

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 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792046

研究課題名（和文）新規歯周組織形成細胞マーカーによる歯周組織再生過程

研究課題名（英文）Morphological analysis of regeneration of periodontal ligament in newly developed clinical rat models

研究代表者

河野 承子（KAWANO SHOKO）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10397127

研究成果の概要（和文）：

我々は新たに咬合性外傷、歯の矯正移動のラット臨床実験モデルを開発し、アクアポリンを指標にして、実験的咬合性外傷、歯の矯正移動において歯周組織構成細胞の動態を明らかにした。咬合性外傷では、アクアポリン陽性細胞は硝子様変性部位の処理および歯根膜の再生時に、矯正移動時では、歯根膜線維芽細胞の運動性活性が上がったときに一過性に細胞膜上に発現していた。これらの結果から、アクアポリンは歯根膜細胞の運動性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We developed rat clinical study models of occlusal trauma and orthodontic tooth movement and demonstrated behavior of aquaporin positive periodontal ligament cells in the experimental models. In the occlusal trauma model, transitory aquaporin expression in the fibroblast-like cells was observed during the removal of the hyalinized tissue and the regeneration of the periodontal ligament. In the orthodontic tooth movement model, the aquaporin expression appeared to be temporarily increased on the membrane of the fibroblast-like cells with the activation of PDL cell motility. Our results suggest that aquaporin is involved in periodontal ligament cell motility during occlusal trauma and orthodontic tooth movements.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：咬合性外傷 矯正移動 再植 歯根膜

1. 研究開始当初の背景

小児期の歯科外傷（亜脱臼、完全脱臼、埋入）により、永久歯がアンキローシスを起こすと、歯槽突起の正常な発育が妨げられることがある。このような症例では永久歯の矯正

的挺出は難しく、補綴処置の際も歯槽骨不足のため難症例になることが多い。また、乳歯のアンキローシスでも低位や埋伏がおこり、永久歯の萌出障害の原因となる。歯のアンキローシスは小児期の歯列、咬合、顎顔面の発

育期において大きな問題となっている。このような歯根膜の骨性癒合あるいは矯正移動にともなう歯根膜の改変の機序の解明については歯周組織の特徴を考慮した解析が必要である。しかしながら、これまで歯周組織構成細胞については特有なマーカー遺伝子・タンパク質がなかった。

歯胚を顎骨の形成やその存在の影響を受けない皮下部や腎臓カプセルに移植すると固有歯槽骨が歯周靭帯とともに形成され、固有歯槽骨は歯小嚢に由来する歯周靭帯依存性の組織と考えられている。また、臨床的には、新生仔の乳歯歯胚、または、永久歯歯胚を実験的に除去すると、歯槽骨が発育せず(Landsberger, 1911; Baker, 1941)、ヒト無歯症では、顎骨の基底部分は通常大きさに発育するが、歯槽突起が欠如することが報告され(Willner, 1936; Eisenon, 1956; Farmer and Lawton 1966)、固有歯槽骨が通常長管骨などと異なる発生的特殊性を持つことを示している。このように歯槽骨は生体の中でも特殊な骨組織でありながら、これまでその発生機序、創傷の治癒過程は旧来の骨組織分化マーカーを用いた解析が行われているのみで、歯槽骨の発生的特殊性を考慮に入れた解析は全くなされていなかった。

アクアポリンは水を特異的に通過させるチャンネルとして 1990 年代初期に発見された水チャンネルである。我々は、ラット歯牙発生に関連する遺伝子・タンパクをスクリーニングし、歯周組織形成に関わる細胞群がアクアポリン 1 を特異的に発現していることを遺伝子・タンパクレベルで発見した。また詳細な組織発生的検討の結果、セメント質、歯根膜、固有歯槽骨の形成にアクアポリン 1 陽性細胞が関与することを示し、特にセメント質および固有歯槽骨形成に関しては、微細な突起を持ったアクアポリン 1 陽性線維芽細胞が大きく関与することを明らかにした。

我々の歯牙発生におけるアクアポリン 1 陽性細胞の動態の研究の結果、アクアポリン 1 陽性細胞は固有歯槽骨形成の初期段階から歯槽骨表面の線維芽細胞に特異的に発現するが、これまで歯槽骨を形成すると考えられている骨芽細胞にはアクアポリン 1 の発現は見られなかった。すなわち、アクアポリン 1 は固有歯槽骨を形成する細胞の特異的マーカーであり、かつ骨芽細胞陰性の遺伝子・タンパクであることがわかった。

固有歯槽骨には歯根膜由来の線維が埋入し、この線維はセメント質同様に線維の周辺部のみが石灰化している。これまで、歯根膜中には異なる間葉系細胞集団が存在し、この中のある種の細胞が骨芽細胞あるいはセメント芽細胞に分化して、歯槽骨形成とセメント質形成を促すと考えられていた。しかしながら、骨芽細胞がどのように歯根膜線維を歯

槽骨に埋め込んで歯槽骨表面の束状骨が形成されるのかは全く不明であった。

2. 研究の目的

歯周組織は、他の同様組織(靭帯、骨)とは異なり、歯の存在に依存するという特殊性を有し発生的由来も異なる。歯周組織の病態の機序の解明には新しい歯周組織特異的なマーカーが不可欠であった。我々が新たに同定した、セメント質、固有歯槽骨、歯根膜線維を形成する細胞の特異的マーカーである水分子チャンネルの一つであるアクアポリン 1 を用いて、歯周組織での発生的アクアポリン陽性細胞のデータをもとに咬合性外傷、矯正歯牙移動、および、実験的アンキローシスの病態下における歯根膜細胞の動態をアクアポリンタンパクの発現を指標にして明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 咬合性外傷モデルラット臼歯におけるアクアポリン 1 陽性細胞の動態の解明。
ラット上顎臼歯に 0.5mm ワイヤをレジン合着し、対合歯歯根膜を経時的に観察した。パラフィン切片を作成し、H-E 染色、AZAN 染色を行い、束状骨の形成過程を組織形態学的に明らかにした。
- (2) アクアポリン 1 の光線顕微鏡的、電子顕微鏡的免疫細胞化学
凍結切片に対して、アクアポリン 1 抗体による免疫染色を行った。一部の試料は免疫染色後、樹脂包埋し、電顕観察を行った。この際、アクアポリン 1 陽性のセメント芽細胞、束状骨形成細胞の細胞動態とコラーゲン線維の関係について検討した。
電子顕微鏡観察では、歯根膜線維とアクアポリン 1 陽性細胞との位置的関係に着目した。
- (3) 歯周組織細胞マーカーとアクアポリン 1 陽性細胞の共発現の検討
歯周組織細胞のマーカーである OPN (osteopontin)、BSP(bone sialoprotein)、OCN (osteocalcin)、TNAP(Tissue-non-specific Alkaline phosphatase)とアクアポリン 1 の共存関係を二重免疫細胞化学で検討した。
- (4) 矯正歯牙移動モデルにおけるアクアポリン 1 陽性細胞の動態の解明。
ラット第 1 臼歯間に矯正ワイヤを装着し、歯牙移動時における歯根膜改変におけるアクアポリン 1 陽性細胞の細胞動態を観察した。
- (5) 実験的アンキローシスモデルにおけるアクアポリン 1 陽性細胞の動態の解明
ラット臼歯を脱臼させ、再植し、アンキロ

一シスが起こる経緯とアンキローシスが起こらない治癒過程での歯周組織細胞の動態をアクアポリン1をマーカーとして追跡した。

4. 研究成果

(1) 実験的咬合性外傷モデル

実験的咬合性外傷モデルにおける歯周組織の組織学的変化をアクアポリン1を指標にして歯周組織細胞における発現の変化、および、陽性細胞の細胞動態について観察した。咬合挙上1日後に、歯根膜の一部にアクアポリン1陽性細胞を認めたことから、外傷刺激により歯根膜細胞の運動性が上がりアクアポリン1免疫活性が上昇した可能性が示唆された。また、咬合挙上3日後で硝子様変性が出現し、硝子様変を取り囲むようにアクアポリン1陽性線維芽細胞が密集していたことは、アクアポリン1陽性線維芽細胞が変性物質の処理に何らかの関与をしている可能性が示唆された。5日後には硝子様変成部の被胞化が起こり、アクアポリン1陽性細胞は硝子様変性部を取り囲むように局在していた。7日後には硝子様変性部の内部に向かってアクアポリン1陽性細胞が突起を伸ばす像が観察された。また、咬合挙上14日後では硝子様変性像が消失し歯根膜幅に回復が見られたにもかかわらず、歯根膜全体にアクアポリン1陽性細胞が存在したことは、歯根膜線維の再生にアクアポリン1陽性歯根膜線維芽細胞が関与している可能性が示唆された。

微細形態学的には免疫電顕所見では、硝子様変性部に遊走する線維芽細胞が糸状仮足を伸ばす像が観察され、糸状仮足の先端部分にアクアポリン1免疫反応が観察された。

アクアポリン1は細胞の形態変化、移動に関わっているとされ、単なる水輸送にとどまらない細胞に普遍的な役割が示唆されている。これらの結果から、歯周組織維持、再生に関わる細胞群が、水分子チャネルの一つであるアクアポリン1を特異的に発現していることを明らかにし、アクアポリン1陽性細胞が歯根膜組織の再生に関与することが明らかになった。

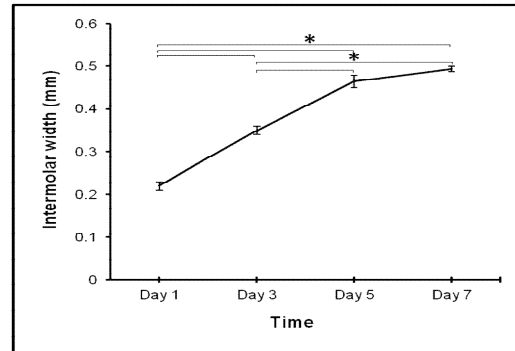
(2) 歯牙矯正移動実験モデル

歯牙矯正移動実験モデルでは炎症性変化を伴わない至適矯正力実験モデルを開発し、歯牙移動における歯根膜組織でのアクアポリン1発現変化を解析した。

5cNの矯正力では矯正移動した実験群で、矯正移動開始1日後には、歯根膜線維芽

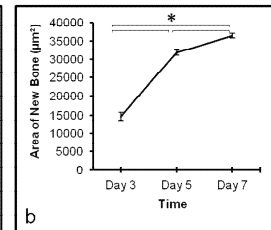
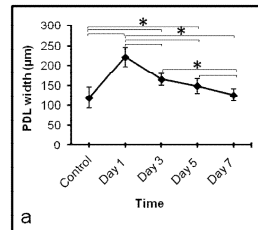
細胞のアクアポリン1免疫陽性反応が上昇し三日後には歯槽骨表面の線維芽細胞様細胞

が強い免疫陽性反応を示した、五日後には歯槽骨表面にアクアポリン1陽性線維芽細胞とアクアポリン1陰性骨芽細胞が観察されるようになり、矯正移動七日後にはアクアポリン1の免疫反応は対照群レベルまで戻った。



これらの結果から、アクアポリン1は、矯正移動時の歯根膜線維芽細胞の運動性活性が上がったときに一過性に細胞膜上に発現する可能性が示唆された。

(3) 実験的アンキローシスモデル



実験的アンキローシスモデルでは、歯牙再植後一日後では、歯根膜線維の断裂像が観察され、歯根セメント質上のアクアポリン1陽性細胞はアクアポリン1陽性を示し、歯根セメント質上を覆っていたが、再植後三日目になると、歯根膜線維の変性が見られ、歯根分岐部以外のアクアポリン陽性細胞はほとんど消滅していた、七日後でも、歯根セメント質上にアクアポリン1陽性細胞の回復は観察されなかった。歯根膜線維、およびセメント質の再植後の回復は二週目以降に起こると考えられる。

本研究では、歯周組織が生体の中でも特殊な靭帯組織であるのとらえ、ラット臨床モデルを用いて、旧来の骨・結合組織分化マーカーとは異なる全く新しいマーカーを用いて解析を行った。水チャネル分子の一つであるアクアポリン1を固有歯槽骨形成細胞（骨芽細胞陰性）、歯根膜線維芽細胞、セメント芽細胞のマーカーとして発見したのは我々の研究グループであり、本研究の遂行に必須の臨床ラットモデル（咬合性外傷、矯正移動、骨性癒合）を用いてアクアポリン1陽性細胞の動態をタンパクレベルで追求し、その過程で、新しい咬合性外傷、矯正移動、骨性癒合臨床ラットモデルラットに関する術式を開

発し基礎データを得ることができた。

今後予想される歯根膜再生治療の発展のためには、健全な状態における歯根膜細胞集団とその機能および創傷の治癒過程におけるそれらの細胞の動態について解明されることが必要である。実験的アンキローシス、矯正および咬合性外傷における歯周組織再生実験によりその破壊、修復の機構に関して新たな知見をもたらしたとともに、将来の歯周組織再生療法につながる基礎データを得ることができたと考えられる。

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)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Humayra Binte Anwar, Kawano Y, Kawano S, Nozawa-Inoue K, Izumi K, Harada F, Saito I, Maeda T: Reaction of AQP-1 positive cells in rat periodontal ligament during experimental tooth movement. 平成 23 年度新潟歯学会第 2 回例会, 新潟, 2011. 11. 12, 新潟歯学会雑誌, 41(2): 128-129, 2011.
- ② Anwar Humayra Binte, 河野芳朗, 木下-河野承子, 野澤-井上佳世子, 齋藤 功, 前田健康: 実験的矯正移動にともなうアクアポリン 1 陽性細胞の観察. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岐阜, 2011. 9. 30- 10. 2, 歯科基礎医学会雑誌, 53 (Suppl.): 151, 2011.
- ③ 大島邦子, 三富智恵, 河野承子, 飯澤二葉子, 早崎治明: Evidence Based Dentistry in Pediatric Dentistry(2) 乳歯用既成冠. 第 28 回日本小児歯科学会北日本地方会大会, 郡山, 2010.12.3. 小児歯科学雑誌 49(1) (Suppl.): 66, 2011.
- ④ 三富智恵, 河野芳朗, 河野承子, 田口洋, 早崎治明, 前田健康: アルキル化抗腫瘍薬によるラット歯根形成障害に関する組織形態学的解析. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2010. 9. 20-22, 歯科基礎医学会雑誌, 52 (Suppl.): 151, 2010.
- ⑤ 河野承子, 河野芳朗, 三富智恵, 田口洋, 早崎治明, 前田健康: 実験的咬合性外傷における歯周組織破壊・変化に伴うアクアポリン 1 発現の変化. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2010. 9. 20-22, 歯科基礎医学会雑誌, 52 (Suppl.): 148, 2010.
- ⑥ 河野承子, 河野芳朗, 三富智恵, 田口洋: 実験的外傷歯の歯周組織における AQP1 陽性細胞の動態. 第 48 回日本

小児歯科学会大会, 名古屋, 2010. 5. 19-20, 小児歯誌, 48(2): 338, 2010.

- ⑦ 三富智恵, 河野芳朗, 河野承子, 田口洋: 抗腫瘍薬がラット臼歯歯根形成におよぼす影響. 第 48 回日本小児歯科学会大会, 名古屋, 2010. 5. 19-20, 小児歯誌, 48(2): 246, 2010.
- ⑧ 河野芳朗, 木下-河野承子, 鈴木晶子, 野澤-井上佳世子, 前田健康: ラット切歯におけるセメント芽細胞の運命. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術大会, 岩手, 2010. 3. 28-30, 解剖学会雑誌, 85 (Suppl.):110, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 承子 (KAWANO SHOKO)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 10397127

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし