

## 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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21689051

研究課題名（和文） 歯周組織に存在する幹細胞ニッチの同定とその分子制御機構の解明

研究課題名（英文） Identification of stem cell niche in periodontal skeleton and its molecular regulatory mechanisms.

## 研究代表者

小野 法明（ONO NORIAKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：20451908

## 研究成果の概要（和文）：

歯を支える周りの組織や顎や顔面の骨格には、幹細胞と同様な性質を持った細胞が存在する。本研究においては、このような細胞がどのように発生するかを理解することを目的とし、遺伝子改変マウスを用いた実験を行った。その初期知見は、骨格系の未熟な細胞が多様な性質と運命を持つ異質性の高い細胞の集団であることを示唆し、それぞれの前駆細胞が異なる目的を持って恒常性の維持と再生に関与していることが推察された。

## 研究成果の概要（英文）：

How putative stem-like cells residing in the periodontal and craniofacial skeleton are generated has been incompletely understood. Compound transgenic mice harboring an inducible Cre recombinase and a fluorescent reporter were used for the purpose of lineage-tracing experiments. The preliminary data suggest that early cells involving skeletogenesis are highly heterogeneous and comprised of a wide spectrum of cells including endothelial cells. In addition, each subset of progenitors is destined for different fate and functionality during development and regeneration.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9100000	2730000	11830000
2010年度	4600000	1380000	5980000
2011年度	6400000	1920000	8320000
年度			
年度			
総計	20100000	6030000	26130000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：(1) 幹細胞 (2) 幹細胞ニッチ (3) 歯周組織 (4) 歯根形成 (5) 内軟骨性骨化 (6) 傍軟骨膜 (7) 血管内皮 (8) 微小血管

## 1. 研究開始当初の背景

成体のさまざまな組織に存在し再生医療の標的候補である組織特異的幹細胞は、分化した細胞や細胞外基質タンパクにより構成される複雑な微小環境（幹細胞ニッチ）に維持され、様々なシグナルがこの微小環境を介し間接的に幹細胞を制御し組織の恒常性の維持と再生に関与している。これまでの研究より、歯根を取り巻く歯周組織や顎顔面骨格を含む骨格系には 間葉系幹細胞が成体においても存在することが明らかとされている。

近年、間葉系幹細胞が造血幹細胞と共に、微小血管周囲の共通した微小環境に局在し維持されることが示唆されている。成体に存在するこれらの幹細胞は、その発生の過程において微小血管と密接に関連し相互作用を経て形成されると考えられ、またさらに複雑な微小環境からの多重な拮抗的制御を経て最終的に組織特異的幹細胞が形成されると推察される。このような複雑な幹細胞の形成過程に関しては、特に造血系幹細胞においては幅広い研究が成されており、これまでに多様な知見が得られている。一方で骨格系の形成に関与する間葉系幹細胞においては、その全貌はほぼ明らかとされていない。

骨格系間葉系幹細胞の形成過程の解明には、その発生機序の理解が必須である。歯根および歯周組織の発生において、歯冠形成完了後に形成され根尖方向に陥入する歯性上皮鞘が重要な役割を果たし、外胚葉性間葉である歯小嚢および歯乳頭に存在する前駆細胞の遊走、増殖および分化を誘導する。一方骨格系の多くが形成される内軟骨性骨化においては、胎生軟骨原基は延長肥大し骨の原型を形成し、一方で肥大軟骨細胞からのシグナルに呼応して傍軟骨膜に骨芽細胞前駆細胞が発生し、軟骨原基内に侵入・増殖し成熟骨芽細胞に分化し石灰化基質を形成する。これらの細胞の発生過程および分子制御機構を詳細に検討することにより、成体において組織特異的幹細胞が維持される複雑な微小環境（幹細胞ニッチ）を理解することができると考えられる。

## 2. 研究の目的

歯根・歯周組織および内軟骨性骨化を伴う長管骨を含む骨格系の形成に寄与する幹細胞の起源と運命を *in vivo* において同定し、それを支配する分子制御機構を解明する。

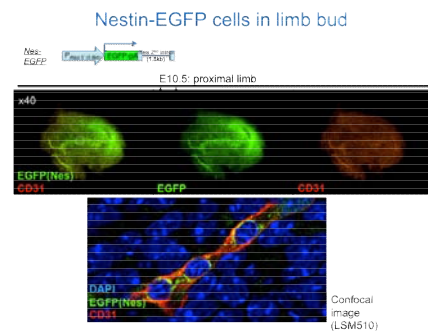
## 3. 研究の方法

中間径フィラメント nestin は神経系幹細胞および神経堤細胞の標識分子であるが、近年間葉系幹細胞においても同様に発現することが報告されている。我々はこれまで、ラット臼歯歯根膜細胞の浮遊培養系において、スフィア形成能を持つ歯根膜由来の神経堤幹細胞様細胞が nestin を発現することを見いだした。

本研究では、遺伝子改変マウスを用いた誘導型 Cre-LoxP および tdTomato レポーターシステムを組み合わせた生体内細胞系譜追跡系に併せ、nestin プロモータ特異的 GFP レポーターを兼ねた多重蛍光レポーターマウスを用いた実験を行い、内軟骨性骨化を伴う胎生骨原基および歯根・歯周組織の初期発生における nestin 陽性細胞の関与を、骨芽細胞系分化に必須な転写因子である osterix 陽性細胞との相関を含めて検討を行った。

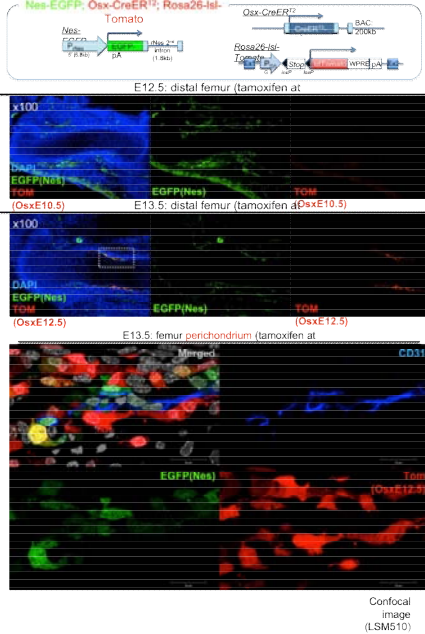
## 4. 研究成果

1) 胎生 10 日肢芽において nestin 陽性細胞は拇指原基側および中央部に網状に幅広く存在し、網状細胞は CD31 を共発現していた。



2) 胎生 12 日において nestin 陽性細胞は軟骨原基内部には存在せず、それを取り囲む軟骨膜に多数認められた。胎生 13 日中央部軟骨膜において nestin 陽性細胞層は重層し、CD31 あるいは osterix を共発現する群、または単発現するものなどの異質化が認められた。またこれまでの報告の通り osterix と CD31 を今日発現する細胞は認められなかった。

Nestin-EGFP and Osx-CreER cells in perichondrium

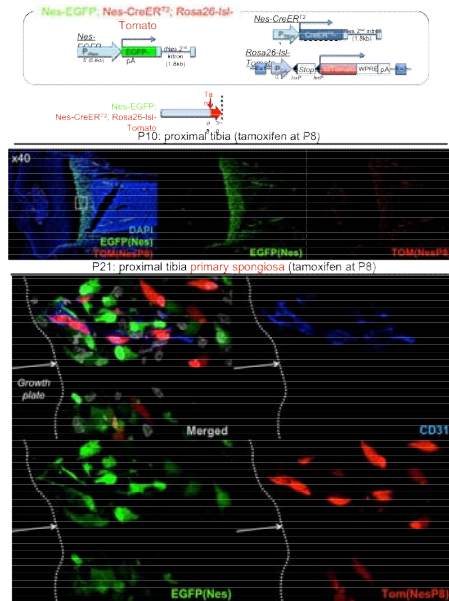


3) 胎生 14 日に軟骨膜において osterix を発現した細胞は、軟骨原基に侵入し骨芽細胞および骨細胞へと分化し一次骨化中心を形成し、出生時までは自己複製を行いほぼ全ての骨芽細胞系に寄与したが、その後急激に消退し生後 21 日においては骨幹部の骨細胞を除いて完全に消失した。

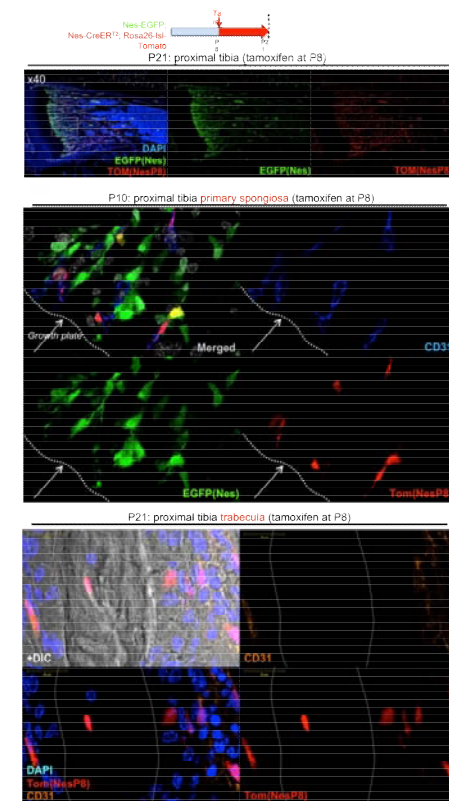


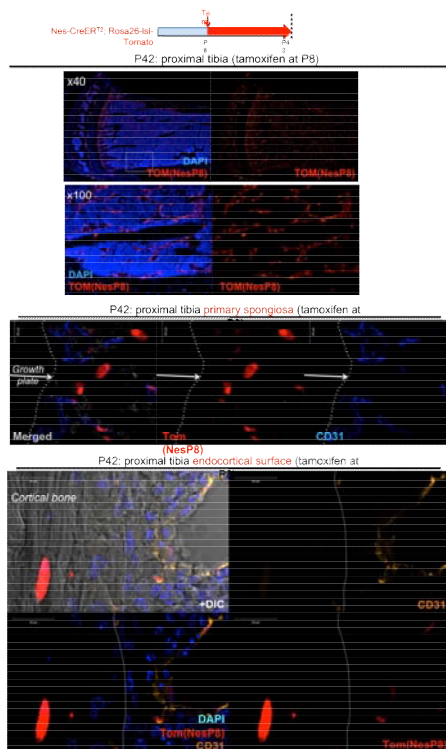
4) 生後 8 日骨端部において nestin 陽性細胞は成長板軟骨直下次海綿骨領域に局限し、多数が CD31 を共発現していた。

The fate of Nes-CreER<sup>fl</sup> cells in bone development



5) 生後 8 日において nestin を発現した細胞は、14 日後あるいは 35 日後においてはごく一部が骨芽細胞および骨細胞へと分化したものの、大半は CD31 陽性血管内皮細胞および骨髄間質細胞へと分化した。





以上の知見より nestin 陽性細胞は osterix を発現する骨芽細胞系前駆細胞とは明らかに異なる細胞集団である事が示唆され、骨原基初期発生と成熟骨髄環境における nestin 陽性細胞の性質は異なることが推察される。

本研究により、これまで報告されていない多重蛍光トランスジェニックマウスを用いた骨原基初期発生における細胞系譜および細胞運命の追跡を行う系を確立し、非常に興味深い初期知見を得ることができた。一方で本来の目的である歯周組織における解析には着手するには至っておらず、今後の課題となる。

今後の研究の推進方策としては、nestin 陽性細胞と骨芽細胞系の各段階の標識分子 ( $\alpha$  SMA, runx2, osterix, I 型コラーゲン、osteocalcin) を発現する細胞との相関を骨原基初期発生モデルにて検討し、骨芽細胞系前駆細胞の階層性と他の細胞系の前駆細胞との関連を明らかにする。平行して歯根および歯周組織形成モデルにおけるこれらの課題に対して検討を加える。

またこれらの前駆細胞の自己複製および分化に関する細胞内シグナルとしてヘッジホッグシグナルおよび副甲状腺ホルモン I 型受容体シグナルに着目し、受容体欠損時のそれぞれの段階の細胞の運命を追跡しそのシグナルの役割を検討する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Morishita, M., Ono, N., Miyai, K., Nakagawa, T., Hanyu, R., Nagao, M., Kamolratanakul, P., Notomi, T., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Kronenberg, H.M., Ezura, Y., Hayata, T., Nakamoto, T., Noda, M.

Osteopontin deficiency enhances parathyroid hormone/ parathyroid hormone related peptide receptor (PPR) signaling-induced alteration in tooth formation and odontoblastic morphology.

Tissue & Cell, 43(3):196-200. (2011)  
(査読有)

2) Ono, N., Nakashima, K., Schipani, E., Hayata, T., Ezura, Y., Soma, K., Kronenberg, H.M., Noda, M.

Constitutively active PTH/PTHrP receptor specifically expressed in osteoblasts enhances bone formation induced by bone marrow ablation.

Journal of Cellular Physiology, 227(2):408-15. (2012) (査読有)

3) Ohishi M, Ono W, Ono N, Khatri R, Marzia M, Baker EK, Root SH, Wilson TL, Iwamoto Y, Kronenberg HM, Aguila HL, Purton LE, Schipani E.

A Novel Population of Cells Expressing Both Hematopoietic and Mesenchymal Markers Is Present in the Normal Adult Bone Marrow and Is Augmented in a Murine Model of Marrow Fibrosis.

American Journal of Pathology, 180(2):811-8. (2012) (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1) Ono W, Ohishi M, Ono N, Khatri R, Kronenberg HM, Aguila H, Purton L, Schipani E.

Identification of a Novel Cell Population  
in the Adult Mouse Bone Marrow.

American Society for Bone and Mineral  
Research, 32nd Annual Meeting, Toronto,  
October, 2010 (査読有)

2) Ono N, Hirai T, Kronenberg HM

A Novel Double Fluorescent Strategy to  
Prospectively Isolate Label Retaining  
Chondrocytes at the Top of the Growth  
Plate.

American Society for Bone and Mineral  
Research, 33th Annual Meeting, San Diego,  
September, 2011 (査読有)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 法明 (ONO NORIAKI)

東京医科歯科大学大学院・歯学部附属病院  
非常勤講師

研究者番号：20451908