

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（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792099

研究課題名（和文） SVCTによるアスコルビン酸輸送を介した歯周病態制御機構の解明と新規治療戦略

研究課題名（英文） Examination of pathogenesis of periodontal disease through ascorbic acid transporter SVCTs.

研究代表者

岩崎 剣吾（IWASAKI KENGO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：40401351

研究成果の概要（和文）：アスコルビン酸はコラーゲン代謝に關与する重要な水溶性ビタミンである。本研究は歯周組織の再生に重要な役割を持つ歯根膜においてアスコルビン酸代謝を司るアスコルビン酸輸送体である SVCT が広く発現していることを見だし、この結果は線維性結合組織である歯根膜の恒常性維持、さらには歯周病の病態形成に寄与していることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Ascorbic acid is water-soluble vitamin which has important role in collagen metabolism. This study revealed that SVCTs, ascorbic acid transporter, expressed widely in collagen-rich connective tissue, periodontal ligament. This result suggests that SVCT may contribute to keeping of homeostasis of periodontal tissues and to pathogenesis of periodontal disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1900000	570000	2470000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：幹細胞、アスコルビン酸代謝、歯根膜

1. 研究開始当初の背景

歯根膜はコラーゲン線維に富んだ線維性結合組織である。歯根膜組織は人間の体内でも最もコラーゲン代謝の非常に活発な組織の一つであり、コラーゲン線維が歯根膜の機能に重要な役割を果たしている。また歯根膜は幹細胞を含み歯周組織の再生においても重要な役割を持っていることが明らかとなっている。

歯周病は慢性炎症による歯周組織の破壊を主な特徴とし、進行した歯周炎では支持組織の喪失により歯を失う。この失われた組織歯周組織を再生させ、機能させることが歯周組織再生両方の目的であるが、いまだ十分な再生治療は開発されていない。

歯根膜はセメント質と歯槽骨を形成するセメント芽細胞、骨芽細胞へと分化する能力をもつ幹細胞を内包し、組織修復や恒常性維

持の為に重要な役割を担っている。また、歯周組織再生を考える場合にも歯根膜中の幹細胞を利用すること考えられている。

アスコルビン酸はコラーゲン代謝の補酵素としてヒトにおけるコラーゲン産生に重要な役割を担っている。近年アスコルビン酸を細胞内へ輸送するトランスポーターとして **Sodium-dependent Vitamin C transporter (SVCT)** が同定された。SVCTには **SVCT1**, **SVCT2** の二つのサブタイプがあり、それぞれの役割に違いがあることが明らかとされている。しかしながら歯周組織におけるその発現については全く研究されていない。

2. 研究の目的

SVCTの歯根膜における発現およびSVCTを介するアスコルビン酸代謝の歯周組織における役割を検討すること。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜幹細胞の単離・培養

健全ヒト抜去歯より歯根膜組織を採取し、コラーゲナーゼ/ディスパーゼ中で組織を酵素消化する。その後セルストレーナーを用いて細胞塊を除去した後、間葉系幹細胞培養液 (MSCGM, Lonza) 中で培養した。

(2) 細胞表面抗原発現の検討

細胞表面に発現するタンパクの検討には Flowcytometry を用いた。すなわち、細胞を Trypsin-EDTA にて剥離回収し 4%PFA にて固定後、2%BSA-PBS 中でブロッキング、各種蛍光色素で標識された抗体を作用させ、洗浄後フローサイトメーター (FACS Aria, BD Bioscience) にて解析した。

(3) 細胞分化誘導

ascorbic acid, beta-グリセロリン酸, dexamethasone から成る骨芽細胞分化培地に培養液を交換し2週間培養した。その後 von kossa 染色した。脂肪細胞分化には脂肪細胞分化培地 (Lonza) を用いて4週間培養し Oil Red O 染色を施し脂肪細胞を可視化した。軟骨細胞培養には軟骨細胞分化培地 (Lonza) を用いて4週間、ペレット培養を行い凍結切片作成後、アルシアンブルー染色を行った。

(4) 血管内皮細胞と歯根膜幹細胞の共培養

マトリゲル上に血管内皮細胞株 HUVEC を播種し、PKH26 にてラベルした歯根膜幹細胞を積層して添加した。マトリゲル上の tube 様構造形成を蛍光顕微鏡にて撮影した。

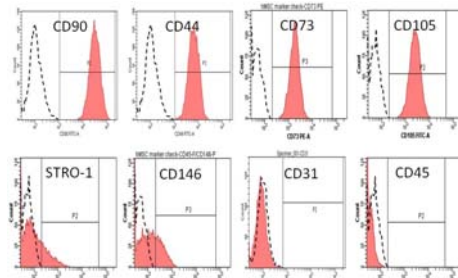
(5) マウス組織における SVCT1, SVCT2 免疫染色

7週齢マウス下顎臼歯部のパラフィン切片

を過法に従って作成した。脱パラ、親水処理後抗原賦活化し、一次抗体として goat-anti-mouse SVCT1, goat-anti-mouse SVCT2 を使用し、二次抗体として goat-anti-mouse IgG-HRP を用い、3,3'-Diaminobenzidine (DAB) にて発色、顕鏡した。

4. 研究成果

歯周組織再生過程で重要な役割を有していると考えられる歯根膜細胞においてアスコルビン酸代謝を司るトランスポーターである SVCT1, SVCT2 の役割を *in vitro* で検討した。まず、歯根膜において組織修復に重要である歯根膜幹細胞の培養を確立した。抜去歯より歯根膜組織を採取し、コラーゲナーゼ/ディスパーゼにより組織を消化し、これを洗浄、ストレーナーにて細胞塊を除去しコロニーを形成しながら増殖する細胞を得た。これらの細胞について FACS 解析を行ったところ間葉系幹細胞のマーカーである CD146, CD90, CD44, CD105, CD73 陽性であり、血管内皮細胞マーカーCD31 陰性、白血球マーカーCD45 陽性であった。

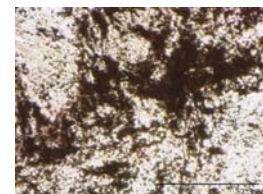


〈Flowcytometry の結果〉

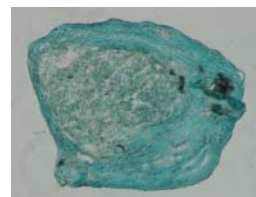
さらにこれらの細胞を骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へそれぞれ特異的な培養条件で分化誘導したところ、全ての細胞への分化が認められ得られた細胞が多分化能を示す幹細胞であることが明らかとなった。



〈脂肪細胞分化〉

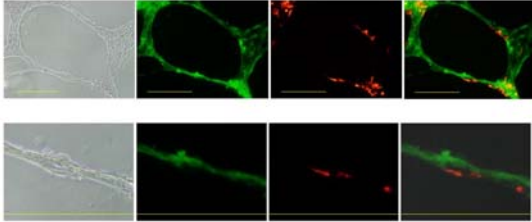


〈骨芽細胞分化〉



〈軟骨細胞分化〉

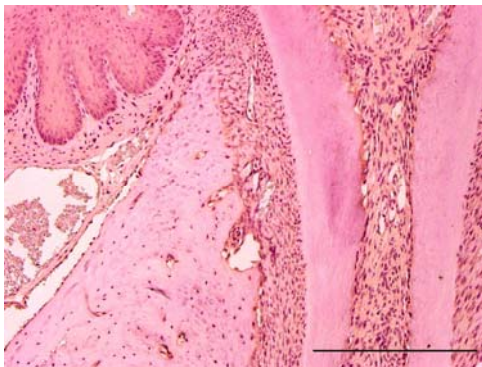
また、FACS 解析では pericyte のマーカーである NG2, CD140b 陽性細胞が多く認められ、さらにマトリゲル上で血管内皮細胞と共培養すると血管内皮細胞の形成する network 構造に寄り添うように接着し、歯根膜細胞の pericyte 様性質の可能性が示唆された。



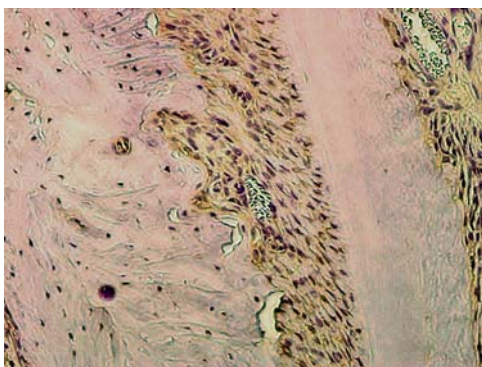
(赤: 歯根膜幹細胞、緑: 血管内皮細胞)
 <network 形成 における歯根膜幹細胞>

RT-PCR 法によって SVCT1, SVCT2 の遺伝子発現を検討したところ、歯根膜幹細胞は両者を発現する結果が得られた。

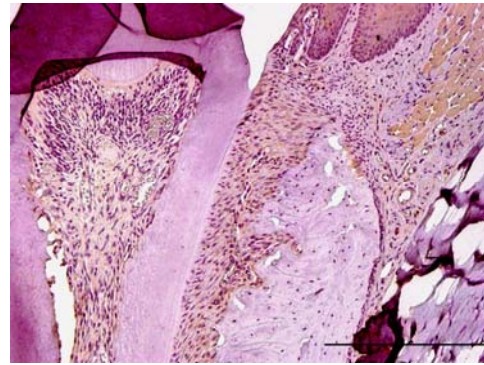
また、マウス歯周組織切片上で SVCT1, SVCT2 の免疫染色を行ったところ、いずれも歯根膜に広く発現が見られる事が明らかとなった。



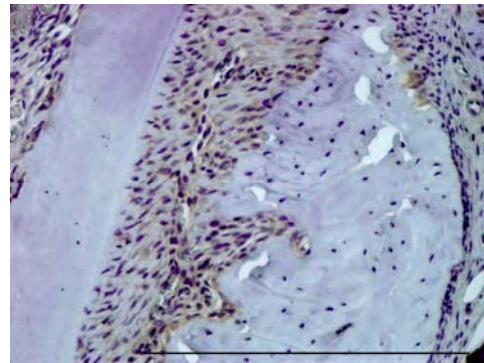
<SVCT1 発現 弱拡大>



<SVCT1 発現 強拡大>



<SVCT2 発現 弱拡大>



<SVCT2 発現 強拡大>

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 1 件)

1. Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. Archives of Oral Biology. 査読有、56 巻 380-388 ページ 2011 年

[学会発表] (計 3 件)

1. 岩崎剣吾 歯根膜幹細胞転写羊膜を用いた歯周組織再生治療の可能性について、第 54 回秋季日本歯周病学会学術大会 2011 年 9 月 24 日 下関
2. 岩崎剣吾 細胞培養による歯根膜幹細胞の血管平滑筋様変化について、第 54 回春季日本歯周病学会学術大会、2011 年 5 月 28 日 福岡
3. 岩崎剣吾 培養歯根膜幹細胞の pericyte としての機能解析、第 53 回秋季日本歯周

病学会学術大会 2010年9月18日 高松

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 剣吾 (KENGO IWASAKI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科 ナノメディスン(DNP)講座・助教
研究者番号：40401351

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：