

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792340

研究課題名(和文) プライマリーシリアの特性を応用した新規歯周組織再生治療の確立

研究課題名(英文) The periodontal regeneration therapy with primary cilium

研究代表者

衣松 高志(kinumatsu, takashi)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00433954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プライマリーシリアはほとんどの細胞が有する構造の一つであり、その機能として骨形成に関連する働きが知られている。歯と周囲骨を連結する歯根膜は歯の移動に伴い周囲への骨添加と骨吸収を短期間に生ずる組織であるが、この機能を生かした骨再生療法はいまだ発展途上である。そこで歯根膜におけるプライマリーシリアの骨形成に関連する働きを解明しこの構造による新規再生療法の確立を目指した。ラット歯根膜における一次繊毛の発現率に有意差は認められなかったことから、その存在は部位特異的ではなく歯根膜全体の機能に関わる可能性が示唆された。また、陽性細胞は歯根膜繊維の走行と一致して各細胞の長軸方向に存在する傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Primary Syria is one of the structure that most cells have. It is known that the Primary cilia have important role in bone formation. Periodontal membrane is the tissue that related tooth migration with continuous bone reproduction and bone addition in short term. However periodontal regeneration therapy with this function is not established still now. Thus we decided to investigate the function of primary cilia and, aimed the establishment of new periodontal therapy with the structure. In this study, the significant difference was not recognized to the primary ciliary incidence in the rat periodontal membrane. Therefore, we suggested that the existence of primary cilia was not site-specific, and possibility about function of the whole periodontal membrane. In addition, the existence of primary cilia was parallel to the periodontal membrane fiber.

研究分野：歯周病学

キーワード：プライマリーシリア 歯根膜

1. 研究開始当初の背景

歯周病治療においては歯を支える歯槽骨の量が、直接的にその余命に影響することから、この歯槽骨を効率的に再生することは近年の重要な課題となっている。歯周組織の再生には「細胞(cell)、足場(scaffold)、増殖因子(growth factor)」の3つ要素が不可欠と言われており、現在増殖因子であるBMP-2、FGF、PDGFや足場であるヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、牛乾燥骨、細胞としての未分化間葉細胞など数々の材料が試みられ、臨床に応用されている。

しかしながら、これらの多くは生体由来ではなく、外来性の材料や合成されたタンパクであり、その安全性は確立されているものの、より安全な生体内の反応を生かした再生治療は未だ確立されているとは言いがたい。そこで申請者は骨形成のシグナルに関わる細胞内構造の一つプライマリーシリア(一次繊毛)に着目しこの構造のもつ骨形成への機能を生かした歯根膜組織由来の骨再生を研究課題とした。

プライマリーシリアはほとんどの細胞が有する構造の一つであり細胞から伸びた繊毛として存在している。各々の細胞が1本のみこの構造を有しており、特に胎生初期初期胚ではノードと呼ばれる領域で回転して胎児外液の左向きの流れをつくり、体幹の左右側決定に関わることが知られている。(Davenport and Yoder, 2005; Donnelly et al., 2008; Scherft and Daems, 1967; Serra, 2008; Zhang et al., 2004)。また、骨形成における重要な蛋白の一つソニックヘッジホッグのシグナル伝達に関連し、特に長管骨においてその成長とプライマリーシリアとの関わりが多く研究されている。ヘッジホッグシグナルはプライマリーシリア上の細胞表面のレセプターである patched およびトランスデューサーの Smoothed を介してトランス転写因子 Gli1 が活性化し、骨形成を促進する (Haycraft et al., 2007., Huangfu and Anderson, 2006; Lum and Beachy, 2004)。また、プライマリーシリアの構成要素の一つ鞭毛内輸送タンパク(intraflagellar transport (IFT))は、プライマリーシリアの構築と維持において重要なタンパクであるが、これらの構造及び機能タンパクの欠損は骨及びその他組織の形成に影響を及ぼす。(Haycraft et al., 2005; Haycraft et al., 2007; Kolpakova-Hart et)。なお、申請者はこれら鞭毛内輸送タンパクの一つ Kif3a をコラーゲンタイプ 2 領域でノックアウトしたマウスを用い、顎関節形成におけるプライマリーシリアの必要性について検索、すでに報告している (Kinumatsu et al. J

Dent Res. 2011 Aug;90(8):988-94.)。

2. 研究の目的

本研究においては、未だよく知られていない歯根膜細胞におけるプライマリーシリアの機能に関して明らかにすると共にその機能を生かした骨再生の確立を目的とした。

第一に生体内において歯の移動、萌出等、生理的な反応時にプライマリーシリアがどのような動きをするかをマウスを用いた in vivo のモデルにおいて観察する。この際、In situ hybridization, 免疫染色、共焦点顕微鏡等により骨の添加及び吸収部位でのプライマリーシリア自体の長さ、シグナリング、骨再生時の方向性(どのような方向に向いているか)について観察し、その生体内での役割を観察することとした。

第2として培養歯根膜細胞に各種刺激を加えた際のプライマリーシリアの動向を観察する。この観察は、未分化間葉細胞に対してより確実な骨経細胞への分化を促すことを目的とし培養細胞の変化誘導、もしくは変化抑制を導くことを目的とする。この際牽引刺激または圧迫刺激を加えた培養歯根膜細胞に対して遺伝子的検索を行い、どのようなシグナルの変化が口腔領域におけるプライマリーシリアを介した創傷治癒、骨形成に関与しているかを検索することとした。

第3に上記実験で得られた情報、実験結果を元にこのプライマリーシリアを生かした再生治療を構築することを目的とする。方向性として、骨欠損部位に対する特殊な細胞やマテリアルを用いない、一般的な開業医で行われる手技としての歯周外科手術において、骨欠損内への結合織及び上皮侵入の抑制、さらに骨形成の誘導を目的としプライマリーシリアへのシグナル誘導、シリアの長さを人為的に調整することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常歯根膜上のプライマリーシリア存在数の観察

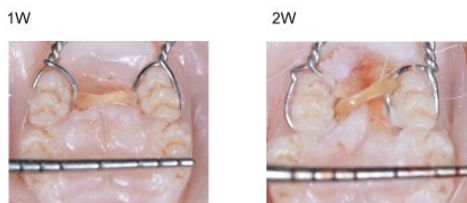
ラットの歯根膜上におけるプライマリーシリアの存在を免疫染色にて観察した。実験には 250 - 300g の 10 週齢の Wister 系ラットを用いた。ペントバルビタール(ソムノペンチル、共立製薬)を腹腔内投与後、4%パラホルムアルデヒドにて還流固定を行い、上顎第一大臼歯の歯周組織を含む上顎骨を摘出した。サンプルは 10%EDTA にて 3 週間脱灰の後、通法に従い

パラフィン包埋切片 (5 μ m) を作製した。切片は 0.1%トリプシン溶液で抗原賦活化処理を施したのち、10%ヤギ血清でブロッキング、免疫染色では、一次抗体として、一次繊毛の骨格を形成する抗体である anti-acetylated- α -tubulin (1:100, SIGMA-ALDRICH)、および中心体の抗体である γ -tubulin (1:200, GeneTex) をそれぞれ 38 $^{\circ}$ C、1時間で反応させ洗浄、二次抗体として Alexa Fluor 568 (1:200, Life Technologies)、Alexa Fluor 488 (1:200, Life Technologies) を室温で 30分反応させ、洗浄後、Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies) を用い、核染色ならびに封入を行った。観察は万能顕微鏡 (UPM Axiophot2) にて免疫組織学的に検討を行った。この際に観察部位は歯根膜の歯頸部、中間部、根尖部を設定した。各部位において総細胞数、および anti-acetylated- α -tubulin 陽性細胞数を計測し、陽性細胞率の算出を行った。

(2)矯正治療を用いた牽引、圧迫刺激を加えた際の歯根膜上のプライマリーシリアの観察

歯牙移動、挺出時における骨、靭帯、一次繊毛関連タンパクの局在を観察することを目的とし実験を行った。観察時期は1日、3日、1週、2週、1ヶ月、2ヶ月とし、実験動物には 250 - 300g の 10 週齢の Wister 系ラットを用いた。観察部位は上下顎 M1, M2 とし M1、M2 の傍矢状断・組織切片を作成、パラフィン切片にて免疫染色を行った。

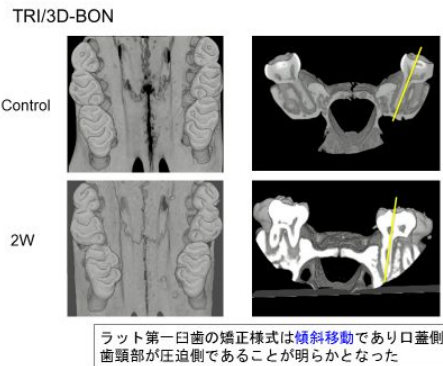
実験群では上下顎 M1 間に矯正用ゴムを取り付け口蓋側への移動を行ったこの際、口蓋側は圧迫側となり頬側は牽引側となるため、それぞれの観察が可能となった。(図 1, 2)



ラットM1歯の頬舌側移動は成功したが、移動様式が不明瞭であった

3DCTを撮影し、ラットM1歯の移動様式を確認した

図 1 ラット M1 の矯正力による口蓋側への傾斜移動



ラット第一臼歯の矯正様式は傾斜移動であり口蓋側歯頭部が圧迫側であることが明らかとなった

図 2 MicroCT による歯牙移動の確認

なお、牽引の期間は2週とした。コントロール群は牽引を行わない同週齢のマウスとし、同様に M1、M2 の傍矢状断・前頭骨前頭断組織切片を免疫染色にて観察した。

抗体には正常歯根膜と同様一次繊毛の骨格を形成する抗体である anti-acetylated- α -tubulin (1:100, SIGMA-ALDRICH)、および中心体の抗体である γ -tubulin (1:200, GeneTex) をそれぞれ 38 $^{\circ}$ C、1時間で反応させ洗浄、二次抗体として Alexa Fluor 568 (1:200, Life Technologies)、Alexa Fluor 488 (1:200, Life Technologies) を用い、万能顕微鏡 (UPM Axiophot2) にて免疫組織学的に検討を行った。この際に観察部位は歯根膜の歯頸部、中間部、根尖部を設定した。各部位において総細胞数、および anti-acetylated- α -tubulin 陽性細胞数を計測し、陽性細胞率の算出を行った。

4. 研究成果

(1)正常歯根膜上のプライマリーシリア存在数の観察

ラット歯根膜全体での一次繊毛の発現率は $67.6 \pm 3.6\%$ であった。部位別には歯頸部 $73.5 \pm 4.1\%$ 、中間部 $64.7 \pm 3.0\%$ 、根尖部 $67.7 \pm 3.6\%$ であり、統計学的に有意な差は認められず、歯根膜全体に均一に存在することが明らかとなった。(図 3)

歯根膜各部位において発現率に有意な差は認められなかった

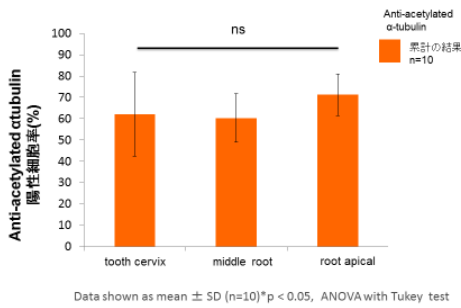


図 3 歯根膜の各部位におけるプライマリーシリアの存在

本研究においては、ラット歯根膜における一次繊毛の発現率に有意差は認められなかったことから、この繊毛の存在は部位特異的ではなく歯根膜全体の機能に関わる可能性が示唆された。また、陽性細胞は歯根膜繊維の走行と一致して各細胞の長軸方向に存在する傾向が認められた。(図 4)

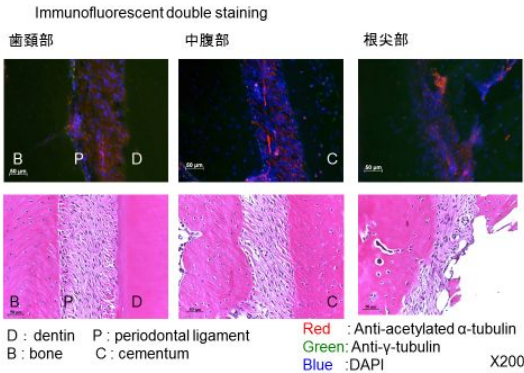


図 4 歯根膜各部位におけるプライマリーシリアの走行

連続切片を用いた HE 標本との比較では、その存在は繊維芽細胞において多く認められた。歯髄中の象牙芽細胞では硬組織形成が行われる象牙質側に一次繊毛が存在することも知られており、歯根膜における一次繊毛の配列もその骨形成と関連する可能性が示唆された。この仮説を証明するにあたり、現在ラット第一大臼歯に対し歯牙矯正によるメカニカルストレスを与えた際の、一次繊毛の発現率、局在に変化についても検討を行った。

(2) 矯正治療を用いた牽引、圧迫刺激を加えた際の歯根膜上のプライマリーシリアの観察

矯正治療を用いた歯根膜刺激下でのプライマリーシリア観察には M1 の傾斜移動によるモデルを用いた。(図 5)

観察部位

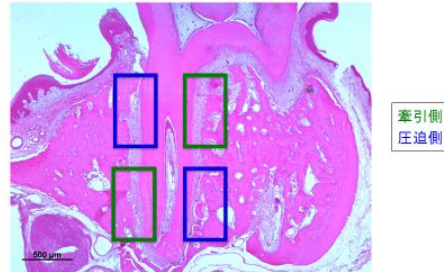


図 5 歯根膜各部位における牽引側、圧迫側の設定と観察部位

M1 近心根の口蓋側歯冠側部、頬側根尖部を圧迫側、口蓋側根尖部、頬側歯冠側を牽引側として 1 日、3 日、1 週、2 週、1 ヶ月、で観察した。

タイムポイントによる比較では 1 日、3 日、1 週と比較し 1 週齢において比較的長いプライマリーシリアが多い傾向が認められた。しかしながら有意差は観察されなかった。

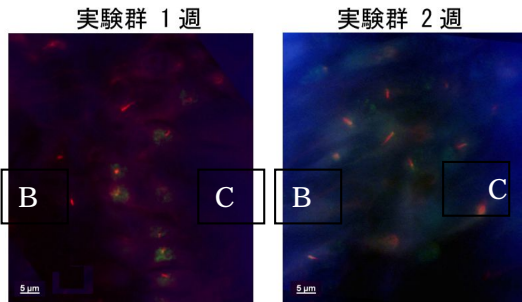


図 6 1 週、1 週におけるプライマリーシリアの存在とその長さ(赤：アセチレーテッド チューブリン、緑：γチューブリン)

B: 歯槽骨 C: セメント質

また、牽引側および圧迫側の比較においては特に牽引側の骨側でプライマリーシリアが歯根膜の検印方向に沿って存在する傾向が観察された。(図 7) しかしながらこちらにも有意差については得ることができなかった。

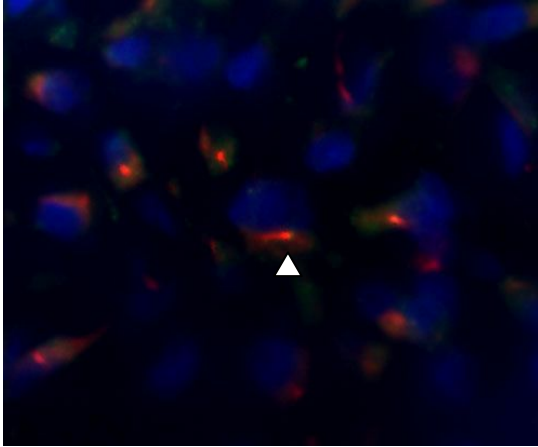


図7 2週、歯根面近くのプライマリーシリア
(赤：アセチレーテッド チューブリン、緑：
 α チューブリン) 赤と緑の重なった領域(プライ
マリーシリアの基部)から チューブリン
が歯根線維(牽引方向)に伸びているのがわか
る

考察：

これらの結果から、プライマリーシリアは矯正力による歯根膜線維の牽引刺激により活性化され歯根の長軸方向に沿って発現し、歯牙移動に伴う骨形成に SHH のシグナル伝達を通じて寄与していることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

衣松 高志 (kinumatsu Takashi)

東京歯科大学 歯周病学講座 講師

研究者番号：00433954