

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792282

研究課題名(和文) マラッセ上皮遺残における幹細胞の動態および分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of stem cell dynamics in epithelial rest of Malassez and molecular control mechanism

研究代表者

住吉 久美 (SUMIYOSHI, KUMI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：80625161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：歯を支える歯根膜組織における組織幹細胞や周囲環境の詳細な調節メカニズムについては未だ明らかとなっていない。本研究では、歯根膜中における組織幹細胞が歯根付近に点在することが示された。また、歯根膜細胞間にはギャップ結合が存在しており、低酸素環境下ではギャップ結合の発現が変化することが示されたことから、歯根膜における恒常維持およびリモデリング機構の一部が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The regulatory mechanism of tissue stem cell and its surrounding environment is not clearly revealed. In the present study, the tissue stem cells were shown to be scattered around the root surface. There were Gap junctions between the periodontal ligaments cell to cell, these expression levels were changed in the hypoxia condition. Therefore, we revealed the part of the mechanism in the maintenance and remodeling at the periodontal tissue.

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：歯根膜 マラッセ上皮遺残 細胞伝達

## 1. 研究開始当初の背景

マラッセ上皮遺残は歯根を取り囲むよう網目様に存在する上皮細胞群であり、生涯を通じて歯根膜中に分布している。その機能・存在意義については長らく不明のままであったが、近年歯根膜組織の維持やセメント質形成に重要な役割を果たすことが示唆されており、将来の歯根膜の再生医療の成否を握る重要な組織である事が予想される。しかし、マラッセ上皮遺残が歯根膜組織中に維持される機構およびその周囲環境である歯根膜組織が、いかなる分子機構の制御下にあるのかは不明であった。

また、組織幹細胞が維持されるためには、幹細胞自身が持つ特性に加え、その周囲環境におけるpH、酸素濃度、サイトカイン、細胞間相互シグナル伝達など、様々な点において複雑かつ精密な制御が必要とされる。そして、これらは咀嚼といった生理的状态における歯根膜の恒常維持活動のみならず、矯正治療における周囲組織のリモデリング活動にも関与する点が多い。しかし、未だ歯根膜における微小環境の調節機構や詳細な分子メカニズムについては不明な点が多く、さらなる解明が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯根膜組織に存在するマラッセ上皮遺残中の組織幹細胞を同定すること、およびそれらを制御する機構として、周囲環境である歯根膜組織における分子制御機構の一部を解明することを目的とする。そのため、歯根膜細胞間における伝達機構および低酸素環境下がそれらに及ぼす影響について同定を行う。

(1)長期 BrdU 保持細胞の観察によるマラッセ上皮遺残における組織幹細胞の同定

BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridine) の長期保持細胞は、組織幹細胞能を持つことが知られていることから、歯根形成期のマウスへ BrdU を連続投与した後、歯根膜内のマラッセ上皮遺残中における BrdU 長期保持細胞の分布を明らかにする。

(2)歯根膜組織中における細胞間シグナル伝達機構を解明するため、歯根膜細胞間におけるギャップ結合の存在および、低酸素状態がそれらに及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)歯根膜組織におけるBrdU保持細胞の同定  
生後7日齢のマウスに、50  $\mu$ g/g (体重)用量のBrdUを1日2回、7日間連続して皮下投与した。投与終了後11週経過した段階で、4%PFAを用い還流固定を行い、上顎骨を採取した。組織を脱灰処理後、パラフィン包埋し、切片を作製した。その後、BrdU staining kit (Invitrogen)を用い、BrdUを検出した。

(2)ヒト歯根膜組織細胞の単離および培養  
当科を受診し、便宜抜歯適応と診断された後、歯根膜提供の同意を得た患者から抜去した健全な第一小臼歯を使用した。抜去歯は、Kawanabeら (Kawanabe et al, 2010) の方法に従い、単離を行った。歯根表面から剥離した歯根膜組織をコラゲナーゼ処理後、遠心分離にて細胞を単離し、10%FBS含有MEM培地にて培養した。

(3)歯根膜細胞間ギャップ結合の同定  
ギャップ結合の形態学的検討のため、走査型電子顕微鏡 (SEM) および共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV500) を用いて観察を行った。SEM 観察用サンプルは、単離した歯根膜細胞を固定後、タンニン酸処理を行い、イオ

ンスパッターにて金蒸着を行った。共焦点レーザー顕微鏡観察用サンプルは、細胞を固定し、サポニンにて膜透過処理を行った後、抗原抗体反応させた。

#### (4)低酸素培養下におけるギャップ結合タンパク発現の検討

低酸素培養環境として、マルチガスインキュベーターを使用し、酸素分圧 2%の状態とすることで低酸素環境下とした。また、擬似低酸素状態を作り出す薬剤である Deferoxamine mesylate salt (DF0)を培地へ添加し、擬似的に低酸素環境を作り出した。歯根膜細胞を低酸素下で培養後、タンパクを回収し、低酸素マーカーである HIF1- タンパクの発現および、ギャップ結合を構成する主要タンパクである Cx-43 の発現を、ウエスタンブロッティング法を用い検討した。

### 4 . 研究成果

#### (1)BrdU長期保持細胞の同定

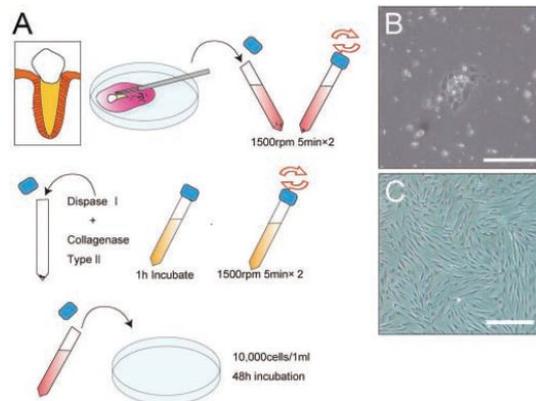
歯根形成期のマウスへBrdUを連続投与し、これらの長期保持細胞を免疫組織学的手法によって検出した。下図中矢印部位に示すように、歯根膜組織中のマラッセ上皮遺残中における組織幹細胞の分布は、歯根と隣りあう歯根膜組織に沿って存在していた。また、歯根膜組織一様に連続した挙動を示すのではなく、歯根膜内の歯根側に沿って点在していることが示された。



#### (2)歯根膜細胞の単離・培養

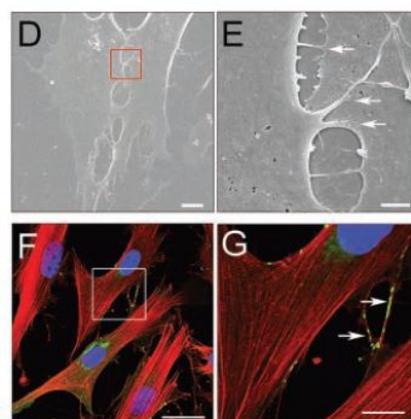
歯根膜細胞は、抜去歯歯根膜から下図Aの手順に従い単離した。下図Bは、単離後一日経

過した細胞の形態を観察したものである。二週間培養を継続し、コンフルエントの状態となった細胞を以下の実験に用いた(下図C)。



#### (3) 歯根膜細胞間におけるギャップ結合の同定

走査型顕微鏡を用い、単離した歯根膜細胞の形態学的検討を行った。その結果、隣接する歯根膜細胞間で接触している状態が観察された(下図D)。図の赤枠で囲まれた部分の拡大像(下図E)では、矢印で示された部分に突起状の構造物が認められ、接触している像が確認できた。この結果から、*in vitro*において隣接した歯根膜細胞同士は、細胞間で突起状構造物を介して接触していることが示された。

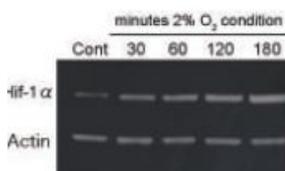


さらに、三重蛍光染色を用いて歯根膜細胞におけるギャップ結合タンパク Cx-43 分布の検討を行った。上図F中の青は細胞核、赤はア

クチン細胞骨格、緑はCx-43である。得られた蛍光染色像から、Cx-43が隣接する細胞間に局在していることが推察された。また、拡大図(上図G)の矢印に示された部分では、Cx-43が隣接する歯根膜細胞間に局在していることが確認された。これらの結果から、走査型電子顕微鏡像に認められた歯根膜細胞間の突起状構造物に、ギャップ結合を構成する主要タンパクCx-43が局在することが示された。以上の結果、単離・培養した歯根膜細胞間におけるギャップ結合の存在が示された。

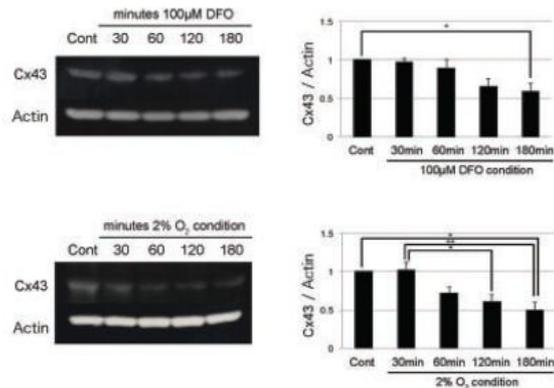
#### (4)低酸素培養下におけるギャップ結合の検討

歯根膜細胞を低酸素環境下で、種々の時間(0, 30, 60, 120, 180分)培養し、ウエスタンブロッティング法を用いて低酸素マーカーであるHIF1-タンパク発現を検討した。その結果、低酸素培養開始30分後からHIF1-タンパク発現の上昇を認め、180分後まで時間依存的な上昇を示した(下図)。この結果から、歯根膜細胞では低酸素培養によりHIF1-の発現が上昇し、低酸素環境となっていることが示された。



次に、低酸素環境で歯根膜細胞におけるギャップ結合タンパクCx-43発現がいかなる調節を受けるのかを検討した。歯根膜細胞を、低酸素環境下にて、種々の時間(0, 30, 60, 120, 180分)培養し、ウエスタンブロッティング法を用いてCx-43タンパク発現を検討した。低酸素環境は、擬似低酸素薬剤DFO下(図上方)および酸素分圧低下環境下(図下方)に

て検討を行った。その結果、低酸素環境下におけるCx-43タンパク発現量は、コントロール群と比較して、30分後より減少傾向を示し、180分後では有意に発現量が減少した。以上の結果から、低酸素環境は歯根膜細胞におけるギャップ結合タンパクCx-43発現量を抑制的に調整することが示された。



以上のことから、本研究では歯根膜中におけるマラッセ上皮遺残中の組織幹細胞の分布が明らかとなり、またその周囲環境である歯根膜細胞間におけるギャップ結合が存在することが示された。また、低酸素環境下ではギャップ結合タンパクの発現が抑制的に調節されたことから、歯根膜の恒常維持のみならず、周囲組織における骨リモデリングにも関与している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

1. Nakagawa Y, Minato M, Sumiyoshi K, Maeda A, Hara C, Murase Y, Nishida T, Kubota S, Takigawa M. Regulation of CCN1 via the 3'-untranslated region. J. Cell Commun Signal. 2013. 7(3):207-17. 査読あり
2. Kato R, Ishihara Y, Kawanabe N, Sumiyoshi K, Yoshikawa Y, Nakamura M, Imai Y, Yanagita T, Fukushima H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Gap-junction-mediated

communication in human periodontal ligament cells. J Dent Res. 2013. 92(7):635-40. 査読あり

3. Sumiyoshi K, Kubota S, Ohgawara T, Kawata K, Abd El Kader T, Nishida T, Ikeda N, Shimo T, Yamashiro T, Takigawa M. Novel role of miR-181a in cartilage metabolism. J Cell Biochem. 2013. 114(9):2094-100. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. 加藤龍史, 石原嘉人, 川邊紀章, 住吉久美, 吉川祐介, 福島宏明, 上岡寛, 山本照子, 山城隆. ヒト歯根膜細胞におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの骨代謝へ及ぼす影響. 第72回日本矯正歯科学会大会. 松本市. 2013年10月7-9日.
2. Kato R, Ishihara Y, Kawanabe N, Sumiyoshi K, Yoshikawa Y, Nakamura M, Imai Y, Yanagita T, Fukushima H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Gap junction-mediated communication in human periodontal ligament cells. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium. Sendai. Japan. 2013年5月9-10日.
3. 加藤龍史, 石原嘉人, 川邊紀章, 住吉久美, 吉川祐介, 今井裕一, 上岡寛, 山本照子, 山城隆. ヒト歯根膜細胞におけるギャップ結合を介した細胞間伝達は低酸素環境下において抑制的に調節される. 第71回日本矯正歯科学会大会. 盛岡市. 2012年9月26-28日.
4. 石原嘉人, 菅原康代, 上岡寛, 川邊紀章, 柳田剛志, 住吉久美, 山城隆. イノシトール三リン酸は生きた骨組織中における細胞内カルシウム応答の必須因子である. 第71回日本矯正歯科学会大会. 盛岡市.

2012年9月26-28日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

住吉 久美 (SUMIYOSHI KUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 80625161