

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06698

研究課題名（和文）歯根膜の部位特異的な組織応答を制御する新たなメカノトランスダクション機構の解明

研究課題名（英文）Mechanotransduction mechanism that controls site-specific tissue response in periodontal ligament

研究代表者

北見 公平（Kitami, Kohei）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：20804579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：歯根膜は機械的刺激に対し極めて鋭敏に反応する組織であるが、機械的刺激がいかに感知され、組織変化を制御しているかについての理解は依然として乏しい。本研究では、歯根膜における機械的刺激受容器としての機能が期待されるプライマリーシリアの発現および矯正学的歯の移動に対する応答を解析した。歯根膜組織内でプライマリーシリアの偏在が認められ、矯正学的歯の移動によりその出現率に変動がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、機械的刺激受容体としての機能が期待されるプライマリーシリアの歯根膜組織中の局在特性に着目し、その作用機序を明らかにしようとするものである。プライマリーシリアによる機械的刺激に対する細胞応答メカニズムの解明は、あらゆる機械的刺激にさらされる生体機能の理解に向けたメカノバイオロジーの観点から、疾患の発生、治癒、再生を含めた今後の医歯薬学領域における研究の発展に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Periodontal ligament is extremely sensitive to mechanical stimuli, that enables orthodontic tooth movement. It remains elusive how mechanical stimuli are perceived and controlling tissue modification. In this study, we analyzed the distribution and the mechano-response of primary cilia, which is expected to function as a mechanoreceptor in periodontal ligament, in response to orthodontic tooth movement. Primary cilia was present in periodontal ligament, and preferential localization at the cementum-side of periodontal ligament was observed. The rate of cilia-positive cells was altered after orthodontic tooth movement.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：プライマリーシリア 歯根膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯槽骨とセメント質の間に介在する非石灰化領域であり、機械的刺激に極めて鋭敏に反応する組織特性が矯正学的歯の移動を可能としている。しかしながら、歯根膜細胞における機械的刺激の受容メカニズムについての知見は依然として乏しい。近年、機械的刺激による細胞応答が歯根膜のセメント質側と歯槽骨側では異なることが報告されており(文献1)、機械的刺激を受容する歯根膜構成細胞の組成と部位特異性をより詳細に解析することにより、その作用機序を明らかにできる可能性が示唆されている。

プライマリーシリアは、細胞表面に突出した非運動性の繊毛であり、外部環境の変化を細胞内シグナルへと変換する機能を持つことが知られている。プライマリーシリア上には種々の増殖因子受容体が集積し、細胞応答の起点となるとされている(文献2)。その一方で、プライマリーシリア自身がメカノセンサーとしても機能していることが報告され、ケモ/メカノセンサーとしての幅広い機能の重要性が注目されている。実際にシリアの欠失によって生じる疾患群であるシリオパシー(繊毛病)は顎顔面領域を含む多くの臓器において機能不全を生じることが明らかとなりつつある。歯根膜組織においてもシリアの発現が確認されているが、その機能については未だ不明な点が多い。

IFT20 (Intraflagellar transport 20) は、プライマリーシリアの発現と維持に必要な繊毛内輸送タンパクの一つで、IFT20 の発現抑制はシリアの欠失をきたす。申請者は、神経堤由来細胞特異的なIFT20欠損による顎顔面頭蓋骨の低形成について解析し、プライマリーシリアを欠失した骨芽細胞において増殖因子PDGF のシグナル経路が不活化されることを報告した(文献3)。さらに、IFT20 がコラーゲンの細胞内輸送に重要であることを初めて明らかにし、IFT20 の欠失が骨芽細胞の細胞内コラーゲン輸送障害を引き起こすことにより骨低形成が誘導されることを見いだした。これらの結果は、プライマリーシリアが受容体としてのみならず細胞外基質タンパクの生合成においても積極的に機能している可能性を示唆している。

近年の遺伝子改変技術の発展により、観察対象とする部位において目的の遺伝子を時空間特異的に欠失させるモデルの確立が可能となってきている。生体における反応は細胞と周囲の環境との複雑な相互作用により成立するため、これまでの手法では解明できない、解析の限界が存在した。本研究は、機械的刺激受容体としての機能が期待されるプライマリーシリアに着目し、歯根膜組織の機械的刺激を細胞応答という生化学的刺激に変換する機序について、新たな遺伝学的手法を用いて解明しようとするものである (Fig.1)。

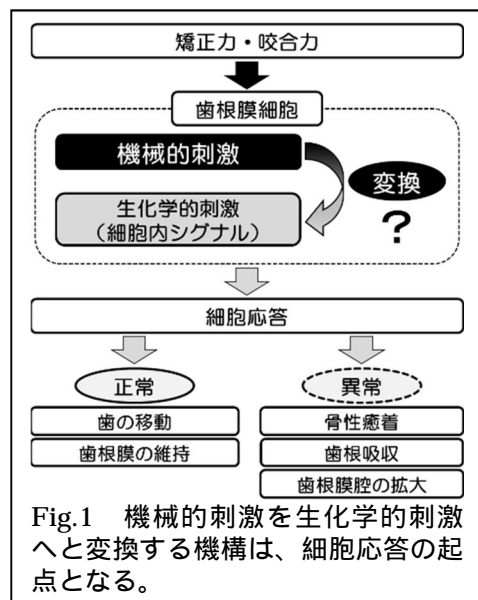


Fig.1 機械的刺激を生化学的刺激へと変換する機構は、細胞応答の起点となる。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、歯根膜でのプライマリーシリアの発現ならびに組織特異的な欠失による影響を解析することにより、歯根膜における新たなメカノトランスダクション機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

生後8週齢雄性C57BL/6系マウスの上顎左側第一臼歯と上顎前歯の間に、直径0.9mm Ni-Tiクロードコイルスプリングを結紮し、上顎左側第一臼歯の近心方向への実験的歯の移動を行った (Fig.2 上図)。増殖期細胞を標識するため、屠殺12時間前および6時間前にそれぞれEdU (5-エチニル-2'-デオキシウリジン) を腹腔内投与した。コイルスプリング設置1週間後および2週間後にそれぞれ屠殺し、歯周組織を含む上顎骨を摘出後、脱灰パラフィン包埋組織標本を作製し、上顎右側第一臼歯を対照群としたプライマリーシリアの検出を行った。1次抗体にはanti-acetylated tubulin antibody (Sigma-Aldrich)、2次抗体はanti-mouse Alexafluor488 (Molecular Probes) を用い、DAPIにて核の染色を行った。EdUの検出にはClick-iT EdU AlexaFluor Imaging Kitを用いた。上顎第一臼歯遠心頬側根の遠心側歯根膜を観察領域とし (Fig.2 下図)、歯根軸方向の歯冠側から根尖側までを3分割、近遠心方向に歯根セメント質側と歯槽骨側に2分割、合計6領域に分割した。各領域のanti-acetylated tubulin陽性細胞数を計測し、プライマリーシリアの長さおよび指向性を観察した。

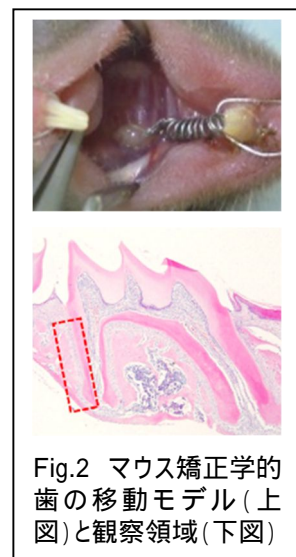


Fig.2 マウス矯正学的歯の移動モデル(上図)と観察領域(下図)

#### 4. 研究成果

##### 矯正力負荷時の歯根膜におけるプライマリーシリアの特性

対象とする観察領域の歯根膜腔の拡大と歯根膜線維の走行方向は Picrosirius-red 染色により確認した。コイル設置後に歯根が近心に移動し、遠心歯根膜腔の歯根膜線維が牽引されているのが確認された (Fig.3)。

コントロール群および実験群のマウス上顎第一臼歯遠心類側根の遠心歯根膜には、anti-acetylated tubulin 陽性のプライマリーシリアが多数検出された。プライマリーシリアは歯根膜線維の方向に沿って配列している傾向がみられたが、長さについては一定の傾向はみられなかった (Fig.4)。

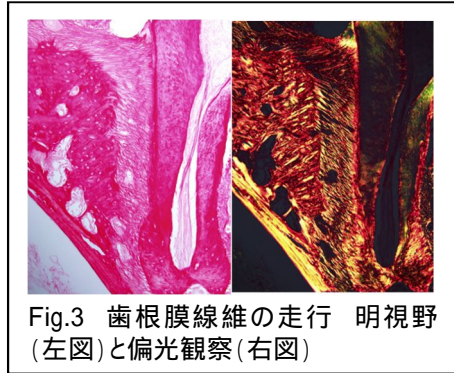


Fig.3 歯根膜線維の走行 明視野 (左図)と偏光観察 (右図)

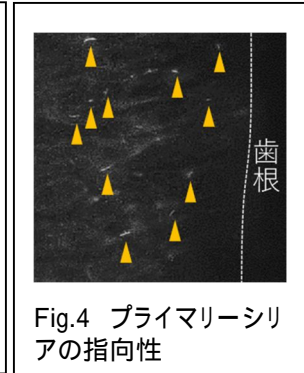


Fig.4 プライマリーシリアの指向性

コントロール群の歯根膜中

の歯冠側から根尖側における全領域において、歯槽骨側と比較してセメント質側に高い anti-acetylated tubulin 陽性細胞数を認めた。実験群においてもコントロール群と同様に、セメント質側におけるプライマリーシリアの高い出現率が認められたが、コイル設置後1週間の群では出現率が維持されているのに対し、設置後2週間の群では出現率が低下していた (Fig.5)。

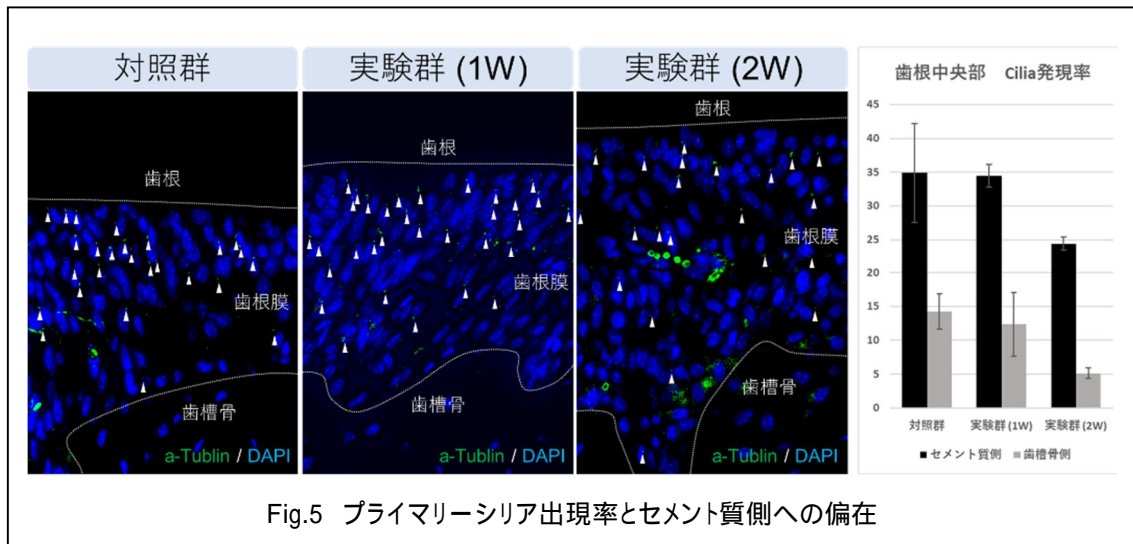


Fig.5 プライマリーシリア出現率とセメント質側への偏在

##### 増殖期細胞におけるプライマリーシリアの出現

コントロール群の歯根膜組織中には、EdU 陽性の増殖期細胞はほとんどみられなかった。コイル設置後1週間の群においても増殖期細胞はわずかししか認められなかったが、設置後2週間では多数の増殖期細胞が出現した (Fig.6)。2週間群における増殖期細胞の分布に歯槽骨側・セメント質側での偏在は認められなかった。またプライマリーシリアは EdU 陽性細胞においてほとんど観察されず、静止期細胞に多く観察されたことから、プライマリーシリアは組織改変期における静止期細胞の機能と関与している可能性が示唆される。

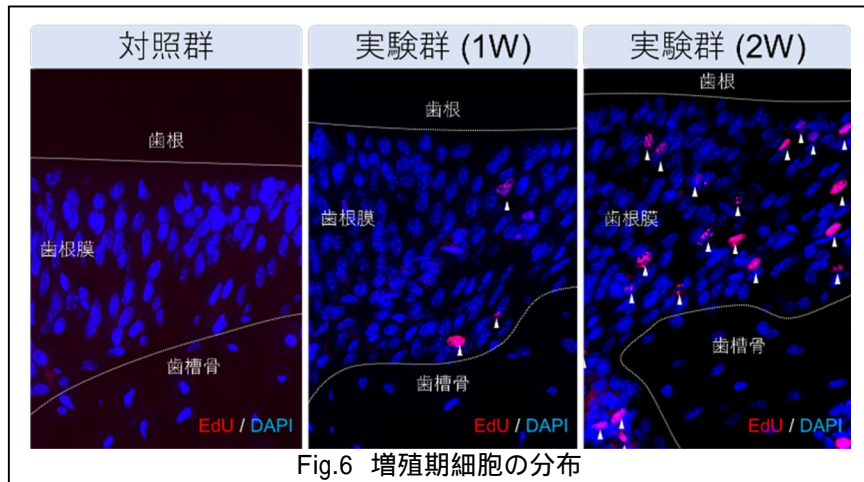


Fig.6 増殖期細胞の分布

#### 歯根膜特異的プライマリーシリア欠失マウスの作製

本研究計画では、Cre-LoxP システムを用いて歯根膜特異的にプライマリーシリアを欠失したマウスモデルを作製し、遺伝学的に実験的歯の移動におけるプライマリーシリアの機能を詳細に解析することを目的としている。薬剤投与依存的に歯根膜に Cre-recombinase を発現することが期待される *Postn-MCM* マウスを入手し、タモキシフェン投与による遺伝子組み換え酵素の発現部位の確認と発現効率の検証を進めている。今後 *Ift20<sup>flox/flox</sup>* マウス等を用い、歯根膜特異的なプライマリーシリアの欠失モデルを作製することにより、矯正学的歯の移動におけるプライマリーシリアの機能を明らかにしていく予定である。

#### <参考文献>

1. Kaku M. et al, J Cell Physiol. 2016;231(4):926-33
2. Singla V. et al, Science. 2006 Aug 4;313(5787):629-33
3. Noda K. et al, Proc Natl Acad Sci. 2016;113:E2589-E2597

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 1件)

Kitami K, Kitami M, Kaku M, Wang B, Komatsu Y: BRCA1 and BRCA2 tumor suppressors in neural crest cells are essential for craniofacial bone development. PLoS Genet May 14(5): e1007340, 2018.

##### [学会発表](計 3件)

Ida T, Kaku M, Mizukoshi M, Kitami K, Saito I, Uoshima K: In vivo Analysis of Cell Cycle Dynamics During the Course of Periodontal Ligament Development. International Collaborative Symposium on Development of Human resources in Practical Oral Health and Treatment, Phuket, Thailand, Feb 11, 2019. Conference program:85, 2019.

水越 優, 加来 賢, 北見公平, 井田貴子, 魚島勝美, 齋藤 功: 矯正的歯の移動時のマウス歯根膜における増殖/静止期細胞の局在. 第77回日本矯正歯科学会学術大会, 横浜, 2018年11月1日, 同学術大会プログラム・抄録集: 57頁, 2018.

北見公平, 竹山雅規, 小栗由充, 丹原淳, 小林正治, 齋藤功: Hotz 床併用二段階口蓋形成手術法で治療を行った片側性唇顎口蓋裂症例. 第33回甲北信越矯正歯科学会学術大会, 新潟, 2018年7月1日, 抄録集: 41頁, 2018

##### [その他]

北見公平: 頭部骨格形成における BRCA1 および BRCA2 を介した DNA 修復機能の重要性, 日本骨代謝学会ホームページ「1st Author」解説, 2018年10月  
[http://www.jsbmr.jp/1st\\_author/341\\_kkitami.html](http://www.jsbmr.jp/1st_author/341_kkitami.html)

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究分担者

なし

##### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。