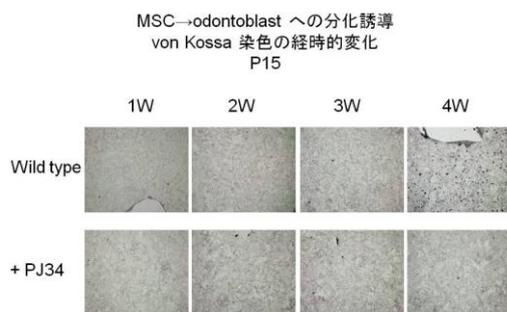
った。 *Parp-1^{+/-}*マウス切片における Parp の局在は、歯髄細胞そのもの、および *Parp-1^{+/-}*マウスにも認められた歯髄内形態異常の周辺、および石灰化物周辺であった。このことから、歯髄細胞内には Parp が高発現していること、形態異常を来している周辺に発現が認められることから、細胞の分化および分化形態異常の修正に関与していることが示唆された (data not shown)。

(3) Parp 活性阻害による間葉系幹細胞の分化メカニズムの解明

次に *in vitro* において、Parp-1 の細胞分化への関与を検証した。MSC を骨形成細胞へと分化させ、von Kossa 染色による骨形成能を Parp 活性の有無により比較検討した。

Parp 活性を阻害しない MSC の分化誘導においては、各継代とも分化誘導後 4 週目において von Kossa 染色陽性となり、骨細胞への分化がなされていることが分かった。しかし、Parp 活性を阻害した群においては、15 継代目の MSC の分化誘導では、誘導後 4 週以上経過しても von Kossa 染色は陽性にならず、骨芽細胞への分化が認められないことが分かった。

従って、*in vitro* の結果からも Parp 活性の阻害と細胞の老化の 2 つの要素によって、MSC の骨芽細胞への誘導が阻害される事が分かった。このことから、Parp 活性が骨細胞への分化にも関与していることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- 1) Yamada H, Hamada Y, Fujihara H, Fukami K, Mishima K, Nakaoka K, Kumagai K, Imamura E. Solitary fibrous tumor of the buccal space resected in combination with coronoidectomy Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. in press
- 2) Chikazu D, Fujikawa Y, Fujihara H, Suenaga H, Saijo H, Ohkubo K, Ogasawara T, Mori Y, Iino M, Takato T. Cyclooxygenase-2 activity is important in craniofacial fracture repair. Int J Oral Maxillofac Surg. 2010 40(3):322-326

- 3) Chikazu D, Taguchi T, Koyama H, Hikiji H, Fujihara H, Suenaga H, Saijo H, Mori Y, Seto I, Iino M, Takato T. Improvement in wound healing by a novel synthetic collagen-gel dressing in genetically diabetic mice. Asian J Oral Maxillofac Surg. 2010 22(2):61-67

- 4) Fujihara H, Chikazu D, Saijo H, Suenaga H, Mori Y, Iino M, Hamada Y, Takato T. Metastasis of hepatocellular carcinoma in to the mandible with radiographic findings mimicking a radicular cyst: a case report. J Endodontics. 2010 36(9):1593-1596

- 5) Saijo H, Mori Y, Fujihara H, Kanno Y, Chikazu D, Ohkubo K, Hikiji H, Iino M, Yonehara Y, Takato T. Evaluation and analysis of formation of bone at the palate in patients with cleft lip and palate after palatoplasty based on computed tomograms and three-dimensional data. Scand J Plast Surg Hand Surg. 2010 44:21-25

- 6) Mori Y, Saijo H, Fujihara H, Tanaka Y, Maeda Y, Hayashi N, Chikazu D, Iino M, Takato T. Dermoid cyst with fistula on the dorsum of the dorsum of the tongue. Asian J Oral Maxillofac Surg. 2009 21:51-53

- 7) Fujihara H, Ogino H, Maeda D, Shirai H, Nozaki T, Kamada N, Jishage K, Tanuma S, Takato T, Nakagama H, Sugimura T, Masutani M. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase deficiency sensitizes mouse ES cells to particular types of DNA damaging agents. Curr Cancer Drug Target. 2009 9(8):953-962

〔学会発表〕 (計 8 件)

- 1) 圓谷郷, 山田浩之, 藤原久子, 堀内俊克, 橘 竜佑, 里村一人, 濱田良樹 咬筋内に生じた脂肪腫の 1 例. 第 191 回 日本口腔外科学会関東地方会 2011/7/11. 横浜
- 2) 藤原久子, 中島敏文, 大久保多佳子, 小俣舞子, 濱田良樹. 相模原協同病院病棟看護師における口腔ケアに対する意識調査. 第 8 回 日本口腔ケア学会・学術総会 2011/6/18-19. 東京.
- 3) Fujihara H., Tsutsumi M., Kusuoka O., Hamada Y., Sugimura T., Masutani M. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) in odontoblast differentiation in aging process. 18th International Conference on ADP-ribose metabolism 2010/8/18-21. Zurich
- 4) Fujihara H., Hamada Y., Tsutsumi M., Kusuoka O., Sugimura T., Masutani M. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) in odontogenic function. 88th IADR General Session. 2010/7/14-17. Barcelona
- 5) 藤原久子, 山田浩之, 寺田知加, 神谷洋子, 田中庸子, 浅田洗一, 里村一人, 濱田良樹. 口腔悪性腫瘍との鑑別を要したパラコクシジオイデス症の 1 例. 第 20 回 日本口腔粘膜

学会総会・学術集会 20107/31-8/1. 大阪.

6)田中庸子, 山田浩之, 斎藤知之, 藤原久子, 川口浩司, 濱田良樹. 下顎歯肉に発症した筋線維腫の一例. 第 189 回 日本口腔外科学会 関東地方会. 2010/6/19 栃木.

7)中野永美子, 藤原久子, 堀江彰久, 中谷安典, 山崎陽子, 田中庸子, 新井剛, 山田浩之, 川口浩司, 濱田良樹. 腫瘍内の出血が基点と考えられた嚢胞形成多形性腺腫の 1 例. 鶴見大学歯学会 70 回例会 2009/12/19. 横浜

8)中野永美子, 藤原久子, 堀江彰久, 中谷安典, 山崎陽子, 田中庸子, 新井剛, 山田浩之, 川口浩司, 濱田良樹. 大きな嚢胞を形成し診断に苦慮した多形性腺腫の 1 例. 第 43 回 日本口腔科学会関東地方部会 2009/10/3. 東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 久子 (FUJIHARA HISAKO)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：80396746

(2)研究分担者

星 和人 (HOSHI KAZUTO)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：30344451

飯野 光喜 (IINO MITSUYOSHI)
山形大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：50212717

近津 大地 (CHIKAZU DAICHI)
東京医科大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：30343122

藤原 夕子 (FUJIHARA YUKO)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：50466744

(3)連携研究者

高戸 毅 (TAKATO TSUYOSHI)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：90171454

益谷 美都子 (MASUTANI MITSUKO)
国立がん研究センター研究所・ゲノム安定性
研究分野・分野長
研究者番号：60238904