

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592996

研究課題名(和文)セロトニンによるセメント芽細胞分化と歯周組織形成制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Localization of serotonin and serotonin transporter during tooth and periodontal tissue formation

研究代表者

平田 あずみ (HIRATA, AZUMI)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：40263587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：セロトニンは発生期神経堤の遊走や頭蓋顎顔面などの初期発生にも関わることが知られている。本研究では歯・歯周組織形成過程におけるセロトニンの関与を検討した。セロトニンおよびセロトニントランスポーターは歯および歯周組織の形成の進行とともに、エナメル芽細胞、Hertwig上皮鞘、Malassez上皮遺残など上皮由来の細胞に限局して観察された。これらのことより、セロトニンは特に、上皮組織を介して歯・歯周組織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)：Previous work suggested that serotonin plays an important part in craniofacial development. Here, we assessed the localization of serotonin and serotonin transporter during tooth and periodontal tissue formation. Our studies indicated that 1) Serotonin expressed in the dental tissues in the initial stage. 2) Serotonin transporter expressed in the dental tissues with progression of tooth and periodontal tissue formation. 3) Both serotonin and serotonin transporter localization were observed in dental epithelial cells. These findings suggested that serotonin and serotonin transporter may have important roles during the process of formation of tooth and periodontal tissue.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：歯 歯周組織 セロトニン セロトニンレセプター セロトニントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科領域における組織再生あるいはインプラント療法の発展にはめざましいものがあるが、それらの予後のいっそうの向上のためには、良質で十分な歯周組織が必要である。セメント質は歯根を覆い、咀嚼力に耐えるための緩衝材となる歯根膜を歯に固定する機能を果たし、骨組織と類似した性質を有する組織である。われわれはこれまで、セメント芽細胞分化メカニズムを明らかにするために Hertwig 上皮鞘基底膜へパラリン硫酸プロテオグリカン(パルカン)の消失と、パルカンの分解酵素ヘパラーゼのセメント芽細胞分化・増殖への関与について明らかにし(Hirata, A. and Nakamura, H., 2006)、さらに、骨芽細胞分化因子 Runx2 と Osterix の両因子がセメント芽細胞の分化に必須であることを報告してきた(Hirata, A., Sugahara, T. and Nakamura, H., 2009)。

本研究で着目したセロトニンは、発生期神経堤細胞の遊走や神経・頭蓋顔面などの初期発生にも関わることが知られている。骨組織へのセロトニンの関与も明らかとなっており、臨床では抗うつ剤による骨粗鬆症も問題となっている。一方、1980-90年代にかけて歯胚でのセロトニンレセプター(5-HTR)の発現やレセプター阻害薬による歯牙形成抑制が報告され、歯牙形成へのセロトニンの関与が示唆されている。しかしながら、これらは蕾状期・帽状期歯胚つまり歯冠形成期における報告であり、歯根・歯周組織形成へのセロトニンの関与についてはいまだ不明である。

2. 研究の目的

われわれは、フランスパリ第5大学 Prof. Michel Goldberg らとともに歯髓・歯周組織幹細胞分化に関する研究を実施しており(Harichane, Y., Hirata, A., Goldberg, M., et al., 2011)、モデルマウスを作製・解析するとともに、セロトニンレセプターノックアウトマウスを作製している。本研究の目的は、このノックアウトマウス歯根形成期歯胚の組織学的検討とセロトニン結合ビーズ埋入モデルマウスを作製し解析することにより、セロトニンによるセメント芽細胞分化・歯周組織形成制御機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) セロトニンレセプターノックアウトマウスの解析

(2) 歯根形成期歯周組織の培養実験

cell line の確立

下顎臼歯部の器官培養

(3) マウス歯・歯周組織形成過程の免疫組織化学的検討

歯胚におけるセロトニンレセプター局在：歯および歯周組織形成過程におけるセ

ロトニンレセプター局在について検討する。
歯胚におけるセロトニントランスポーター局在：歯および歯周組織形成過程におけるセロトニントランスポーター局在について検討する。

二次口蓋形成過程におけるセロトニンおよびセロトニントランスポーター局在：二次口蓋形成過程における局在について検討する。

(4) ビーズ埋入モデルマウスの作製と解析
歯周組織への埋入モデル：マウス臼歯抜歯窩にビーズを埋入後、経時的に資料を採取し、組織学的検討を行う。

歯髓腔への埋入モデル：露髄させた第一臼歯歯髓腔にビーズを埋入後、歯髓修復過程について組織学的検討を行う。

4. 研究成果

(1) セロトニンレセプターノックアウトマウスの解析：μCT では臼歯歯冠部エナメル質形成不全が観察された。歯根および歯周組織形成については、μCT の所見では大きな異常は確認されなかった。また SEM ではエナメル小柱の不正な結晶構造が観察された。これらの結果より、セロトニンはエナメル芽細胞の機能に関与していること、その作用はレセプターを介して生じることが示唆された。

(2) 歯根形成期歯周組織の培養実験

マウス下顎臼歯歯周組織を培養し、細胞の回収を試みたが、採取できる細胞数がわずかで cell line の確立は困難と判断した。

培養組織像が比較的安定し、培養後早期における細胞の反応が観察可能な時期として、培養開始時、培養 24 時間後、培養 48 時間後の試料を採取し検討したところ、組織学的には顕著な差は観察されなかった。

(3) 歯・歯周組織形成過程の免疫組織化学的検討

セロトニンレセプター：セロトニンレセプターには数種のサブタイプが存在するが、ノックアウトマウスの解析結果を踏まえ、本研究ではセロトニンレセプター2B をターゲットとした。市販の抗体および自作の抗体数種を用いて検討を行ったが、良好な反応性を得ることができなかった。

セロトニントランスポーター：歯冠形成期エナメル芽細胞、歯根形成期 Malassez 上皮遺残および Hertwig 上皮鞘にセロトニン

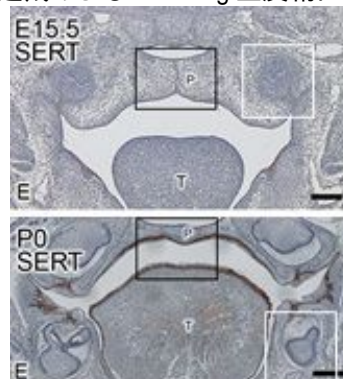
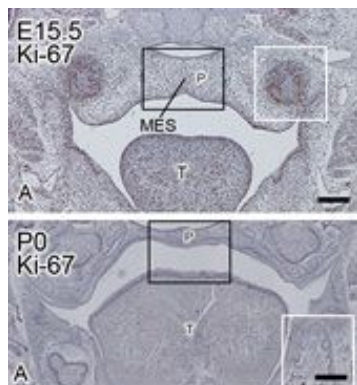


図 1

トランスポーター局在が観察された。Ki-67とCyKの局在およびノックアウトマウスの解析結果とあわせると、歯・歯周組織形成へのセロトニンの関与が裏付けられ、それにはセロトニントランスポーターを介する可能性が示唆された(図1、2、3白枠)。

二次口蓋形成とセロトニン：セロトニンは口蓋形成初期に、セロトニントランスポーターは口蓋完成期に観察された。それらの局在は類似性を示し、口蓋形成の進行に伴い口蓋部上皮組織に観察されるようになり、



口蓋完成期には口腔粘膜上皮有棘 図2 基底層にかけて認められた。これらのこととKi-67、CyKの局在より、セロトニンおよびセロトニントランスポーターは口蓋形成、特に口蓋部粘膜上皮の増殖に関与することが推察された(図1、2、3黒枠)。

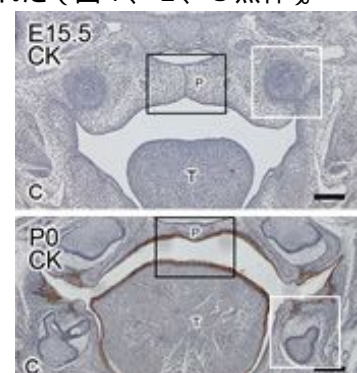


図3

(4) ビーズ埋入モデルマウスの解析

歯周組織への埋入モデル：白歯抜歯後の炎症反応の回避は不可能なため、抜歯窩埋入による検討方法は困難と判断した。

歯髄腔への埋入モデル：ビーズ埋入後28日目までのμCTおよび組織学的観察を行った。μCTでは時間の経過とともに、歯髄腔内に不透過像を認めるようになった。組織学的所見としては、初期にはビーズは線維性結合組織内に観察されたが、14日目ではビーズから少し離れた細胞がPCNA陽性を示し、さらに28日目には修復象牙質様の硬組織がビーズから離れた領域に観察された。これらのことより、ビーズから徐放されたセロトニンが刺激となり周囲の細胞の増殖や、硬組織形成細胞への分化を促進した可能性が推察された。

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9件)

Hirata A, Katayama K, Tsuji T, Imura H, Natsume N, Sugahara T, Kunieda T, Nakamura H, Otsuki Y. Homeobox family Hoxc localization during murine palate formation. *Congenital Anomalies*. 査読有. 2016; in press. DOI: 10.1111/cga.12153

Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Djole SX, Ardila H, Baudry A, Kellermann O, Simon S, Goldberg M. Plithotaxis, a collective cell migration, regulates the sliding of proliferating pulp cells located in the apical niche. *Connective Tissue Research*. 査読有. 2014; 55: 1-5. DOI: 10.3109/03008207.2014.923855

平田あずみ. 歯の形成にかかわる酵素たち. *生物工学会誌*. 査読有. 2013; 91: 353.

Hirata A, Katayama K, Tsuji T, Natsume N, Sugahara T, Koga Y, Takano K, Otsuki Y, Nakamura H. Heparanase localization during palatogenesis in mice. *BioMed Research International*. 査読有. 2013; 2013: 760236. DOI: <http://dx.doi.org/101155/2013/760236>

〔学会発表〕(計9件)

平田あずみ、伊藤裕子、前村憲太郎、大槻勝紀. セロトニン-セロトニントランスポーター局在から検討したセロトニン代謝と口蓋形成のメカニズム. 第121回日本解剖学会総会・学術集会. 2016年3月30日. 福島県郡山市.

平田あずみ、井村英人、植野高章、南克浩、夏目長門、菅原利夫. 口蓋形成過程におけるセロトニン-セロトニントランスポーター局在. 第60回(公社)日本口腔外科学会総会. 2015年10月17日. 愛知県名古屋市.

平田あずみ、伊藤裕子、前村憲太郎、大槻勝紀. マウス口蓋形成過程におけるセロトニン-セロトニントランスポーター局在. 第56回日本組織細胞化学会総会・学術大会. 2015年10月3-4日. 大阪府枚方市.

Hirata A, Namura H, Otsuki Y. Serotonin transporter during palate formation in mice. The Joint Meeting of the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92th Annual Meeting of The Physiological society of Japan. 22 March 2015. Kobe, Japan.

平田あずみ、井村英人、植野高章、南克浩、夏目長門、菅原利夫. Homeobox family Hoxの口蓋形成への関与. 第59回(公社)日本口腔外科学会総会. 2014年10月17日. 千葉県千葉市.

平田あずみ、二木杉子、大槻勝紀. パール

カンとヘパラナーゼ局在から検討した口蓋突起癒合のメカニズム．第46回日本結合組織学会学術大会・第61回マトリックス研究会大会．2014年6月5日．愛知県名古屋市．

Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Ardila H, Simin S, Sjöle SX, Kellermann O, Goldberg M. Plithotaxis, a collective cell migration, regulates the sliding of proliferating pulp cells located in the root apical papilla niche. 11th International conference on the chemistry and biology of mineralized tissues. October-November 2013. Lake Geneva, Wisconsin, USA.

平田あずみ、井村英人、脇本真理、植野高章、南 克浩、夏目長門、菅原利夫．口蓋形成過程におけるテネインの局在と制御．第58回日本口腔外科学会総会．2013年10月11日．福岡県博多市．

平田あずみ、井村英人、植野高章、南 克浩、夏目長門、菅原利夫．セロトニントランスポーターは口蓋形成に関与する．第57回日本口腔外科学会総会．2012年10月19日．神奈川県横浜市．

〔図書〕(計1件)

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/an1/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

平田あずみ (HIRATA, Azumi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：40263587

(2)研究分担者

植野高章 (UENO, Takaaki)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：60252996

松村達志 (MATSUMURA, Tatsushi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：70432648

井村英人 (IMURA, Hideto)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：10513187

(3)連携研究者

菅原利夫 (SUGAHARA, Toshio)
愛知学院大学・歯学部・客員教授
研究者番号：10116048

(4)研究協力者

Goldberg, Michel (GOLDBERG, Michel)
INSERM UMR-S 1124・Biomédicale des
Saints Pères, Université Paris
Descartes・Professeur Emerite