

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 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592053

研究課題名（和文）：歯周組織再生過程におけるアネキシン A 5 の機能の組織学的解析

研究課題名（英文）：Histological analysis of annexin a5 function in the process of periodontal tissues regeneration.

研究代表者

島田 明美 (SHIMADA AKEMI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00339813

研究成果の概要（和文）：歯周組織の発生および再生過程におけるアネキシン a5 発現細胞の局在と機能を組織学的に解析した。Anxa5 は生後 1 週では歯根形成領域で、生後 4 週以降歯根根尖部や歯頸部歯根膜、ならびにセメント芽細胞や骨膜細胞で発現していた。歯周組織の中で Anxa5 を強く発現する細胞が認められ、その一部は血管周囲に分布していた。生後 6 週で臼歯を再植した後の歯周組織再生過程において、Anxa5 陽性細胞数は、再植 3 日後に急激に増大した。生後 8 週において、野生型に比べて Anxa5 機能欠損マウスでは根尖部セメント質の形成が少なく、歯根膜の幅が大きかった。一方、成体の長管骨では腱・靭帯付着部で骨が増大する傾向が認められた。硬組織と周辺組織の発生・リモデリング・再生過程における Anxa5 の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Localization and function of Annexin a5 (Anxa5) expressing cells in the periodontal tissues were histologically analyzed. At 1 week after birth, Anxa5 was expressed at the area for tooth root formation. At 4 weeks after birth, Anxa5 was expressed in apex and cervical areas of tooth roots, cementblasts, periosteum, and perivascular areas. In the process of periodontal regeneration after tooth replantation at 6 weeks after birth, Anxa5 positive cells were markedly increased in the periodontal tissues at 3 days after replantation. At 8 weeks after birth, Anxa5 deficient mice showed less cement formation at the root apices and wider periodontal ligament than those of wild mice. On the other hand, adult long bones of Anxa5 deficient mice showed larger bone formation at the insertion sites of tendon and ligament than those of wild mice. These results suggest that Anxa5 is involved in the process of development, remodeling and regeneration of hard tissues including surrounding soft tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯根膜、組織幹細胞、アネキシン a5

1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、歯周病や外傷、歯の意図的再植や移植、あるいは矯正歯の移動などに対してある程度は再生・リモデリングする能力を持つ。近年、多くの成体組織において、組織幹細胞が再生やリモデリングの過程で重要な役割を担うことが明らかとなったが、歯周組織に存在すると考えられる組織幹細胞の局在や性質については不明の点が多い。

我々は、組織幹細胞が正常組織でほとんど増殖しない性質を利用し、DNA ラベルを(bromodeoxyuridine)を長期間保持する細胞 (BrdU-LRC)の局在を調べた。そして、歯根膜において BrdU-LRC が主に血管周囲に分布すること、PDGF receptor- β など血管壁細胞 (ペリサイト) マーカーを発現すること、歯の再植により歯周組織再生を促すと急激に分裂を開始することを明らかにした。これらの結果は、歯周組織においてペリサイトが組織幹細胞として組織再生に寄与する可能性を示唆する。

そこで我々は、歯周組織再生におけるペリサイトの機能をより詳細に検討する目的で、血管周囲に発現が局在するとの報告があるアネキシン A5 (Anxa5) 遺伝子に LacZ (β -gal) を挿入したノックインマウス (Anxa5^{+/+}マウス; Brachvogel et al, Development 132:2657, 2005)を用いた解析に着手した。

Anxa5 はアポトーシス細胞が細胞外に提示するホスファチジルセリンに特異的に結合することから、アポトーシス検出のプロブとして用いられるが、その生理機能については不明な点が多い。Anxa5^{-/-}マウスは Anxa5 を機能的に欠失しているが、これまで顕著な表現型の差異は見出されていない (Brachvogel et al, Mol Cell Biol 23:2907,2003)。しかし我々の予備的検討の結果、臼歯再植により組織再生を促すと、野生型に比べ3週後の骨性癒着が明らかに少ないなど、組織再生過程では Anxa5 の機能的欠失による影響が見出された。このことは、ペリサイトが歯周組織や骨のリモデリング、再生過程に重要な役割を担うことに加え、これまでほとんど機能が明らかでなかった Anxa5 がペリサイトの組織幹細胞としての機能に関与する可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では Anxa5^{-/-}マウスを用いて、歯と歯周組織の発生過程、および再植後の歯周組織再生過程における Anxa5 の局在と機能を組織学的に明らかにし、これまで歯周組織や幹細胞における機能が知られてい

なかった Anxa5 が歯周組織幹細胞としてのペリサイトの機能に関与するか否かを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス

Anxa5 遺伝子に LacZ を挿入した Anxa5 機能欠損マウスを用いて、Anxa5-LacZ と Anxa5 の歯周組織における発現を調べた。Anxa5-LacZ^{+/+}の交配により生まれた生後1, 4, 7, 8週 of Anxa5^{+/+}、Anxa5^{+/-}、Anxa5^{-/-}の仔マウスに体重1gあたり5 mg の BrdU を腹腔投与し、投与3時間後に屠殺した。上下顎および上下肢長管骨を摘出し、以下の実験に供した。

(2) 臼歯再植による歯周組織再生モデル

生後9日から14日の5日間、仔マウスに体重1gあたり5 μ g の BrdU を朝夕2回皮下投与した。4週間飼育した後に、ペントバルビタール麻酔下でマウスの右上顎第一臼歯を抜去し、直後に再植した。再植後1, 3, 7, 21日に屠殺し、上下顎を摘出した。

(3) β -gal 活性染色

摘出した上顎を左右に分離し、半顎をアセトン固定した。X-gal を基質として β -gal 活性染色をした後、4.13% EDTA により脱灰し、パラフィン包埋切片上で歯周組織における Anxa5-LacZ 陽性細胞の局在を調べた (Shimada et al, 2012)。

(4) Anxa5 免疫染色

残る上顎半分を4%パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定した。4.13% EDTA により脱灰し、パラフィン包埋切片を作製した。ウサギ抗ヒト Anxa5 抗体 (BioVision) と Alexa Fluor 594 標識ニワトリ抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies) を用いて歯周組織における Anxa5 の発現を調べた。

(5) BrdU 免疫染色

パラフィン包埋切片を2N HClで37 $^{\circ}$ C、90分処理した後、抗BrdU抗体 (clone: BMC9318, Roche) と反応させた。 β -gal活性との二重染色の場合は、シンプルステインMAX-PO(M) (ニチレイ) を用い、ジアミノベンジジンにより染色した。Anxa5抗体との蛍光二重染色の場合には、Alexa Fluor 594標識ニワトリ抗マウスIgG抗体 (Life Technologies) により検出した。

(6) アルカリフォスファターゼ(ALP)染色

組織を摘出後、過ヨウ素酸ナトリウム-

リジン-パラホルムアルデヒド固定をし、低融点のパラフィンを用いて切片を作製した (Miao and Scutt, J Histochem Cytochem. 50(3):333-40, 2002)。パラフィン除去後、0.2 mg/mL naphthol AS-BI phosphate disodium, 0.4 mg/mL Fast Blue RR salt, 1% MgCl₂ を含む 100 mM Tris/maleate buffer (pH 9.2) で約 2 時間反応させ、ALP 陽性細胞を検出した。

(7) 酒石酸耐性アルカリフォスファターゼ (TRAP) 染色

組織を摘出後、10%ホルマリン含有 PBS で固定し、常法によりパラフィン包埋切片を作製した。パラフィン除去後、0.2 mg/ml naphthol AS-BI phosphate, 0.6 mg/ml Fast Red Violet LB salt, 0.75 mg/ml L-(+)-tartaric acid を含む 0.2 M acetate buffer (pH 5.3) で約 30 分反応させ、TRAP 陽性細胞を検出した。

(8) マイクロ CT 撮影と形態計測

摘出した上下顎および上下肢長管骨を 10%ホルマリン含有 PBS で固定した。

上顎臼歯のマイクロ CT (厚さ 16 μm, 50 kV, 100 mA, CB100MFZ, 日立メディコ) 画像から、EXAVISION LITE (Ziosoft) により近心根と頰側遠心根の根管内を通る縦断面像を得た。この像から近心根根尖部セメント表面で咬合面と水平に直行する横断面像を得た。この面における近心根周囲長、歯槽骨内腔周囲長、歯根膜断面積から、歯根膜の平均の幅を算出した。

上下肢長管骨については、pQCT (厚さ 0.08~0.12mm, LaTheta, アロカ) で全長を撮像し、皮質骨面積、皮質骨塩量、皮質骨密度を算出した。

(9) 腱細胞の初代培養

マウスの尾腱を採取し 0.1% コラーゲンゲル (Cellmatrix type I-A, 新田ゼラチン) 中で 10% ウシ胎児血清を含む α-MEM で培養した。約 10 日後、ゲル中に出現した増殖細胞を、コラゲナーゼとトリプシン処理により分離し、通常のプラスチックシャーレで経代培養した。増殖速度を調べると共に、発現遺伝子をリアルタイム PCR 法により調べた。

(10) 腱細胞培養上清添加による骨芽細胞系 MC3T3-E1 細胞への影響

サブコンフルエントに達した腱細胞を FBS 濃度 1% で 2 日間培養し、培養上清を回収した。培養上清に 9% FBS を加え、MC3T3-E1 培養に用いた。14 日後、細胞を固定し、ウサギ抗ヒト Cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling) を用いて細胞の免疫染色およびウェスタンブロット法によりアポ

トーシスを調べた。対照として MC3T3-E1 細胞の培養上清を用いた。

4. 研究成果

(1) 歯周組織発生過程における Anxa5 の発現

生後 1 週において、Anxa5-LacZ はヘルトビッチ上皮鞘周囲で強い発現を示した。また萌出に伴い、歯と骨の間で圧迫を生じる根尖部や、咬合によって牽引を生じる歯頸部歯根膜で強く発現した (図 1 上)。特に 4 週以降では、歯根膜組織中に Anxa5-LacZ を強発現する細胞が認められ、その一部は血管周囲に分布していた。Anxa5 抗体を用いた免疫染色においても同様の結果が得られた。

以上の結果から、Anxa5 は歯根膜ペリサイトのマーカーとなる可能性と共に、歯の形成過程において何らかの機能を有する可能性が示唆された。

(2) Anxa5 発現細胞の増殖性

Anxa5-LacZ 発現細胞の一部は BrdU を取り込んでいたことから、増殖能を有する細胞であることが示された (図 1 下)。また BrdU 取り込みに遺伝子型による顕著な差は認められなかったことから、Anxa5 は増殖性には影響しないと考えられた。

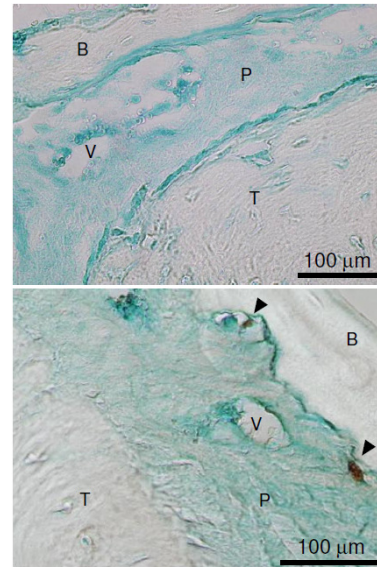


図 1. 生後 7 週における Anxa5 の発現
▲ Anxa5-LacZ と BrdU の二重陽性
B, 歯槽骨; V, 血管; P, 歯根膜;
T, 歯根;

(3) 歯周組織再生過程における Anxa5-lacZ⁺ 細胞の挙動

上顎第一臼歯の再植を行い、歯周組織再生過程における Anxa5-lacZ⁺ 細胞の挙動の追跡を試みた。再植 3 週後のマイクロ CT 解析の結果、Anxa5^{-/-} では、野生型で高頻度で生じる歯根膜の石灰化が少なかった。

しかし、歯根膜組織中の ALP 陽性細胞、あるいは TRAP 陽性細胞の分布に遺伝子型による明らかな差は認められなかった。*Anxa5-lacZ*⁺細胞数は、再植 3 日後に急激に増大した。再植前投与した BrdU との共染色の結果からは組織幹細胞の増殖によるもの、あるいは *Anxa5-lacZ* の発現増加によるものである可能性が考えられた。

(4) *Anxa5* 欠損による歯の形態形成への影響

Anxa5^{+/+}、*Anxa5*^{+/-}、*Anxa5*^{-/-}の3遺伝子型のマウスから経目的に上下顎を採取し、マイクロCT解析と組織学的解析を行った。その結果、生後4週以降において、*Anxa5*^{-/-}では第一臼歯根尖部におけるセメント形成が*Anxa5*^{+/+}に比べて少なく、歯根断面積が有意に小さかった(図2上、点線は歯根セメント質を示す)。歯根膜組織においては、*Anxa5*^{+/+}に比べて*Anxa5*^{-/-}では歯根膜の幅が有意に広がった。また、偏光顕微鏡観察下においてコラーゲン線維束に由来する複屈折性強度の低下が認められた(図2下)。以上の結果から、*Anxa5*の機能的欠損により、歯牙萌出後の根尖部セメント形成が低下し、咬合による機械的刺激の受容によって本来生じる歯根膜基質線維形成が未熟となる可能性が推測された。

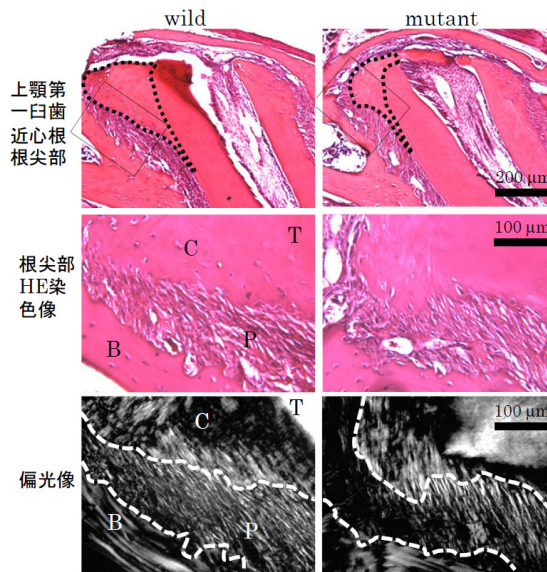


図2. 7週齢*Anxa5*^{-/-}マウスにおける上顎第一臼歯セメント質の減形成
B. 歯槽骨; C. セメント質; T. 歯根; P. 歯根膜

(5) *Anxa5* 欠損による長管骨の形態形成への影響

*Anxa5-LacZ*は骨表面などで強く発現していた。そこで、*Anxa5*^{+/+}、*Anxa5*^{+/-}、*Anxa5*^{-/-}の3遺伝子型マウスの骨形態計測を行った。骨長や骨幹部の形態に有意な差は認められないが、*Anxa5*^{-/-}では腱や靭帯が付着する部位で特異的な骨形態の違いが観察された。この違いは若齢マウスでは認

められず、運動に伴い生じる変化であることが推測された。

(6) 骨と腱・靭帯付着部における*Anxa5*の機能

*Anxa5*の骨リモデリングへの関与をさらに詳細に解析するため、*in vitro*で腱細胞と骨芽細胞の関係を調べた。

まず腱細胞の初代培養法を検討した。尾腱組織を採取し、コラーゲンゲル培養により出現する細胞を調べたところ、*Scleraxis*や*Tenomodulin*など腱細胞マーカーを多く発現しており、腱細胞の特徴を有することが確認された。野生型マウスから得られたこの初代腱細胞の培養上清を骨芽細胞系のMC3T3-E1細胞に添加すると、MC3T3-E1のALP活性が低下すると共に、DAPIで濃染される顆粒が出現した。免疫染色とWestern blot解析によりcleaved caspase-3の発現が認められたことから、腱細胞に由来する可溶性因子によって骨芽細胞のアポトーシスが誘導されることが示唆された。

現在、3遺伝子型のマウスから腱細胞を培養し、骨芽細胞への添加を行い、*Anxa5*^{-/-}マウスにおける腱付着部の骨形態の変化における*Anxa5*の関与を明らかにするべく検討を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, Nakashima K, Nifuji A. Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Patterns*. 13: 84-90, 2013. (査読有)

② Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from iPSCs or ESCs. *Nature* 494: 100-104, 2013. (査読有)

③ Shimada A, Komatsu K, Nakashima K, Pöschl E, Nifuji A. Improved methods for detection of β -galactosidase (*lacZ*) activity in hard tissue. *Histochem Cell Biol*. 137:841-847, 2012. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

① Uda M, Araki R, Hoki Y, Sayama M, Nakamura M, Andou S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. Limited and comparable immunogenicity of terminally differentiated cells derived from both iPSCs and ESCs. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場, 福岡。

② Kamiunten T, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Expression of three histone 3 lysine 9 methyltransferases during development of mouse molar. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場、福岡.

③ Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Imaizumi K, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Histone 3 lysine 9 methyltransferases G9a, GLP and SETDB1 are predominantly expressed in the prehypertrophic chondrocytes during the growth plate chondrocyte development. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場、福岡.

④ Wada S, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Nakashima K, Nifuji A. Soluble factors may mediate signals from tendons to bone. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場、福岡.

⑤ 小松浩一郎、島田 明美、出野 尚、柴田 達也、中島 和久、二藤 彰. アレンドロネートの細胞内取込みによる骨形成の促進. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 2012年7月19日、京王プラザホテル、東京.

⑥ Shimada A, Shibata T, Komatsu K, Ideno H, Nifuji A. Pre-incubation of whole teeth in collagen gel enrich progenitor cells of mouse periodontal ligament. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日、パシフィコ横浜会議センター、神奈川

⑦ Shimada A, Komatsu K, Nakashima K, Amizuka N, Brachvogel B, Nifuji A. Annexin a5 Expression Regulates Periodontal Tissue and Cementum Formation. 2011 Annual Meeting of ASBMR, 2011年9月19日, San Diego, California, USA.

⑧ 島田 明美、小松浩一郎、中島 和久、網塚 憲生、Bent Brachvogel、二藤 彰. 歯周組織形成過程におけるAnnexin a5の発現と機能. 第29回日本骨代謝学会学術集会, 2011年7月28日, 大阪府、大阪国際会議場

⑨ 小松浩一郎、島田 明美、出野 尚、柴田 達也、二藤 彰. エンドサイトーシスを介した骨芽細胞の生存と分化に対するアレンドロネートの影響. 第28回日本骨代謝学会学術集会, 2010年7月23日, 京王プラザホテル, 東京.

⑩ 島田 明美、小松浩一郎、二藤 彰. 硬組織における β -Galactosidase (LacZ) レポーター遺伝子発現検出法の検討. 第28回日本骨代謝学会学術集会, 2010年7月23日, 京王プラザホテル, 東京

⑪ Shimada A, Shibata T, Komatsu K, Nifuji A. Collagen Gel Culture Accelerates Proliferation of Mouse Periodontal Ligament Cells. 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010年7月17日, Centre Convencions Internacional Barcelona, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 明美 (SHIMADA AKEMI)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：00339813

(2) 研究分担者

二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：00240747

(3) 連携研究者

なし