

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592138

研究課題名（和文） 歯根膜幹細胞と幹細胞ニッチのストレス応答の組織学的解析

研究課題名（英文） Histological analysis of stress reaction of the stem/progenitor cell and those niche in periodontal ligament

研究代表者

島田 明美 (SHIMADA AKEMI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00339813

研究成果の概要（和文）：組織幹細胞は一般に正常組織では分裂頻度が低く DNA 標識が長期間残存する。BrdU を用いてこの様な Label retaining cell (BrdU-LRC) のマウス歯根膜での分布を調べたところ、血管周囲やセメント質近傍に多く分布していた。また BrdU-LRC は臼歯再植による歯周組織侵襲に対し再植 1 日後には増殖を開始したことから、組織再生に寄与する可能性が示唆された。さらに BrdU-LRC はコラーゲンゲル培養によって効率的に増殖することが見出された。

研究成果の概要（英文）：It is thought that the tissue stem cells slowly proliferate in the normal condition, resulting that those retain DNA label for longer time than developed cells. We used BrdU to identify the label retaining cells (LRCs) as the tissue stem cells. In the mouse periodontal ligament, BrdU-LRCs distributed around blood vessels and near cementum. The BrdU-LRCs started to proliferate one day after replantation of the molar tooth, showing that the BrdU-LRCs possibly function to regenerate the periodontal tissue. It was also found that the collagen gel culture is useful to expand the BrdU-LRCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯根膜、組織幹細胞、BrdU、label-retaining cell、再植

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 組織再生における組織幹細胞の役割

近年、多くの成体組織において組織幹細胞の存在が知られるようになり、組織再生やリモデリングの過程で重要な役割を担うこと

が明らかとなった。歯周組織の再生にも、歯周組織に存在する組織幹細胞が重要な役割を担うと予想されるが、組織再生過程にその挙動はもとより、局在や増殖・分化の調節機構など不明な点が多い。

## (2) 歯根膜における組織幹細胞同定の試み

歯根膜由来細胞から培養条件下で明らかに増殖が速く、コロニー形成性の細胞が見出されており、この細胞が *in vitro* でセメント芽細胞、脂肪細胞、collagen 産生細胞に分化しうること、ヌードマウスに移植するとセメント様組織や歯根膜様組織を形成することが示されている (Seo et al, Lancet 364:149, 2004; Bartold et al, Periodontology 2000 40:164, 2006)。また、一般に幹細胞は DNA 結合色素の Hoechst 33342 に低染色性であるが、歯根膜から同様の性質の細胞が分離されている (Kawanabe et al, Biochem Biophys Res Commun 344:1278, 2006)。これらの結果は、歯根膜組織中に幹細胞様細胞が存在し、ある条件下では組織再生に寄与する可能性を示唆する。

## (3) 組織幹細胞の増殖・分化の制御

幹細胞は正常組織中では非常にゆっくりとしか分裂せず、細胞増殖を標識する一般的な方法を用いると、通常の分裂速度の細胞と比較してその標識が長期間残存する。このような Label retaining cell (LRC) は歯根膜では血管周囲に比較的多く分布するとの報告がある (McCulloch, Anat Rec 211:258, 1985)。また、組織幹細胞には、幹細胞を維持・制御するための時間的・空間的な組織環境 (幹細胞ニッチ) が重要と考えられており、造血系や上皮系、神経系、生殖系などの比較的研究の進んだ組織幹細胞では、接着因子や相互作用因子、分泌性因子などによる幹細胞の増殖・分化・遊走の分子レベルでの制御メカニズムが明らかになりつつあるが、歯周組織幹細胞と周囲組織との関係はいまだ解明されていない。

## (4) 歯根膜幹細胞の歯周組織再生への関与

歯根膜の LRC は、抜歯後の歯槽窩が骨芽細胞の増殖によって治癒する過程ではほとんど増殖、分化せず、治癒過程で主要な役割を担っていないと報告されている (McCulloch, Oral Dis 1:271, 1995)。しかし、抜歯と再植では歯根膜中の幹細胞周囲の環境が異なり周囲の残存組織・細胞と LRC との相互作用が無いこと、抜歯窩を埋める血塊由来の全く異なる増殖因子等によって LRC が強く影響を受けることが推測され、この結果から組織再生過程における幹細胞の挙動を類推できない。現在まで、歯の再植後の歯周組織再生の過程での LRC の役割については報告がない。

## 2. 研究の目的

(1) 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の標識の長期間の残存を指標として歯周組織中の幹細胞を同定し、その分布を明らかにする。

(2) 抜歯と再植により歯根膜に侵襲を与えた際の歯周組織の再生過程における歯根膜幹細胞の増殖、遊走、分化過程を追跡する。

(3) 歯根膜幹細胞に特異的に発現するマーカー分子、あるいは BrdU の残存を指標として歯根膜幹細胞を分離、培養し、歯周組織再生への応用の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) BrdU の高感度検出条件の検討

第一臼歯の歯根が形成される生後 11 ~ 15 日目の ICR 系マウスに 50・g/g 体重の BrdU を 1 日 2 回、5 日間皮下注射した。投与終了 2 時間後に組織を固定し、上顎を摘出した。脱灰後、常法によりパラフィン包埋し、第一臼歯の縦断切片を作製した。抗 BrdU 抗体 (BMC9318) とマウスステインキット (ニチレイ) を用いて BrdU を検出した。固定液 (Bouin 液、4% パラホルムアルデヒド含有 PBS)、脱灰液 (Morse 液、10% EDTA、20% EDTA)、DNA 変性条件 (加熱、酸) 最も組織の保存性がよく、高感度な BrdU を検出条件を検索した。

### (2) BrdU-LRC の分布と標識残存日数の追跡

マウスに BrdU を投与し、投与終了直後 ~ 10 週後にケタミンとメドミジンによる麻酔下で Bouin 液により固定し、上顎を摘出した。Morse 液により脱灰後、常法によりパラフィン包埋切片を作製し、免疫抗体染色法によって BrdU の歯周組織中での局在と標識の残存日数を経日的に調べた。

### (3) マウス再植モデルによる組織侵襲の負荷

マウスに BrdU を投与し、投与終了 4 週後に、麻酔下でマウス上顎第一臼歯を抜去し、同抜歯窩に再植した。また対合歯は抜去した。再植後 0, 1, 3, 5, 7 日に組織を摘出し、常法によりパラフィン包埋切片を作製した。BrdU と細胞増殖マーカー Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) との多重免疫染色を行い、BrdU-LRC の増殖、遊走を追跡した。

### (4) マウス歯根膜 BrdU-LRC の培養

4 週齢の ICR 系マウスの上下顎臼歯を抜去し、Hanks 液で洗浄後、type I collagen ゲル (Cellmatrix type I-A, 新田ゼラチン) に包埋し 10% ウシ胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM で培養した。培養開始後 1, 3, 5, 7 日目にゲルごと Bouin 固定し、Morse 液で脱灰した後、常法によりパラフィン包埋切片を作製し、細胞増殖を組織学的に調べた。また、ゲル培養 3, 7 日後にゲルを trypsin, type I collagenase, および DNaseI により解離し、

プラスチックシャーレに播種した。増殖速度、ならびに50個以上の細胞からなるコロニーの数をシャーレ播種後2,3週後に調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) BrdU 検出の高感度化

DNAに取り込まれたBrdUを免疫組織化学的に検出するには、DNAの変性、核タンパク質の除去などの操作が必要であり、これまで多くの手法が検討されてきた。加えて、硬組織を含む試料の免疫組織化学では、目的組織の細切が困難で時間を要するので、固定、脱灰による抗原性の低下を生じやすい。BrdU-label retaining cell (BrdU-LRC)の分布と再生過程での挙動を追跡するために、固定、脱灰、DNA変性の条件を最適化することにより、硬組織におけるBrdU検出の高感度化を試みた。

その結果、酸によりDNA変性した場合、固定液による検出感度の顕著な差は認められなかった。一方、脱灰液はEDTAよりもMorse液で感度が高かった。加熱によりDNA変性した場合、酸による変性に比べて感度が高かったが、組織の損傷が強く、硬組織に適さなかった。

以上の結果から、Bouin液による固定、Morse液による脱灰、2N HCl (37°C、90分)による変性が最適条件であることがわかった。

##### (2) 歯根膜におけるBrdU-LRCの検出

第一臼歯の歯根が形成される生後11~15日目のICRマウスに1日2回、50・g/g体重のBrdUを皮下注射した。上記の方法でBrdU標識細胞を免疫組織化学法によって検出したところ、BrdU投与終了直後では、歯根膜細胞の約40%がBrdUで標識された。BrdU投与終了後2~10週のBrdU標識の残存を調べたところ、標識細胞の割合は2週で $7.3 \pm 4.5\%$ 、4週で $5.5 \pm 2.7\%$ まで減少したが、その後10週までは4%前後を推移した(図1)。

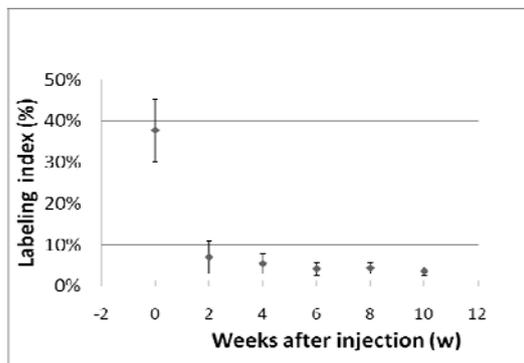


図1. BrdU 残存細胞の推移

このBrdU-LRCは、歯根膜の血管周囲や歯のセメント質近傍に多く分布する傾向が認められた(図2)。

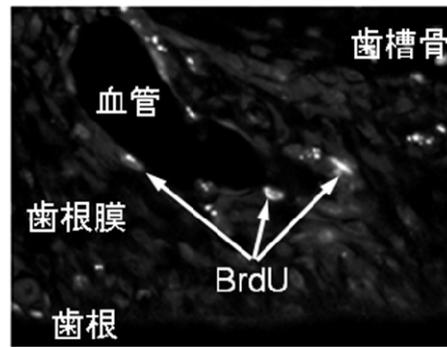


図2. 歯根膜における BrdU-LRC の分布

##### (3) 組織侵襲に対するBrdU-LRCの反応

BrdU投与終了4週後に上顎第一臼歯を抜歯し、再植後のBrdU-LRCの挙動を調べた。細胞増殖マーカーProliferating cell nuclear antigen (PCNA)との二重免疫染色の結果、定常状態ではこれらのBrdU-LRCは増殖していないが、再植後1~3日でBrdU-LRCはPCNA陽性となった(図3)。このことから、BrdU-LRCが再植後の歯根膜の組織修復過程に寄与する可能性が示唆された。

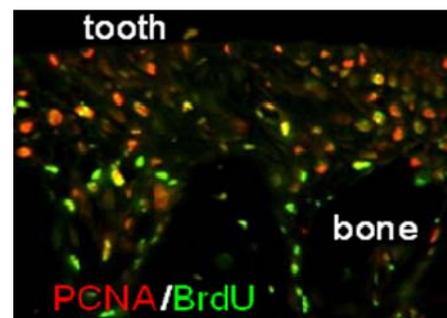


図3. 再植1日後の BrdU-LRC の増殖

##### (4) BrdU-LRCの分離法の検討

マーカーとなりえる分子の発現を調べた。BrdUとの多重免疫染色の結果、BrdU-LRCは・-smooth muscle actin, platelet-derived growth factor receptor-・などを発現していたが、BrdU-LRCに特異的ではなく、分離マーカーとして用いることはできなかった。

また、BrdUによるquenchingを指標とした蛍光染色によるBrdU-LRC分離法について検討した。予備検討としてC3H/10T1/2細胞を30・g/ml BrdUで標識後、trypsin処理により解離し、10・g/ml Hoechst 33342 (Hoe)で37・C、1時間染色した。その後、FACSを用いてHoeの蛍光強度の弱い細胞(Hoe-low)と強い細胞(Hoe-high)とに分画した後、各々スライドガラス上に塗抹固定し、BrdU免疫染色を行った結果、BrdU陽性細胞はHoe-lowにのみが見いだされたことから、Hoe蛍光のquenchingを指標としてFACSによるBrdU標識細胞の濃縮分離が可能であることが示唆された。

しかし、マウス歯根膜は組織量が少なく、細胞の機能解析には多数の個体を必要とするため、BrdU-LRCの分離には至らなかった。そこで歯根膜組織の培養法について検討した。

#### (5) 歯根膜細胞の培養法の検討

メスで剥離したマウス臼歯歯根膜を培養皿に付着させた後out growthしてくる細胞、あるいは組織をcollagenase, dispase, trypsinなどの酵素処理することによって得られる細胞は、組織量に対して得られる細胞数が少なく、また増殖能が非常に低かった。一方、抜去した歯を直接collagenゲル中で培養すると、歯根膜(PDL)細胞は高い増殖能を維持できることが明らかとなった。マウス1匹分の全臼歯12本を約1カ月培養することにより $10^6$ 個以上のPDL細胞が得られた。

次にこの培養法でBrdU-LRCが増殖するかどうかを調べた。生後11~16日の間、BrdUを50・g/g体重で1日2回皮下投与し、その後2週間飼育したICRマウスから臼歯を抜去し、同様にコラーゲンゲル培養した。1, 3, 5, 7日後にゲルごとBouin固定し、パラフィン包埋切片を作製して組織学的に観察したところ、歯根膜のBrdU-LRCはゲル中で増殖を再開することが確認できた。その結果、培養1~3日ではPCNA陽性のBrdU-LRCが検出できたが、3~5日後には分裂によりPCNA陽性細胞からBrdUが検出できなくなった。

次に、ゲル培養後に、酵素処理によってゲル中の歯根膜由来細胞を解離し、プラスチックシャーレに播種した。単層培養下での増殖速度を比較したところ、ゲル培養の期間に依存して増殖速度、ならびにコロニー形成細胞の出現頻度が有意に増加した(図4)。

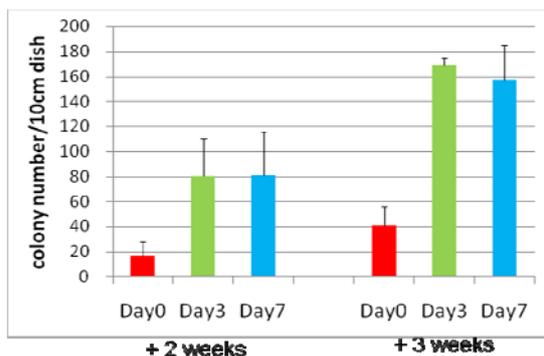


図4. ゲル培養によるコロニー形成の増加

以上の結果、コラーゲンゲル培養法は、歯根膜に分布するBrdU-LRC、すなわち幹細胞様細胞を効率的に培養する方法として有用であることが分かった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ①Nifuji A, Ideno H, Ohyama Y, Takanabe R, Araki R, Abe M, Noda M, Shibuya H. Nemo-like kinase (NLK) expression in osteoblastic cells and suppression of osteoblastic differentiation. *Exp Cell Res*. 査読有, Vol. 316, 2010, 1127-1136.
- ②Ideno H, Takanabe R, Shimada A, Imaizumi K, Araki R, Abe M, Nifuji A. Protein related to DAN and cerberus (PRDC) inhibits osteoblastic differentiation and its suppression promotes osteogenesis in vitro. *Exp Cell Res*, 査読有, Vol. 315, 2009, 474-484.
- ③Shimada A, Shibata T, Komatsu K, Nifuji A. Improved methods for immunohistochemical detection of BrdU in hard tissue. *J Immunol Methods*. 査読有, Vol. 339, 2008, 11-16.
- ④Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K, Chiba M. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth. *J Periodont Res*, 査読有, Vol. 43, 2008, 194-200.
- ⑤ Komatsu K, Shibata T, Shimada A. Analysis of contribution of collagen fibre component in viscoelastic behaviour of periodontal ligament using enzyme probe. *J Biomech*, 査読有, Vol. 40, 2007, 2700-2706.
- ⑥Ujiie Y, Shimada A, Komatsu K, Gomi K, Oida S, Arai T, Fukae M. Degradation of Noncollagenous Components by Neutrophil Elastase Reduces the Mechanical Strength of Rat. *J Periodont Res*, 査読有, Vol. 43, 2008, 22-31.
- ⑦ Komatsu K, Sanctuary C, Shibata T, Shimada A, Botsis J. Stress-relaxation and microscopic dynamics of rabbit periodontal ligament. *J Biomech*, 査読有, Vol. 40, 2007, 634-644.

[学会発表] (計13件)

- ①Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Ideno H, Nifuji A. Alendronate affects proliferation and alkaline phosphatase activity of osteoblasts. 2nd Meeting of IADR Pan Asian Pacific Federation (PAPF) and the 1st Meeting of IADR Asia/Pacific Region (APR). Sept. 22-24, 2009, Shangri-La Hotel, Wuhan, China.
- ②柴田達也、島田明美、出野尚、田畑泰彦、二藤彰. 骨再生を目的としたプラスミドDNAによるin vivo 遺伝子導入のためのキャリアーの検討. 第27回日本骨代謝学会学術集会, 2009年7月25日, 大阪国際会議場

- ③小松浩一郎、島田明美、柴田達也、出野尚、二藤彰。骨芽細胞の生存と分化に及ぼすアレンドロネートの影響は分化段階により異なる。第27回日本骨代謝学会学術集会，2009年7月25日，大阪国際会議場
- ④柴田達也、島田明美、出野尚、田畑泰彦、二藤彰。生体吸収性材料とBMP-2 プラスミドDNAの組合せによる頭蓋骨欠損修復の試み。第8回日本再生医療学会総会，2009年3月5日，東京国際フォーラム
- ⑤荒木香映子、石川万里子、只木麻友、柴田達也、島田明美、出野尚、田畑泰彦、二藤彰。骨再生を目指したプラスミドDNAによる頭蓋骨欠損修復モデルの確立。第21回日本歯科医学会総会。2008年11月15, 16日。パシフィコ横浜 会議センター。
- ⑥小松浩一郎、島田明美、柴田達也、二藤彰。局所適用アレンドロネートの骨リモデリングに及ぼす影響。第26回日本骨代謝学会学術集会。2008年10月29日，大阪国際会議場。
- ⑦柴田達也、島田明美、出野尚、田畑泰彦、二藤彰。プラスミドDNA遺伝子導入による骨再生の試み。第26回日本骨代謝学会学術集会。2008年10月29日，大阪国際会議場。
- ⑧島田明美、柴田達也、小松浩一郎、二藤彰。硬組織におけるBrdU免疫組織化学の高感度化。第26回日本骨代謝学会学術集会。2008年10月29日，大阪国際会議場。
- ⑨Komatsu K, Shibata T, Shimada A, Nifuji A. Effect of topical alendronate on bone formation around replanted teeth. The 81st Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2008年3月17日, Pacifico Yokohama Conference Center.
- ⑩島田明美、小松浩一郎、氏家優子、五味一博、二藤彰、深江允。ラット歯根膜の機械的性質における非コラーゲン性タンパク質の役割。日本歯周病学会50周年記念大会，2007年9月22日，東京国際フォーラム。
- ⑪Nifuji A, Ideno H, Takanabe R, Shimada A, Araki R, Abe M. Protein Related to DAN and Cerberus (PRDC) is expressed in skeletogenesis and prevents osteoblastic differentiation. The 29th meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), 2007年9月16-19日, Honolulu, Hawaii.
- ⑫小松浩一郎、柴田達也、島田明美、二藤彰。アレンドロネート局所適用した再植歯周囲の骨密度と細胞増殖。第49回歯科基礎医学会学術大会。2007年8月30日，北海道大学
- ⑬島田明美、柴田達也、小松浩一郎、二藤彰。硬組織におけるBrdU免疫組織化学の最適

化。第49回歯科基礎医学会学術大会，2007年8月31日，北海道大学

〔その他〕

ホームページ

<http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/dental/kouza/yakuri.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島田 明美 (SHIMADA AKEMI)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号：00339813

### (2) 研究分担者

柴田 達也 (SHIBATA TATSUYA)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号：90323708

二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：00240747

### (3) 連携研究者

なし