

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17179

研究課題名（和文）力学的刺激による歯根膜の階層的細胞応答メカニズムの解明

研究課題名（英文）Hierarchical cellular response to mechanical stress in of the periodontal ligament

研究代表者

北見 公平（Kitami, Kohei）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20804579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯根膜を含む歯周組織は力学的刺激に極めて鋭敏に反応しながらもその構造を維持している。しかし力学的刺激がどのように受容され、組織変化に不可欠な幹細胞の挙動をいかにして制御しているか、その詳細は明らかではない。本研究は、遺伝学的手法を用いて歯根膜組織幹細胞の追跡を可能とする動物実験モデルを構築し、力学的刺激の感受に重要な分子の欠失が及ぼす影響の解析を行うものである。これまでのところ歯根膜の幹細胞を高解像度で検出するシステムの構築に成功し、現在、その機能解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜組織の幹細胞は、力学的刺激に敏感に反応しながら組織の構造を保持しています。しかし、その制御メカニズムはまだ完全に解明されていません。本研究では、歯根膜組織幹細胞の追跡を可能にする動物実験モデルを構築し、力学的刺激に関連する分子の欠失がどのような影響を及ぼすかを解析しています。これまでのところ高解像度で幹細胞を検出するシステムの構築に成功し、現在はその詳細な機能解析を進めています。本研究成果は、歯を支える組織の生物学的な謎を解き明かし、将来的により良い治療法の開発につながるものです。

研究成果の概要（英文）：Periodontal tissues, including the periodontal ligament, maintain their structure while being extremely sensitive to mechanical stimuli. However, we still don't fully understand how these tissues receive mechanical stimuli or how they control the behaviour of stem cells, which are crucial for tissue remodelling. In this study, we have used genetic techniques to create an experimental animal model that allows us to track the behaviour of stem cells in periodontal ligament tissue and investigate the effects of deleting molecules that are important for sensing mechanical stimuli. So far, we have successfully developed a system that can detect periodontal ligament stem cells with high precision, and we are currently carrying out functional analysis.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯根膜 機械的刺激 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

力学的刺激が歯根膜の維持に大きく寄与していることは論を待たない。矯正学的歯の移動において見られるように、歯根膜の力学的刺激への鋭敏な反応特性が歯周組織のリモデリングを亢進しながらも、組織の維持を可能としている。臨床的には矯正学的な歯の移動を可能とする荷重プロトコルが確立されているものの、力学的刺激がいかにして歯周組織に伝わり、どのように細胞挙動が変化することで組織改変に至るのか、そのメカニズムの理解は依然として乏しい。近年、骨細胞を介した歯根膜の制御を示す研究成果が報告されているが、力を受容し歯周組織改変の起点となるのは歯根膜なのか歯槽骨なのか、その詳細は未だ不明である。

転写因子 Gli1 は発生期における歯周組織の形態形成に重要な役割を演じるが、歯根完成後においても Gli1 を発現する細胞が幹細胞として機能していることが示唆されている(Men et al. 2020)。この報告によれば、Gli1 陽性の細胞は、咬合力の負荷に応答した歯槽骨内の骨細胞から、Sclerostin により抑制的制御を受けている。咬合力による負荷を失うと骨細胞からの抑制作用が増強されることにより Gli1 陽性幹細胞の増殖分化活性が低下し、歯周組織の骨量低下を招く。これらの知見から、咬合力による力学的刺激は、歯槽骨内の骨細胞を介して Gli1 陽性幹細胞の増殖分化に関わることが示唆されている。しかしながら、咬合力によって歯根膜に生じる応力歪に対し、骨組織における応力歪は極めて小さいことから、咬合力に対して骨細胞のみが選択的に応答するとは考えにくく、歯根膜を起点とする応力感知システムが存在すると推察される。

歯根膜に特異的に発現する Periostin (Postn) は、細胞間の情報伝達や細胞機能の調節に重要なマトリセルラータンパクである。Postn を欠失したマウスは歯周組織の崩壊を示すが、咬合力の負荷を軽減させると歯周組織崩壊が抑制される。すなわち、力学的刺激による組織破壊を抑制する Postn は歯根膜組織の維持に必須であることが示されている(Rios et al. 2005; Rios et al. 2008)。

一方、マウスを用いた実験的歯の移動に際して周囲歯槽骨の骨細胞に Sclerostin の発現が亢進するが、Postn 欠失マウスにおいては、骨細胞における Sclerostin の発現変化が消失すると報告されている(Rangiani et al. 2016)。したがって、力学的刺激に応答して生じる骨細胞における Sclerostin 発現には、Postn が関与していることが強く示唆される。

過去の報告からは、力学的刺激への組織応答の起点は歯根膜なのか歯槽骨なのか、未だ見解の相違がある。たとえば近年の研究でも、矯正学的歯の移動による圧迫力を受けた歯周組織で、破骨細胞を誘導する因子 RANKL は歯根膜由来のものと歯槽骨由来のものが存在し、どちらが主要な制御を担っているかの議論は分かれている(Shoji-Matsunaga et al. 2017) (Yang et al. 2018)。一方、直接圧迫力を受けた培養骨細胞と、圧迫力を受けた歯根膜細胞と共培養された骨細胞とでは、骨量調整に関わる因子の発現が逆転した反応を示す(Odagaki et al. 2018)など、歯根膜細胞と歯槽骨の骨細胞との緻密な情報伝達が歯周組織改変に必須であることは明白である。

近年の急速な遺伝子改変技術およびその制御技術の進歩により、時空間特異的な遺伝子発現の制御が可能になっている。この技術を応用すれば、歯根膜という極めて鋭敏に変化する特殊な微小環境において、幹細胞の挙動変化と周辺への波及を追跡することが可能であると考えた。

## 2. 研究の目的

以上の背景、特に Postn 欠失マウスと Sclerostin/Sost 欠失マウスにおける咬合力に対する組織応答の相似性から、力学的刺激に応答して骨細胞が Sclerostin を分泌する経路の上流には、歯根膜における Postn が介在しているのではないかとこの着想を得た。本研究計画では Gli1 陽性細胞

とその娘細胞を追跡可能なシステムを構築して、歯根膜の幹細胞とその増殖分化動態を可視化し、これを用いて Postn 欠失マウスにおいて矯正力の負荷に対する歯根膜組織の応答を解析することとした。

### 3. 研究の方法

#### 歯根膜における Gli1 陽性幹細胞の組織内動態の解析

薬剤 (Tamoxifen) 投与により、任意のタイミングで Gli1 発現細胞を蛍光標識することのできるマウス (Gli1-CreER<sup>T2</sup>; GRR) を以下のマウスの交配により作成した。Gli1-CreER<sup>T2</sup> (Gli1<sup>tm3(cre/ERT2)Alj/J</sup>) (Ahn and Joyner 2004)、GRR (C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sor<tml(CAG-EGFP/DsRed)Utr>) (Hasegawa et al. 2013)。4 週齢の Gli1-CreER<sup>T2</sup>; GRR マウスに、タモキシフェンを腹腔内投与し、その後の Gli1 陽性幹細胞の動態を組織学的に解析した。解析領域は上顎第一臼歯の遠心根とした。パラフィン包埋組織標本上における標識細胞の検出は免疫染色法により行い、下記の一次抗体を使用した。anti-mCherry (1:2,000; M11217; Invitrogen)、anti-GFP(1:400; A-11122; Invitrogen)。

#### 矯正力負荷による Gli1 陽性細胞の変化

4 週齢 Gli1-CreERT2; GRR マウスの上顎左側第一臼歯と上顎前歯の間に、直径 0.9mmNi-Ti クローズドコイルスプリングを結紮し、上顎左側第一臼歯の実験的歯の移動を行った(Mizukoshi et al. 2021)。コイルスプリング設置 2、7、14 日後 (矯正力負荷直後・組織改変開始時期・組織改変進行による移動期) にそれぞれを屠殺し、歯周組織を含む上顎骨を摘出後、脱灰パラフィン包埋標本を作製し、歯周組織の組織学的解析および、歯の移動量の解析を行った。

### 4. 研究成果

4 週齢の Gli1-CreER<sup>T2</sup>; GRR に Tamoxifen を 2 日連続で腹腔内投与し、6、8、12 週間後の標識細胞を組織学的に解析したところ、根尖部に少量の標識細胞を検出することに成功した。追跡期間の増加とともに根尖部では標識細胞の増加を認めたが、既報(Men et al. 2020)の結果のように歯根膜全体に波及するような細胞動態は観察されなかった。そこで細胞の標識効率を上げるために、4 日間連続での Tamoxifen 投与を行い、4、8 週間後の標識細胞を組織学的に解析した。その結果、投与後 8 週間後では歯根膜全域への標識細胞の波及を確認する事ができた。しかし標識細胞数は数%であり、既報(Men et al. 2020)の結果のように、ほぼ全ての細胞が標識されるような結果は得られなかった (図 1)。

現在、Postn-KO マウスに Gli1 陽性細胞の追跡システムを組み込み、かつ矯正力を付加した際における幹細胞の追跡を進めているが、現時点では結果を得るに至っていない。本研究で使用した GRR マウスは、すべての細胞が GFP を発現するが、Cre-recombinase の活性により tdsRed を発現するレポーターマウスである。2 色の蛍光により Cre-recombinase の活性を明瞭に分別可能なシステ

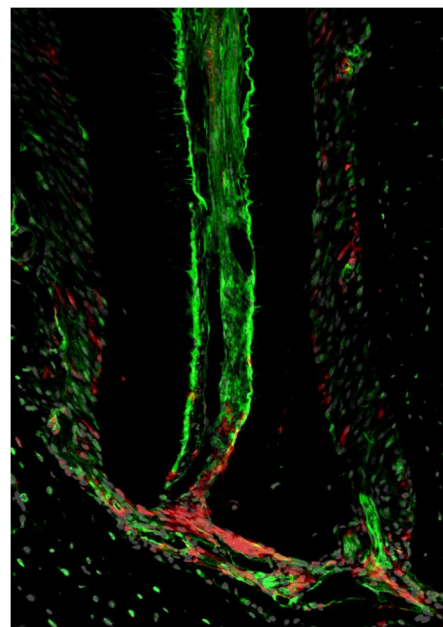


図 1 . 歯根膜組織における Gli1 陽性細胞の分布。4 日間連続の Tamoxifen 投与と 8 週間の追跡により、歯根膜全域に波及する Gli1 陽性細胞の検出に成功した。赤色:Gli1 陽性細胞、緑色:Gli1 陰性細胞。

ムである一方、繁殖効率が悪く、解析に十分な数のマウスを確保するために多くの時間を有する結果となった。また Postn-KO マウスにおいても同様に繁殖効率の低下が生じた結果、研究期間中に十分な結果を得るには至らなかった。

## 参考文献

- Ahn S, Joyner AL. 2004. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell*. 118(4):505-516.
- Hasegawa Y, Daitoku Y, Sekiguchi K, Tanimoto Y, Mizuno-Iijima S, Mizuno S, Kajiwara N, Ema M, Miwa Y, Mekada K et al. 2013. Novel rosa26 cre-reporter knock-in c57bl/6n mice exhibiting green emission before and red emission after cre-mediated recombination. *Exp Anim*. 62(4):295-304.
- Men Y, Wang Y, Yi Y, Jing D, Luo W, Shen B, Stenberg W, Chai Y, Ge WP, Feng JQ et al. 2020. Gli1+ periodontium stem cells are regulated by osteocytes and occlusal force. *Dev Cell*. 54(5):639-654 e636.
- Mizukoshi M, Kaku M, Thant L, Kitami K, Arai M, Saito I, Uoshima K. 2021. In vivo cell proliferation analysis and cell-tracing reveal the global cellular dynamics of periodontal ligament cells under mechanical-loading. *Sci Rep*. 11(1):9813.
- Odagaki N, Ishihara Y, Wang Z, Ei Hsu Hlaing E, Nakamura M, Hoshijima M, Hayano S, Kawanabe N, Kamioka H. 2018. Role of osteocyte-pdl crosstalk in tooth movement via sost/sclerostin. *J Dent Res*. 97(12):1374-1382.
- Rangiani A, Jing Y, Ren Y, Yadav S, Taylor R, Feng JQ. 2016. Critical roles of periostin in the process of orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*. 38(4):373-378.
- Rios H, Koushik SV, Wang H, Wang J, Zhou HM, Lindsley A, Rogers R, Chen Z, Maeda M, Kruzynska-Frejtak A et al. 2005. Periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol*. 25(24):11131-11144.
- Rios HF, Ma D, Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, Feng JQ. 2008. Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. *J Periodontol*. 79(8):1480-1490.
- Shoji-Matsunaga A, Ono T, Hayashi M, Takayanagi H, Moriyama K, Nakashima T. 2017. Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via rankl expression. *Sci Rep*. 7(1):8753.
- Yang C-Y, Jeon HH, Alshabab A, Lee YJ, Chung C-H, Graves DT. 2018. Rankl deletion in periodontal ligament and bone lining cells blocks orthodontic tooth movement. *International Journal of Oral Science*. 10(1):3.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3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 89156
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 -

1. 著者名 Thant Lay, Kaku Masaru, Kakahara Yoshito, Mizukoshi Masaru, Kitami Megumi, Arai Moe, Kitami Kohei, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Maeda Takeyasu, Saito Isao, Uoshima Katsumi, Saeki Makio	4. 巻 13
2. 論文標題 Extracellular Matrix-Oriented Proteomic Analysis of Periodontal Ligament Under Mechanical Stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 899699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.899699	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 Thant Lay, Kakahara Yoshito, Kaku Masaru, Kitami Megumi, Kitami Kohei, Mizukoshi Masaru, Maeda Takeyasu, Saito Isao, Saeki Makio	4. 巻 624
2. 論文標題 Involvement of Rab11 in osteoblastic differentiation: Its up-regulation during the differentiation and by tensile stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 16 ~ 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.07.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Moe, Kaku Masaru, Thant Lay, Kitami Megumi, Ono Yoshiki, Dobashi Azusa, Iwama Hajime, Mizukoshi Masaru, Kitami Kohei, Matsumoto Masaki, Saito Isao, Uoshima Katsumi	4. 巻 692
2. 論文標題 Effect of Sparc knockout on the extracellular matrix of mouse periodontal ligament cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149364 ~ 149364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.149364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwama Hajime, Kaku Masaru, Thant Lay, Mizukoshi Masaru, Arai Moe, Ono Yoshiki, Kitami Kohei, Saito Isao, Uoshima Katsumi	4. 巻 72
2. 論文標題 Acellular Extrinsic Fiber Cementum Is Invariably Present in the Superficial Layer of Apical Cementum in Mouse Molar	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 109 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554241229130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaku Masaru, Thant Lay, Dobashi Azusa, Ono Yoshiki, Kitami Megumi, Mizukoshi Masaru, Arai Moe, Iwama Hajime, Kitami Kohei, Kakihara Yoshito, Matsumoto Masaki, Saito Isao, Uoshima Katsumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Multiomics analysis of cultured mouse periodontal ligament cell-derived extracellular matrix	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-51054-8	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0件

〔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
---------	---------