

令和元年6月19日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11001

研究課題名(和文) 歯根膜オキシタラン線維の機能的特性の解明 - 眼球毛様体小帯との比較解析 -

研究課題名(英文) Functional properties of oxytalan fibers in periodontal ligaments -comparison with ciliary zonules-

研究代表者

敦賀 英知 (Tsuruga, Eichi)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：30295901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜と眼球毛様体小帯にはオキシタラン線維が存在する。両組織のオキシタラン線維を比較し機能的な歯根膜オキシタラン線維の形成に関係する分子を明らかにすることを目的とした。歯根膜オキシタラン線維と産生細胞間との角度には規則性が認められた。Fibulin-5とMAGP-1は歯根膜ではオキシタラン線維とほぼ共存するのに対し、毛様体小帯でMAGP-1が形成後期に一部が共存した。LTBP-2は歯根膜では比較的後期に、毛様体では前期に観察された。両組織間の比較結果は更なる分子間解析を通して組織再生の標的分子として臨床応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オキシタラン線維は、歯根膜において考えられる咬合力の緩衝と、眼球毛様体においてはレンズの厚みの調整と両オキシタラン線維の機能は同じ弾性系線維であるが異なる。両組織のオキシタラン線維を比較することにより、歯根膜オキシタラン線維に特徴的な分子をターゲットとして再生治療に直接的な応用が期待される。また、眼科領域においても毛様体上皮が効率的にオキシタラン線維を新生することに応用でき、水晶体維持に貢献できるものとする。

研究成果の概要(英文)：Pure oxytalan fibers are in periodontal ligaments and ciliary zonules. The oxytalan fibers in periodontal ligaments are formed by periodontal ligament fibroblasts, whereas ciliary zonules are by nonpigmented ciliary epithelial cells. The molecular components of oxytalan fibers between periodontal ligaments and ciliary zonules may be different. Therefore, we compared main molecules of oxytalan fibers in vitro. The angle of oxytalan fibers against the long axis of the fibroblasts contains constant regularity. Fibulin-5 was coexisted with MAGP-1 in periodontal ligaments, whereas Fibulin-5 was partially coexisted with MAGP-1 in ciliary zonules. LTBP-2 expressed at relatively later stage in periodontal ligaments, whereas LTBP-2 expressed at relatively early stage in ciliary zonules. These results might suggest the functional regulators for regenerations of the two distinctive tissues.

研究分野：解剖学

キーワード：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

生体の結合組織における細胞外線維として、主にコラーゲン線維と弾性系線維が存在する。弾性系線維は微細構造学的に直径約12nmの微細線維とそこに沈着するエラスチンにより構成される。微細線維の主要構成分子はFibrillin-1とFibrillin-2である。弾性系線維は微細線維とエラスチンの構成比率から3つの線維に分類される。純粋に微細線維のみからなるオキシタラン線維、大量の微細線維と少量のエラスチンからなるエラウニン線維、少量の微細線維と大量のエラスチンからなる弾性線維である。全身の結合組織にはこれら三種の弾性系線維とコラーゲン線維が混在し、組織に耐久性や弾性を付与している。歯周組織には他の全身の結合組織と同様に弾性系線維とコラーゲン線維が混在する。弾性系線維に焦点を当てて考えると、歯肉には三種の弾性系線維すべてが存在するのに対し、エラスチンの沈着を伴わない純粋なオキシタラン線維は歯根膜に存在する。さらに、純粋にオキシタラン線維のみが存在するのは全身では、歯根膜と眼球の毛様体小帯である。歯周組織の歯根膜オキシタラン線維は、歯根膜線維芽細胞がFibrillin-1とFibrillin-2を産生することにより線維が形成され、オキシタラン線維は歯軸に平行、すなわち歯根膜主線維にはほぼ垂直に存在している。歯周組織の中でも歯根膜のみが純粋なオキシタラン線維を有するという特異性がある。一方、眼球毛様体小帯を構成するオキシタラン線維は、毛様体の無色素毛様体上皮細胞がFibrillin-1を産生することにより線維が形成され、オキシタラン線維は水晶体と毛様体の間に存在する。歯根膜と眼球のオキシタラン線維はともにその弾性力を用いて組織特有の機能を発揮している。本研究課題では歯根膜と眼球毛様体小帯のオキシタラン線維の構成分子を比較解析することにより歯根膜の固有の特徴を明らかにし、その特異性を解明できると考えた。

2. 研究の目的

歯周組織には細胞外基質として弾性系線維の存在が知られている。歯周組織の中の歯根膜は、エラスチンの沈着を伴わないオキシタラン線維が存在する。生体で純粋なオキシタラン線維が存在するのは歯根膜と眼球の毛様体小帯であることから、生体のオキシタラン線維を再現する細胞培養系を用いることで、歯根膜と眼球の毛様体小帯のオキシタラン線維の構成分子を比較することができる。このことにより歯根膜の特異性を解析することにより、機能的な歯根膜オキシタラン線維の形成に必要な構成分子を明らかにし、歯根膜の再生に必要なデータを提供することを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養系

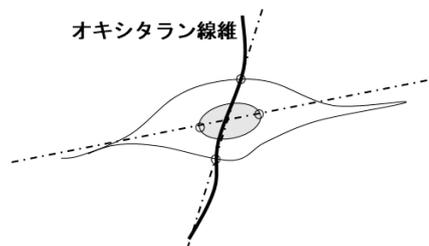
使用細胞は、ヒト歯根膜線維芽細胞(Lonza社)とヒト無色素毛様体上皮細胞(Science Cell Research Laboratories)を用いて、10%血清含有DMEM培地、37°C、5%CO₂の条件下で4週間培養を行った。培地は3日に一度交換し、細胞の状態を位相差顕微鏡で確認した。歯根膜線維芽細胞の細胞伸展の際は伸展率5%で解析を行った。ヒト歯根膜線維芽細胞とヒト無色素毛様体上皮細胞ともに3継代から5継代の細胞を用いた。

(2) トランスグルタミナーゼの解析

培養細胞層を回収し、ウェスタンブロット法によって、オキシタラン線維の構成分子Fibrillin-1とFibrillin-2の架橋酵素であるトランスグルタミナーゼの解析を行った。回収した細胞/細胞外線維層は50mM Tris-HCl、1%Tween-20(pH 7.4)中で機械的に破碎し遠心分離後、上清のタンパク質量を測定して電気泳動を行った。

(3) 細胞とオキシタラン線維のアンクル解析

任意のヒト歯根膜線維芽細胞の細胞長軸とオキシタラン線維の角度(鋭角)を測定した。細胞長軸は細胞核の長軸を細胞長軸とみなした。オキシタラン線維は当該細胞膜とオキシタラン線維の2接点間を結んだ直線を線維上のオキシタラン線維とみなした(下図参照)。



(図の説明) 細胞長軸：細胞核の頂点を結んだ線、オキシタラン線維：オキシタラン線維と細胞膜の交点を結んだ線；細胞長軸とオキシタラン線維のなす角は鋭角を用いた。

(4) オキシタラン線維構成分子の比較解析

ヒト歯根膜線維芽細胞とヒト無色素毛様体上皮細胞の細胞培養層を4週まで、オキシタラン線維主要構成分子 Fibrillin-1, Fibrillin-2 と Fibulin-5, Microfibril-associated glycoprotein (MAGP)-1, Latent transforming growth factor- β binding protein (LTBP)-2 について免疫組織化学染色とウェスタンブロット法を用いて解析した。

免疫組織化学染色は、4%パラホルムアルデヒドにて15分室温にて固定後、ブロッッキングを1時間、一次抗体はブロッッキングバッファーにて希釈して (Fibrillin-1, Fibrillin-2 は2000倍、Fibulin-5 は500倍、MAGP-1 は100倍、LTBP-2 は1000倍) 2時間室温にて反応させた。洗浄後、二次抗体を同様に1000倍希釈して1時間室温にて反応させ洗浄、封入後、蛍光顕微鏡 IX71N-22PH (オリンパス) にて観察した。

ウェスタンブロット法に関しては、トランスグルタミナーゼの解析と同じサンプルを用いて分析を行った。

また一部の分子に関しては免疫沈降法を用いて、分子間の結合を解析した。その際、別に回収した細胞/細胞外線維層をRIPA buffer にて可溶化し、遠心分離後、上清を回収して免疫沈降を行った。

4. 研究成果

(1) トランスグルタミナーゼの発現

歯根膜線維芽細胞と無色素毛様体上皮細胞ともにトランスグルタミナーゼの細胞層への沈着が認められ、ウェスタンブロットの半定量解析によりその沈着量に細胞間で差は認められなかった。細胞培養の培地中も検出を試みたが反応は弱かった。また、歯根膜線維芽細胞と同様に、無色素毛様体上皮細胞と形成されたオキシタラン線維はシート状に剥離解析することができ、生体の毛様体上皮の無色素毛様体上皮細胞とオキシタラン線維を擬似する層構造を示した。さらに無色素毛様体上皮細胞とオキシタラン線維との間に基底膜様構造も確認できたが、基底膜構成分子の解析と通して、詳細な分析が必要である。

(2) アンクル解析

歯根膜線維芽細胞において、細胞長軸とオキシタラン線維の角度は、 68 ± 10 度 ($n=15$) であった。細胞を伸展させた場合の細胞長軸とオキシタラン線維の角度は、 72 ± 14 度 ($n=15$) であった。細胞非伸展と細胞伸展の細胞長軸とオキシタラン線維の角度とは有意差は認められなかった。上皮細胞では多角型構造を有しており、さらに細胞核の長軸が設定できないため、線維芽細胞のみで解析を行った。

(3) オキシタラン線維構成分子の解析

歯根膜線維芽細胞では培養4週目において Fibrillin-1 と Fibrillin-2 は免疫組織化学染色では同様の染色像を示した。無色素毛様体上皮細胞においては、Fibrillin-1 は初期において優位に発現し、オキシタラン線維の成熟に伴って Fibrillin-2 の発現が認められた。半定量解析では免疫染色の結果と同様の発現傾向を示した。

Fibulin-5 に関して、歯根膜線維芽細胞では Fibrillin-1 陽性オキシタラン線維とほぼ完全に共存するのに対し、無色素毛様体上皮細胞では染色性が歯根膜オキシタラン線維に比べ弱かった。半定量解析では免疫染色の結果と同様の発現傾向を示した。免疫沈降により Fibulin-5 と Fibrillin-1 の結合は認められなかった。

MAGP-1 に関して、歯根膜線維芽細胞では Fibrillin-1 陽性オキシタラン線維とほぼ完全に共存するのに対し、無色素毛様体上皮細胞では Fibrillin-1 陽性オキシタラン線維と独立して成長する像が観察され、一部が共存していた。

LTBP-2 に関して、歯根膜線維芽細胞では Fibrillin-1 陽性オキシタラン線維の成熟に伴って発現が観察されたが、無色素毛様体上皮細胞では早期に発現が観察された。半定量解析では免疫染色の結果と同様の発現傾向を示した。

	Fibrillin-1	Fibrillin-2	Fibulin-5	MAGP-1	LTBP-2
歯根膜	++	++	+	++	+
毛様体小帯	+(早期)	+(後期)	+	+	+(早期)

(免疫染色の相対的な蛍光強度を示した)

以上の結果から、歯根膜線維芽細胞と無色素毛様体上皮細胞では、オキシタラン線維の主要構成分子 (Fibrillin-1 と Fibrillin-2) とそれ以外の関連分子 (Fibulin-5, MAGP-1, LTBP-2) とともに発現様式に差異が認められ、両組織におけるオキシタラン線維の固有の特徴を反映して

いるのではないかと考えられる。また、免疫沈降法により Fibrillin-1 を核として分子間の結合も認められ、複数の分子と協調しながら歯根膜組織特有の機能を果たしていることが予想される。本研究で用いた両組織の細胞培養モデルを用いて、更にオキシタラン線維の形成時期による分子間の関係を解析することにより、歯根膜で強調される分子群が組織再生のターゲット分子として臨床応用される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

Tamaoki S, Nakashima K, Yamauchi Y, Yamanouchi K, Fujita T, Tsuruga E, Ishikawa H. Stretching induces the arrangement of the periodontal ligament cells without altering the orientation of oxytalan fibers relative to the cell axis in vitro. Open Journal of Stomatology, 6 巻、2016、252-260.

〔学会発表〕（計2件）

- ① 敦賀英知、毛様体小帯と基底膜複合体の無色素毛様体上皮細胞シートの開発、第55回日本人工臓器学会、2017
- ② 敦賀英知、細胞マトリックス複合体シートの形成を目指した毛様体小帯の培養条件の確立、第53回日本人工臓器学会、2015

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：岡暁子

ローマ字氏名：Oka Kyoko

所属研究機関名：福岡歯科大学

部局名：口腔歯学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60452778

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。