

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09899

研究課題名(和文)多色細胞系譜追跡法を用いた歯肉接合上皮の細胞供給システムの解明と幹細胞の同定

研究課題名(英文)Elucidation of the cell supply system of the gingival junctional epithelium and identification of stem cells using a multicolor cell lineage tracing method

研究代表者

山本 松男 (YAMAMOTO, MATSUO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50332896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：異物の侵入の防御を果す接合上皮組織を維持する幹細胞の存在や細胞供給システムの解明を多色細胞系譜追跡法で行った。マウス上顎臼歯は、基底層から歯肉溝までの全細胞が1つの幹細胞に由来する接合上皮クローン細胞集団の約12個によって取り囲まれることが明らかになった。また、Wnt反応性と報告された接合上皮幹細胞は、外側基底板のエナメル質から最も離れた端にあり、カテニン陽性細胞であった。クローン細胞集団形成は、約24週で幹細胞により生み出された細胞で満たされ、その空間的な広がりは基底部より歯冠側方向的に進展するだけでなく水平的にも拡大し、全体として不規則な葉状の細胞塊を形成することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の8割が罹患しているといわれる歯周病は歯の喪失の原因だけではなく、その慢性炎症は、糖尿病や非アルコール性肝炎、がん、アルツハイマー病など様々な疾患に悪影響を与えられている。歯周病は、デンタルプラークの慢性的な存在により惹起される歯肉縁症から始まるが、この防御には接合上皮の物理的バリアーが重要である。しかし、接合上皮が維持される仕組みについては不明な点が多い。接合上皮組織の維持機構について幹細胞を中心とした詳細なメカニズムが明らかになれば、歯周病の予防や治癒促進、再生、老化に対する対応の基盤となり、学術的および社会的な意義は大変大きい。

研究成果の概要(英文)：The existence of stem cells that maintain the junctional epithelial tissue, which plays a role in defense against the invasion of foreign bodies, and the cell supply system were elucidated by multicolor cell lineage tracing. It was revealed that the mouse maxillary molar is surrounded by approximately 12 junctional epithelial clonal cell populations derived from a single stem cell. In addition, the junctional epithelial stem cells reported to be Wnt-responsive were located at the end of the outer basal plate furthest from the enamel and were -catenin-positive cells. It was revealed that the formation of the clonal cell population was filled with cells generated by stem cells in about 24 weeks, and that the spatial expansion of the population not only progressed from the base toward the crown side but also expanded horizontally, forming an irregular leaf-shaped cell mass as a whole.

研究分野：保存治療系歯学関連、歯周病学

キーワード：歯周病 接合上皮 幹細胞 多色細胞系譜追跡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯肉溝に口腔常在菌塊である歯垢が慢性的に付着することで炎症が生じ、歯周組織の炎症性破壊を伴う歯周炎へと進行する。破壊された歯周組織は、菌や菌体成分の体内侵入や炎症関連物質の持続的な供給源となる。健康な歯周組織では、非角化の接合上皮が歯肉溝底部で歯面に付着して異物侵入を防ぐとともに自ら抗菌物質などを産生し、また血漿由来の抗菌物質や抗体、好中球などを含む歯肉溝滲出液 (GCF) が接合上皮内部を歯肉溝に向けて通過していくことで自然免疫の中心的役割をなすと考えられている。

接合上皮は、歯質を形成するエナメル上皮が歯萌出時に口腔粘膜上皮と癒合し、歯頸部で歯を取り囲むように残った歯原性上皮細胞由来である。接合上皮の基底細胞に活発な増殖細胞を認め、およそ 4-6 日程度で歯肉溝底部付近へ移動し脱落していくとされている。ヒトや動物で接合上皮が維持されるためには組織を構成する細胞を供給する幹細胞が存在すると考えるのが妥当であるが、組織幹細胞の直接的な解明には至っていない。接合上皮の研究で、細胞分化の段階という観点からのアプローチは近年あまり行われていない。

我々はタモキシフェン (TAM) 誘導型レインボウ蛍光マウスを用いた解析系 (多色細胞系譜追跡法) を確立し、Cre 組換え発色後 24 週で上顎第一臼歯 (M1) 接合上皮において基底層から歯肉溝までの全ての細胞が 1 つの幹細胞に由来すると思われるクローン細胞集団を構成していることを確認した。この中に組織幹細胞が存在することは間違いなく、接合上皮幹細胞の探索や細胞系譜解析を通じた細胞供給の仕組みや恒常性維持機構を解析することで、歯周組織の老化や機能維持機構が明らかになれば、歯周病の予防や再生治療の新たな基盤の 1 つになることは間違いがない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、接合上皮クローン細胞集団をとらえ、その構造と数を明らかにすること、クローン細胞集団内で接合上皮幹細胞の同定し、組織維持のための細胞供給の様子を観察することで、組織維持のシステムを解明することであった。具体的には、(1) 歯全周における接合上皮を構成するクローン細胞集団の組織学的解析、(2) 接合上皮クローン細胞集団内における組織幹細胞の同定、(3) 接合上皮クローン細胞集団の 3 次元的形成過程の解析、を行うこととした。

3. 研究の方法

組織学的解析

H30-R2 年度科研費基 C 「多色細胞系譜追跡法を用いた歯肉接合上皮幹細胞の探索」(応募者代表) で構築した $Rosa26^{CreERT2/+} \times Rosa26^{rbw/+}$ マウス解析系 (多色細胞系譜追跡法) を用いる。すなわちタモキシフェン誘導性 Cre-loxp システムを応用し、 $Rosa26^{Cr}$ と $Rosa26^{Rainbow}$ を掛け合わせ $Rosa26^{Cre/rbw}$ レインボーマウスをタモキシフェンを腹腔内注射することにより発色させる。3 日、8 週、16 週、24 週の時点で、前頭断面・水平断面での組織学的解析を行う。

免疫組織化学的染色・幹細胞の同定

各組織は 4% パラフォルムアルデヒドによる固定の後 10% EDTA で脱灰し、OCT コンパウンド (SAKURA 社) に包埋後 5 μ m の薄切片を作成した。HE 染色、カテニンに対する免疫染色を行った。口腔上皮および接合上皮細胞の幹細胞は Wnt シグナルに反応性のある細胞であるという報告に基づき、接合上皮を含む矢状断面での組織切片上で、核中 カテニン陽性細胞の検出を行う。

接合上皮クローン細胞集団の 3 次元的解析

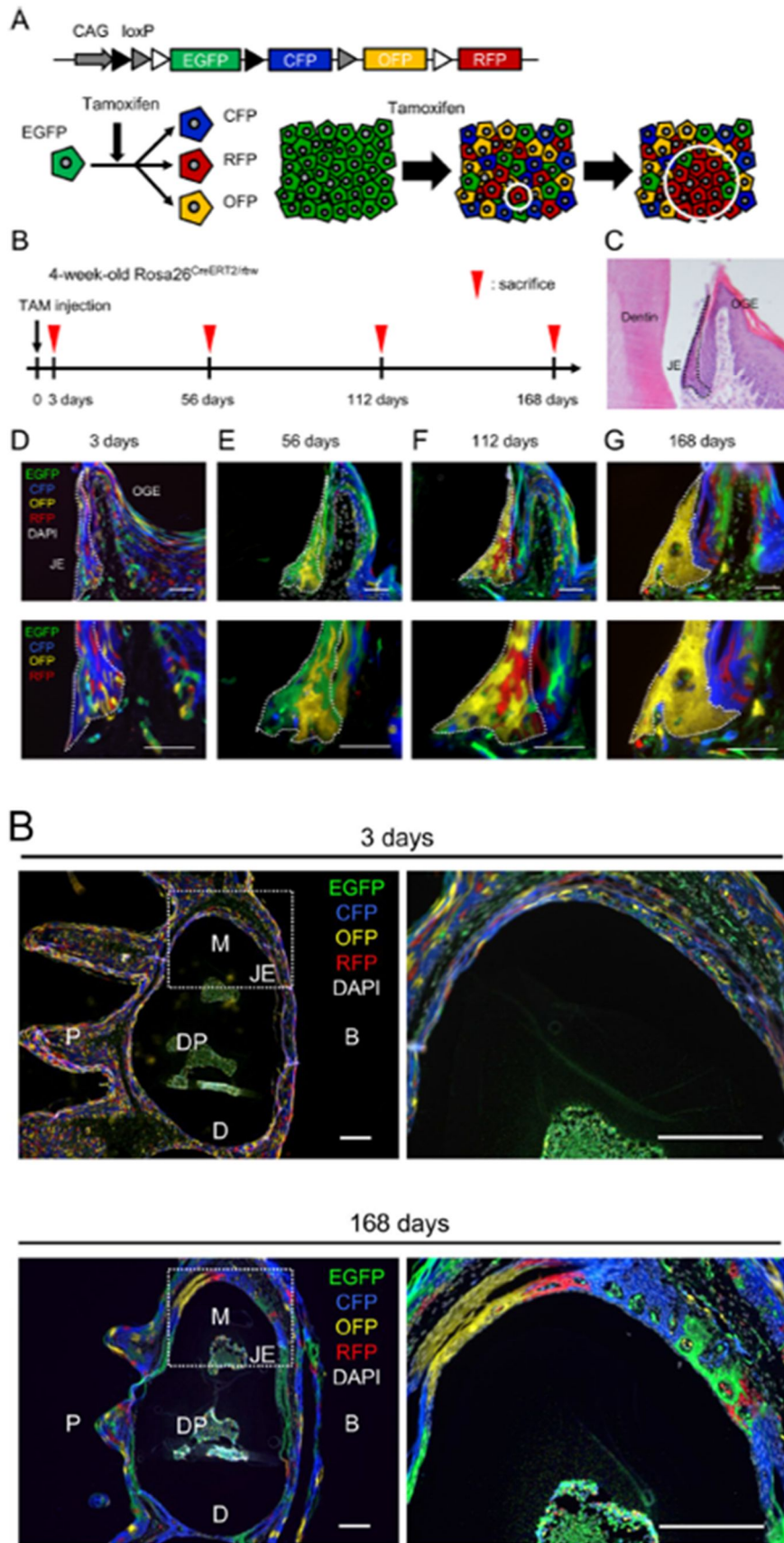
$Rosa26^{Cre/rbw}$ レインボーマウスをタモキシフェン発色 (3 日、8 週、16 週、24 週) させ、4 μ m 厚の連続組織切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で画像取得し、ソフトウエア上で 3D 構築を行う。

4. 研究成果

(1) 接合上皮を構成するクローン細胞集団の組織学的解析

タモキシフェン投与により体細胞がランダムに 4 色の蛍光タンパク質のどれかを発色するが (3 日目で観察) 24 週目において矢状断面で接合上皮基底層から歯冠側先端まで同一色の細胞で占められること、すなわちクローン細胞集団形成の完成を観察できることが明らかになった。水平断面での観察を行うと、やはり 24 週後では同色の細胞集団がマウス上顎臼歯 (M1) の周囲を取り囲む像が観察され、10 匹のマウスでの解析によりおよそ 12 個程度のクローン細胞集団であることがわかった。

Tanaka K, Tanaka J, Aizawa R, Kato-Tanaka M, Ueno H, Mishima K, Yamamoto M. Structure of junctional epithelium is maintained by cell populations supplied from multiple stem cells. *Sci Rep.* 2021 Sep 22;11(1):18860. doi: 10.1038/s41598-021-98398-7. Fig.1 および Fig.3 からの抜粋。

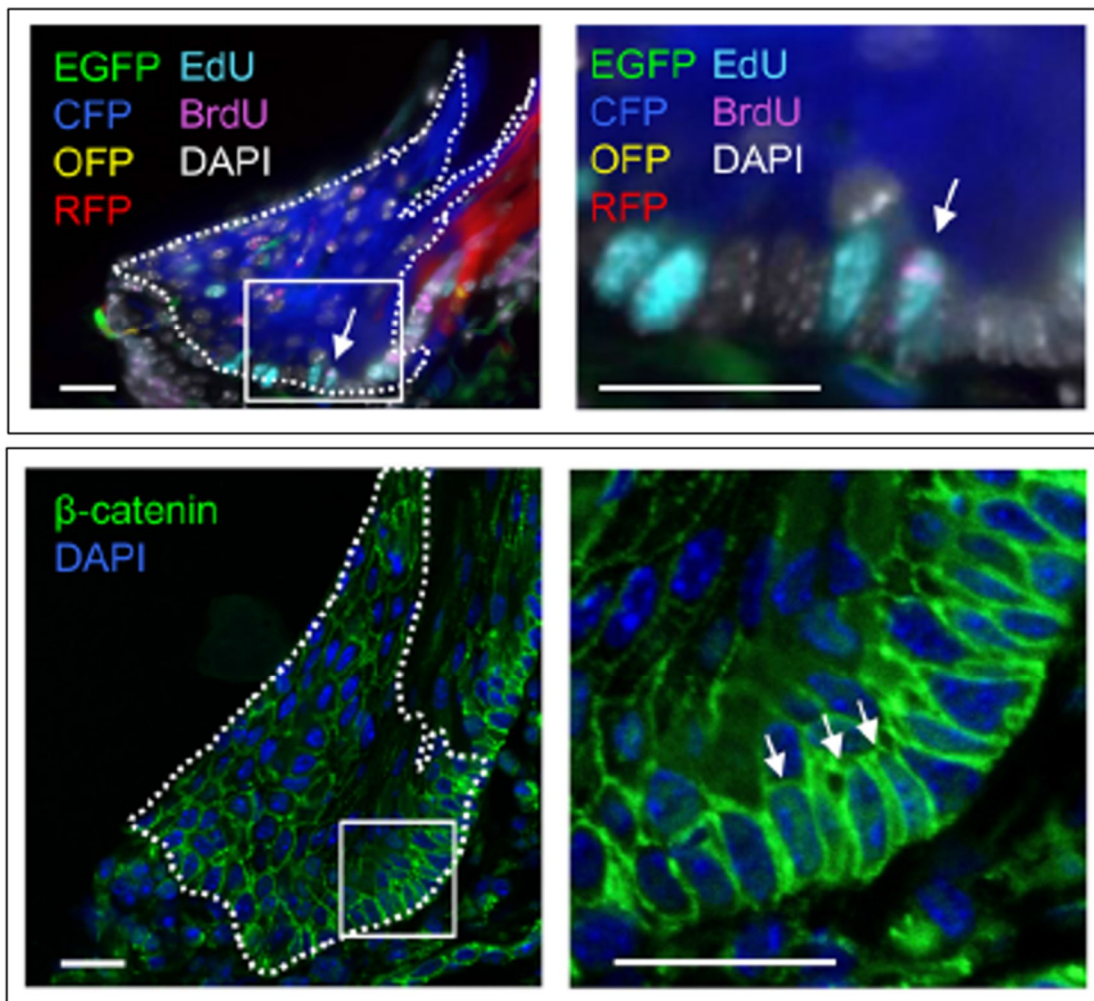


(2) 接合上皮クローン細胞集団内における組織幹細胞の同定

組織維持のために細胞を供給するためには、活発な細胞分裂が必須である。接合上皮においては、外側基板（接合上皮と歯肉結合組織の接合部）と内側基板（接合上皮とエナメル質表面の接合部）に隣接する領域で、細胞分裂時に取り込まれる BrdU および Edu 陽性の細胞が多数みられた。しかし、幹細胞マーカーのひとつ（幹細胞の要件）として、Wnt シグナル反応性であることが報告されており、Wnt 下流遺伝子である カテニンの核移行を免疫組織化学的に検出を試みたところ、外側基板のエナメル質から最も遠い領域に数個の陽性細胞を検出し、接合上皮の

幹細胞の可能性が強く示唆された。

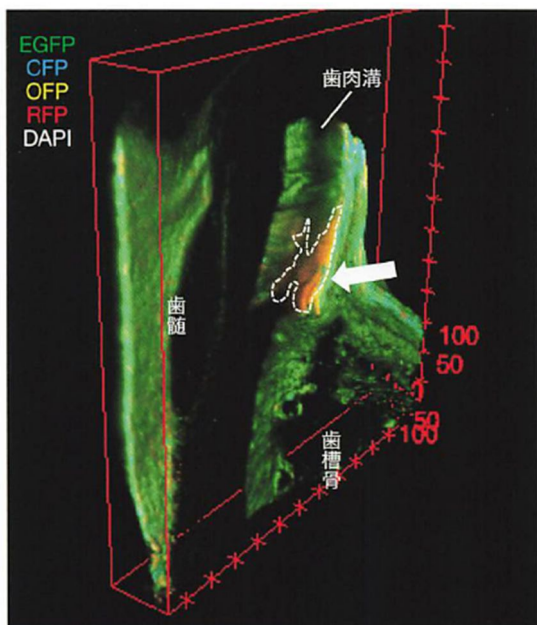
Tanaka K, Tanaka J, Aizawa R, Kato-Tanaka M, Ueno H, Mishima K, Yamamoto M. Structure of junctional epithelium is maintained by cell populations supplied from multiple stem cells. *Sci Rep.* 2021 Sep 22;11(1):18860. doi: 10.1038/s41598-021-98398-7. Fig.2からの抜粋。



(3) 接合上皮クローン細胞集団の3次的形成過程の解析

Rosa26Cre/rbw レインボーマウスをタモキシフェン発色させ、4 μ m 厚の連続組織切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で画像取得し、ソフトウェア上で3D構築を行った。

基底部の存在する接合上皮幹細胞から供給された細胞は、基底部から歯冠側に垂直に上昇移動するだけでなく、水平方向にも進展することが判明した。しかし、歯冠周囲を取り囲むクローン細胞集団は相互に入り込んだ構造を示し、不規則な葉状の形態で構成されていることが観察された。例として、タモキシフェン投与による発色8週間後の連続組織切片を25枚用いて3D構築した像を示す。OFF (黄色) 傾向発色をしている細胞群が接合上皮基部より不規則な葉状に拡大していることが観察される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 相澤 怜, 田中準一, 美島健二, 山本松男	4. 巻 64(4)
2. 論文標題 知の集積から見えてきた接合上皮の恒常性維持機構.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日歯周誌	6. 最初と最後の頁 121-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2329/period.64.121	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 -

1. 著者名 Tanaka K, Tanaka J, Aizawa R, Kato-Tanaka M, Ueno H, Mishima K, Yamamoto M.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Structure of junctional epithelium is maintained by cell populations supplied from multiple stem cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18860-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98398-7.	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相澤 怜, 田中慧介, 田中準一, 菅野真莉加, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis由来LPSが不死化接合上皮細胞の細胞機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会, 宮城(ハイブリッド開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中慧介, 田中準一, 相澤 怜, 田中麻友, 上野博夫, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 Junctional Epithelial Cells are Supplied by Putative Stem Cells
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会 2021年10月15日, 名古屋国際会議場
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	美島 健二 (Mishima Kenji) (50275343)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	
研究分担者	田中 準一 (Tanaka Junichi) (40710166)	昭和大学・歯学部・准教授 (32622)	
研究分担者	相澤 怜 (Aizawa Ryo) (80710673)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	

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