

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592880

研究課題名(和文) 歯根膜由来上皮 間葉相互作用におけるセメント質再生に関する研究

研究課題名(英文) The study of cementum regeneration in epithelial-mesenchymal interaction

研究代表者

下西 充 (Shimonishi, Mitsuru)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：40302153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：マラッセの上皮遺残細胞および歯根膜由来線維芽細胞を混培養すると、エナメルマトリックスタンパクのアメロゲニン、アメロラスチンおよびエナメルマトリックスプロテアーゼのMMP-20、KLK 4の誘導が確認でき、上皮 間葉相互作用により石灰化の誘導があることが確認できた。また、混培養したサンプルの上皮細胞はBrdUの取り込みが多く、さらに、アポトーシスの誘導因子であるBaxが強く発現することが確認され、細胞の代謝が活発に行われていることがわかった。これらのことは、歯根膜由来上皮 間葉相互作用によって、マラッセの上皮遺残細胞は代謝を活発するとともに、有細胞セメント質の形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Both the epithelial cells of Malassez and periodontal ligament fibroblasts were co-cultured in the same dish. The interactions between the epithelial cells of Malassez and periodontal ligament fibroblasts current induced the expression of amelogenin, ameloblastin, MMP-20 and KLK 4 in the epithelial cells of Malassez.

We also showed that the epithelial cells of Malassez which incorporated BrdU expressed Bax strongly in co-cultured cells, suggesting that the epithelial-mesenchymal interactions enhance cell turnover in the epithelial cells of Malassez.

These results indicate that epithelial-mesenchymal interactions may induce cell turnover and cellular cementum formation in the epithelial cells of the rests of Malassez.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学 セメント質 マラッセの上皮遺残

## 1. 研究開始当初の背景

2007年、人工歯胚作製技術の開発によりマウスの抜歯窩で人工歯胚が成長することが、辻らにより Nature Methods オンライン版に報告された。この研究により使用された細胞は胎児由来であるため、臨床応用するには新たな問題が残った。すなわち、胎児由来ではなく、患者本人から入手可能な幹細胞を用いて歯を再生できる技術開発が求められている。さらに、ヒトへの応用となると、実際の臼歯が萌出するためには通常約6年要するため、歯胚から歯の再生を行うことは、現実的には難しいものと考えられる。

ヒトの歯が有髄、無髄に関わらず、十分機能を果たすためには、歯根膜の存在が必要である。また、歯周病で歯が失われる過程では、歯槽骨の吸収より先に歯根膜の破壊が起こると考えられる。歯根膜は歯槽骨と歯のセメント質の間に存在し、歯を支持する組織である。歯根膜の破壊が生じた後、セメント質はそのまま残るが、そのときのセメント質は歯根膜の足場としての機能を失っているため、歯を健全な状態に維持できない。したがって、新たに歯根膜の足場となるセメント質の再生が必要となる。

骨の再生はこれまで多くの研究がなされ、研究成果も得られているが、セメント質の再生はいまだ不明な点が数多く残されている。これは、骨とセメント質が同じ硬組織であるが、もともと発生の過程が大きく異なるからである。

歯の発生は口腔上皮の肥厚にはじまり、歯原性由来上皮 間葉系細胞の相互作用により発生が進行する。最終的には歯原性由来上皮細胞のヘルトヴィッチの上皮鞘の断裂が生じて歯根を完成させていく。

歯の石灰化は骨と異なり、上皮細胞が大きく関与する。さらに、歯のセメント質形成とエナメル質形成において異なることは、同じ歯原性由来上皮細胞に対する間葉細胞が異なる点である。セメント質はいずれ歯根膜に代わる歯小囊由来線維芽細胞が、エナメル質は歯乳頭存在する象牙芽細胞が相互に関与してそれぞれの石灰化を誘導する。

人工歯胚の実現をもたらしたのは、歯原性由来上皮 間葉系細胞の細胞間相互作用を利用したからに他ならない。われわれは、セメント質に焦点をあてて細胞間相互作用を応用する着想に至ったのもここからである。これまで、われわれはヒト歯根膜組織片から上皮細胞および同由来線維芽細胞を同一シャーレ内で培養し、その細胞間相互作用に関する研究を行ってきた。この培養系は、はじめ線維芽細胞を培養した後、培地を独自に開発した無血清混合培地に交換することによって上皮細胞を誘導し、細胞間の境界が明瞭な状態で混培養ができる。

本研究の培養系における歯根膜由来上皮細胞は歯肉由来上皮細胞とは異なり、石灰化に関与するタンパクを発現することが確認

されている(Shimonishi et al., J Periodont Res, 2007; 43: 456-465)。また、混培養における上皮細胞 線維芽細胞間境界部の上皮細胞側で骨の石灰化タンパクのオステオカルシンの発現が、線維芽細胞側で骨シアロタンパクの発現が強くみられた(Shimonishi et al., J Periodont Res, 2008; 43: 64-75)。このことは、上皮細胞 線維芽細胞間相互作用が石灰化に大きく関与することを示唆するものである。また、さらに、細胞間相互作用により、基底膜の構成成分が上皮細胞 線維芽細胞間境界部で発現し(Shimonishi et al., Eur. J Oral Sci, 2005; 113: 34-40)、基底膜のリモデリングに関与する酵素 MMP-2 および MMP-14 も同定され(Shimonishi et al., J Periodont Res, 2010; 45: 309-316)、歯根膜の恒常性維持にマラッセの上皮遺残が関与する可能性があることも明らかにしてきた。

これまでの研究成果を発展させるには、これまでわかってきた *in vitro* の状態を、もう一度、*in vivo* の状態へフィードバックすることが必要である。生体内でヘルトヴィッチの上皮鞘の断裂が生じてセメント質の形成が行われていくことから、混培養の境界部を破壊して相互作用による細胞の変化を検討する。

## 2. 研究の目的

われわれはヒト歯根膜組織片から上皮細胞および同組織由来線維芽細胞を同一シャーレ内で培養し、単独培養した細胞に比べ、共培養した細胞の方が、細胞間の境界部で石灰化に関与するタンパクの誘導がみられた。元来、セメント質の発生は、上皮組織のヘルトヴィッチの上皮鞘が断裂することから始まり、セメント芽細胞の誘導がなされて起きるため、セメント質再生を研究する上で歯原性由来上皮細胞の存在、さらに、上皮細胞 線維芽細胞間相互作用は重要な役割を持つものと思われる。本研究の目的は、上皮細胞 線維芽細胞間の境界部の断裂を促し、細胞間相互作用によるセメント質形成の石灰化におけるメカニズムの解明を行うことである。

## 3. 研究の方法

(平成23年度)

東北大学病院口腔外科外来で抜歯した第三大臼歯より歯根膜組織を採取し、無血清混合培地にて同一組織片より上皮細胞および線維芽細胞を培養した。なお、患者からは事前に抜去歯が実験に供されることの同意を得るとともに、歯学研究科倫理委員会にて本研究の承認を受けるものとした。その後、酵素により細胞を回収し、上皮細胞および線維芽細胞を混ぜて、再度、ディッシュに細胞を播種すると、上皮細胞は集団を形成し線維芽細胞の中に島状に分布した。この混培養した細胞をサンプルとして用いた。コントロールとして、上皮細胞のみ培養したものと、線

維芽細胞のみを培養したものをを用い、比較検討した。

歯牙形成の基本的メカニズムである歯原性上皮と間葉の相互作用には、従来、生物全体のパターン形成をつかさどるとされてきた基底膜の細胞外マトリックスや骨形成タンパクの分子群が関与して、歯の形と構造を制御していることが明らかになりつつある。これまで、さまざまな研究者がセメント質の形成にエナメルマトリックスタンパクの関与を報告している。エナメル質の石灰化に際し、歯原性由来上皮細胞であるエナメル芽細胞は主にアメロジェニンやアメロプラスチンのエナメルマトリックスタンパクを合成、分泌し、MMP-20やKLK4のエナメルマトリックスプロテアーゼによってこれらエナメルマトリックスが分解されてエナメル質の結晶が成長していく。この際のエナメルマトリックスタンパク(アメロジェニン、アメロプラスチン)およびエナメルマトリックスプロテアーゼ(MMP-20、KLK4)の発現を免疫染色法、タンパクの定量化をウェスタンブロット法にて、また、遺伝子の発現をInsitu hybridization法および遺伝子の定量化を半定量的RT-PCR法にて検討を行った。

(研究計画を遂行するための研究体制)

本研究では東北大学病院口腔外科外来より歯牙抜去後、連絡をもらい、代表者、分担者(1名)、大学院生(2名)で直ちに培養を行う体制がすでにつくられていた。

免疫染色等の実験、培養細胞から抽出した遺伝子の管理、および分析はそのままこれらの者が行った。この体制は、平成24年度以降も引き継がれた。

(平成24年度以降)

平成24年度以降においても、平成23年度の研究計画を随時遂行していった。

さらに、エナメルマトリックスタンパクおよび石灰化タンパクの発現を確認したら、アポトーシスに関するBcl-2ファミリータンパクのBax(アポトーシス誘導タンパク)とBcl-2(アポトーシス抑制タンパク)の発現を解析した。さらに、BrdU(5-bromo-2'-deoxy-uridine)の核内取り込みによって細胞増殖を起こす細胞を確認するとともに、TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling)法にてアポトーシスを起こす細胞も確認し、アポトーシス誘導の更なる検討を行った。

#### 4. 研究成果

混培養したサンプルはエナメルマトリックスタンパクのアメロジェニン、アメロプラスチンおよびエナメルマトリックスプロテアーゼのMMP-20、KLK4の誘導が確認でき、上皮間葉相互作用により石灰化の誘導があることを報告した。

さらに、アポトーシス抑制性タンパクの

Bcl-2は上皮細胞および線維芽細胞で弱く発現した。アポトーシス促進性タンパクBaxは上皮細胞で強く発現し、線維芽細胞で発現はみられなかった。混培養したサンプルの上皮細胞は線維芽細胞に比べBrdUの取り込みが多くみられ、上皮細胞が強く増殖していることが確認された。混培養したサンプルの上皮細胞はTUNEL陽性核を示す細胞が観察された。一方、線維芽細胞にTUNEL陽性核を示す細胞は観察されなかった。BrdUの取り込みが多く、細胞増殖能が高いにも関わらず、上皮細胞の増殖がみられないことから、アポトーシスが引き起こされcell turnoverが活発に行われていることがわかった。

cell turnoverが活発に行われると同時に石灰化の誘導も引き起こされることが確認されたことから、歯根完成後の有細胞セメント質の形成にマラッセの上皮遺残による関与が示唆された。

#### 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2件)

1. Ken Takahashi, Mitsuru Shimonishi, Rui Wang, Hiroatsu Watanabe, Masahiko Kikuchi. Epithelial-mesenchymal interactions induce enamel matrix proteins and proteases in the epithelial cells of the rests of Malassez in vitro. European Journal of Oral Science, 査読有、120巻、2012年、475-483
2. 渡邊 弘淳、下西 充、高橋 健、小松正志、菊池 雅彦 培養ヒト歯根膜由来上皮細胞および線維芽細胞間相互作用によるエナメルマトリックスおよびプロテアーゼの調整 日本歯科保存学会誌、査読有、55巻、2012年、141-150

[学会発表](計3件)

1. Wang R, Shimonishi M, Takahashi K, Watanabe H, Saito S, Komatsu M, Kikuchi M. Epithelial-mesenchymal interactions induce enamel matrix proteins and proteases in vitro. 2012 Sino-Japan Dental Conference, 2012年、04月26日~04月28日、中国、四川
2. 高橋 健、下西 充、渡邊弘淳、遠藤直樹、齊藤 修、小松正志 培養ヒト歯根膜由来上皮細胞および線維芽細胞間相互作用による石灰化調整 日本歯科保存学会 2011年度 秋季学術大会(第135回) 2011年10月21日、大阪
3. 渡邊弘淳、下西 充、高橋 健、齊藤 修、小松正志 細胞間相互作用によるAmelogenin H72、Ameloblastin およびKLK4の誘導 日本歯科保存学会 2011年度 春季学術大会(第134回) 2011年

6月10日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下西 充 (SHIMONISHI MITSURU)

研究者番号：40302153