

令和元年6月21日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11663

研究課題名(和文) 器官培養法を用いた歯周組織の分化誘導機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of differentiation of periodontal tissue with the organ culture system.

研究代表者

寺島 達夫(Terashima, Tatsuo)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：20114770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：胎生16.5～17.5日齢のICR系マウス胎仔の下顎臼歯を長期間器官培養を行った。培養歯胚は培養4週以降歯根形成が観察され、歯根象牙質表面にセメント質形成、歯根膜主線維の形成が認められたが、歯根周囲には歯槽骨の形成は観察されなかった。

遺伝子改変マウス(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウス)の歯胚の皮下移植実験では移植片に形成された歯根のセメント質、歯根膜細胞はGFP免疫染色で陽性を示し、移植歯胚の周辺部に形成される骨組織の骨細胞はGFP陰性であった。

歯胚の器官培養系にBMP、TGF-betaの阻害剤を添加すると、培養歯胚の発育分化は著しく抑制され、歯根形成は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯胚の長期間器官培養実験から歯小嚢はセメント質とセメント質側の歯根膜線維の分化形成に関与しており、歯周組織の歯槽骨及び歯槽骨側の歯根膜線維の分化形成には顎骨由来の骨膜成分が直接関与している可能性を示唆した。遺伝子改変マウスの移植実験から歯根に形成されたセメント質と歯根膜細胞の細胞質はGFP免疫染色で陽性を示し、歯周組織のうち、セメント質とセメント質と接する領域の歯根膜は移植した、遺伝子改変マウスの歯胚の歯小嚢細胞から形成されたことを示した。

本研究は歯根側の歯周組織は歯小嚢由来であり、歯槽骨側の歯周組織は顎骨由来であり、歯小嚢がすべての歯周組織に分化するのではないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The long term organ culture system for the tooth germs of mandibular molars were carried out at 16.5 or 17.5 day-old embryonic mouse in ICR strain. The cementogenesis on the root dentin and the embedding of periodontal principal fibers into the cementum were observed, but the formation of alveolar bone adjacent dental root of cultured tooth germ were never recognized. The dorsal subcutaneous transplant experiments of tooth germs of C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) transgenic mouse were performed, and the both cementocyte and cementoblast in cementum of newly formed dental root and periodontal ligament cells in area of periodontium adjacent to dental root were observed the positive reaction in immunohistochemistry against the GFP.

The addition of inhibitors to BMP and TGF-beta in organ culture system of tooth germ arrest the development and differentiation of culture tooth germs and the root formation of culture tooth germ were not observed.

研究分野：解剖学

キーワード：歯周組織再生 器官培養法 分化誘導

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 器官培養での歯根形成 我々が開発してきた歯胚の長期間器官培養系で、今まで移植系以外では不可能であった歯根形成を *in vitro* の系でおこなうことができるようになった。

(2) 歯周組織の分化誘導物質の存在 歯根の発育に關与するヘルトピッチ上皮鞘での上皮の伸長には誘導因子の発現の關与が明らかとなり、また BMP 4, Notch 2, Dspp, FGF 10 などの因子が歯周組織の形成に關与していることも明らかとなった。このことは歯周組織の形成時に、分化誘導に關与する特定の因子が存在することを示唆していた。

(3) 歯周組織形成細胞の分化能 骨組織を含まない歯胚成分のみからなる歯胚の長期間器官培養系では、形成された歯根周囲には歯槽骨の形成は認められなかったことから、歯周組織の正常な分化発育には骨組織由来の成分の存在が必要であることを示唆していた。

2. 研究の目的

今日では未分化間葉系細胞から骨、軟骨、筋、脂肪細胞など、数多くの細胞への分化誘導機構が研究され、特定の分化誘導物質や分化に必須な転写調節因子が明らかにされている。歯周組織中にも間葉系幹細胞が存在し、この細胞が歯周組織細胞(歯根膜細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞)へと分化することが予想されているが、その分化誘導機構はほとんどわかっていない。本研究は、器官培養法を用いて、歯胚での歯周組織形成過程を詳細に調べるとともに、歯周組織への分化誘導の分子機構を明らかにし、歯周組織再生治療の基礎を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯胚の長期間器官培養法

胎生 16.5 ~ 17.5 日齡の ICR 系マウス胎仔の下顎臼歯を Trowell 変法を用いてミリポアフィルター上で培養日数が 70 日間にわたる長期間器官培養を続けた。

培地には基本培地として BGJ-b 培地を用い、10%牛胎仔血清と 2mM グリシン、2mM グルタミン、0.5 mM アスコルビン酸と、50Unit/ml ペニシリン、0.05mg/ml ストレプトマイシン、0.025mg/ml ファンギゾンを追加した。培地は 2 日毎に交換した。

(2) 形態学的観察

培養歯胚は培養終了後直ちに、燐酸緩衝液(0.1M, pH7.4)で緩衝した 4%パラホルムアルデヒド固定液で固定した。その後、培養歯胚の石灰度を調べるため、軟 X 線撮影をおこなった。8% EDTA 脱灰液で脱灰後、パラフィン包埋、テクノビット樹脂包埋、エポン樹脂包埋をおこない、光学顕微鏡で観察をおこなった。

(3) 培養系での歯周組織の分化誘導機構の検討

歯胚の長期間器官培養系の培養液に BMP 阻害剤である LDN193189 (500nM)、TGF-beta 阻害剤である SB431542 (10 μM)、進行性骨化性線維異形成症に適用されている Rapamycin (5 μg/ml) を添加して培養をおこなった。培養 4 週、6 週、8 週後に培養歯胚を 4%パラホルムアルデヒド固定液で固定し、軟 X 線撮影をおこない、脱灰後、パラフィン包埋して光学顕微鏡観察をおこなった。

(4) 歯周組織の形成機構の検討

歯周組織(セメント質、歯根膜、歯槽骨)に分化する細胞の由来を明確にするため、GFP 遺伝子組み換えマウスの歯胚を用いて移植実験をおこなった。移植実験は胎生 16.5 から 18.5 日齡の GFP 遺伝子を組み換えた C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) マウスから歯胚を摘出し、通常の C57BL/6 マウス背部皮下に移植した。移植 4 週後に、移植片を取り出し、4%パラホルムアルデヒド固定液で固定し、軟 X 線撮影をおこない、脱灰後、パラフィン包埋し、HE 染色した。移植歯胚に形成された歯周組織(セメント質、歯根膜、歯槽骨)の形成細胞の由来を明確にするために、パラフィン切片に GFP に対する免疫組織化学をおこなった。

4. 研究成果

(1) 歯胚の長期間器官培養法の再構築

鶴見大学歯学部分子生化学講座に研究拠点を移動し、研究を再開したため、以前おこなっていた歯胚の器官培養法を再稼働するため、実験システムの再構築をおこなった。培養に必要な培地に添加する血清を選定するための Lot Check をおこない、以前と同様な培養結果を得た。

(2) 培養に用いた摘出歯胚の組織構造

器官培養に用いた下顎より摘出した歯胚の組織構造を観察するため、可能な限り組織を傷つけないように注意して、固定脱灰した歯胚をテクノビット樹脂に包埋して観察した。胎生 16 ~ 17 日齡の ICR 系マウスから摘出した歯胚は歯小嚢の外側の疎生結合組織の部位で分離され、歯胚が摘出された顎骨の表面には骨芽細胞が残存していた(図 1)。胎生 17.5 日齡以降では歯胚を摘出した後の歯胚が面していた顎骨の骨表面には、骨芽細胞が剥離しており、骨芽細胞が摘出した歯胚に付着していた(図 2)。胎生 17.5 日齡以降に摘出した歯胚には顎骨由来の骨芽細胞が混在している可能性が考えられた。

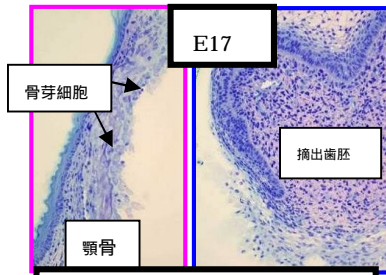


図1 摘出歯胚には骨芽細胞

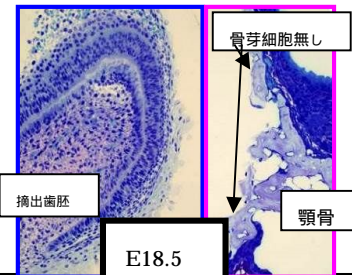


図2 摘出歯胚には歯小囊に混在した歯槽骨由来の骨芽細胞が含まれる。

(3) 長期間器官培養歯胚の組織構造

培養歯胚は培養4週までに歯冠の形成をほぼ完了し、以後歯根の形成が観察された。形成された歯根は単根の形態を示していた。歯根象牙質表面にはセメント芽細胞様の細胞が存在し、セメント質基質の形成と歯根膜主線維が認められた。また歯根周囲には歯槽骨の形成は観察されなかった(図3)。

顎骨骨膜由来成分を含まない胎生16日齢のマウス臼歯の長期間器官培養では、形成された歯根の表面にはセメント質および歯根膜の形成が認められたが、形成された歯根に面した部位には歯槽骨の形成が認められなかった。(図4)。

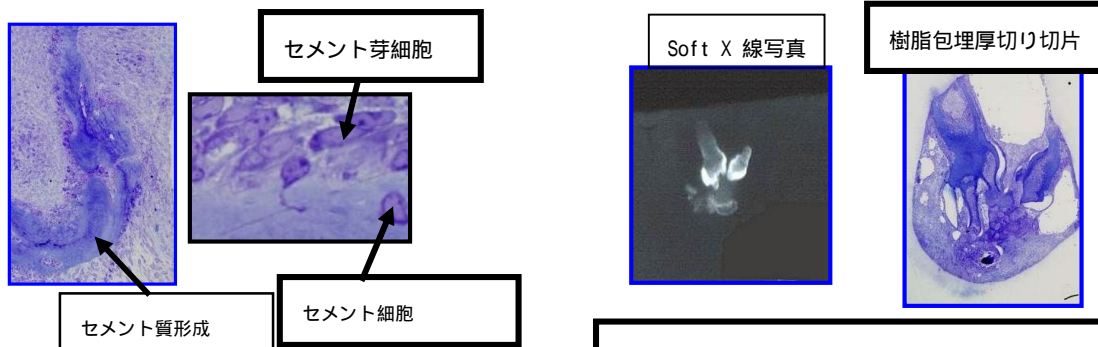


図3 形成された歯根の表面にセメント質の形成が認められる。

図4 長期間器官培養法により、歯根の形成が認められる。形成された歯根周囲には骨組織の形成は認められない。

(4) 歯周組織の形成機構の検討

ICR系マウスとC57BL/6マウスの歯胚の各発育段階の相違を調べた結果、C57BL/6マウスはICR系マウスの歯胚の発育に比べ、約0.5~1日齢の歯胚の発育が遅延していることを確認した。

遺伝子改変マウスC57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウスを用いた歯胚の皮下移植実験
胎生16.5から18.5日齢の移植実験で、すべての日齢で歯根形成が認められ、セメント質と歯根膜の形成が確認できた(図5)。

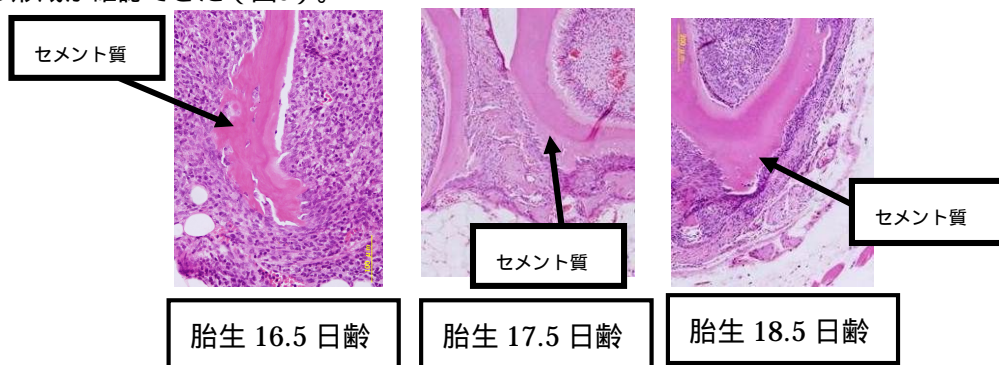


図5 皮下移植歯胚にセメント質と歯根膜を持つ歯根形成が認められる。

移植歯胚のGFPに対する免疫染色による歯周組織の細胞の由来の検索

移植歯胚の歯根に形成されたセメント質のセメント細胞、セメント芽細胞、セメント質に隣接する歯根膜細胞の細胞質はGFP免疫染色では陽性を示す。この観察結果は歯周組織のうち、セメント質とセメント質と接する領域の歯根膜は移植歯胚由来の細胞から形成されたことを示している。また、移植歯胚の歯根に隣接した歯槽骨の形成は観察されないが、移植歯胚の周辺部にはわずかな骨組織が形成されるが、形成された骨組織の骨細胞はGFP陰性で、移植宿主であるC57BL/6マウス由来であることが確認できた(図6)。

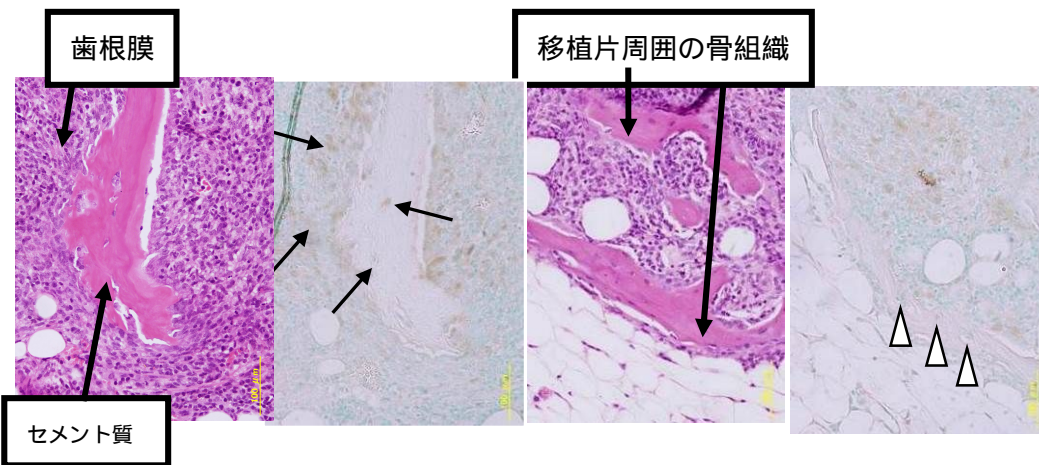


図6 E16.5の移植歯胚 GFP陽性細胞はセメント細胞セメント芽細胞、歯根膜細胞に認められる(矢印)。一方、移植片周囲の骨細胞、骨芽細胞はGFP陰性であった(矢頭)。

一方、胎生18.5日齢のC57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウスから摘出した移植歯胚では、歯根表面に隣接して歯槽骨様の骨組織の形成が観察された。この骨組織にはGFP陽性な骨細胞が含まれていた。さらに、移植歯胚の周辺部に形成される骨組織の骨細胞はGFP陰性であった。胎生18.5日齢のC57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウスから摘出した移植歯胚の歯小囊には歯槽壁から剥がれた細胞が混在していることから、この混在した骨芽細胞から歯槽骨様骨組織が形成された可能性が示唆された(図7)。

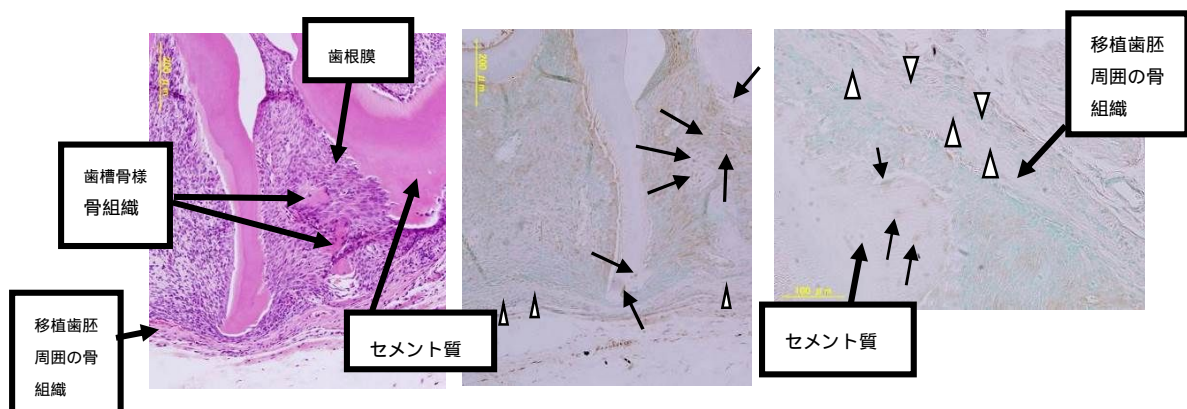


図7 E18.5の移植歯胚 GFP陽性細胞はセメント細胞セメント芽細胞、歯根膜細胞、歯槽骨様骨組織に認められる(矢印)。一方、移植片周囲の骨細胞、骨芽細胞はGFP陰性であった(矢頭)。

(5) 培養系での歯周組織の分化誘導機構の検討

LDN193189添加群では培養歯胚の発育分化は著しく抑制され、培養4週目ではコントロール群に比べ、歯胚の形態は著しく変形し、エナメル器の分化が阻害され、石灰化およびエナメル質形成も阻害されていた。(図8)。

SB431542添加群では、培養歯胚の歯冠形成は進むが、エナメル質形成が認められるが、石灰化が著しく阻害されていた。また、エナメル器の分化が阻害され、上皮鞘の形成が生じないため、歯根形成は認められなかった。(図9)。

Rapamycin添加群では、歯胚の外形はやや小型化するが、エナメル質形成や石灰化も影響を受けず、歯根形成も観察された。また、培養歯胚の周囲には骨組織の形成が観察されなかった。

(図10)。

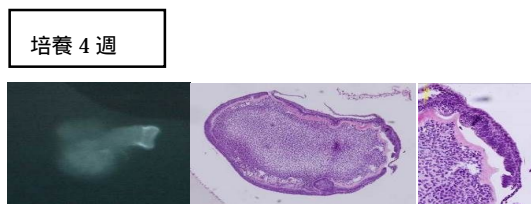


図 8 LDN193189 添加群

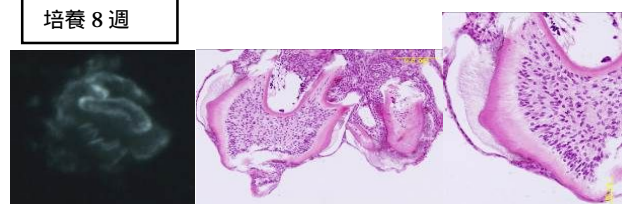


図 9 SB431542 添加群

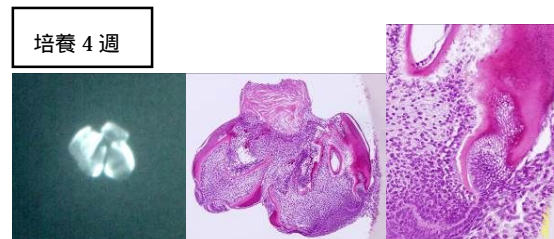


図 10 Rapamycin 添加群

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Baba TT, Terashima T, Oida S. Liver-type of tissue non-specific alkaline phosphatase is induced during mouse bone and tooth cell differentiation, Arch. Oral Biol. 査読あり、98 巻、2019、32-37、doi:10.1016/j.archoralbio.2019.10.036

Karakida T, Onuma K, Saito MM, Yamamoto R, Chiba T, Chiba R, Hidaka Y, Abe-Fujii K, Kawahara H and Yamakoshi Y. Potential for drug repositioning of midazolam for dentin regeneration. Int. J. Mol. Sci. 査読あり、20 巻、2018、E670 doi:10.3390/ijms20030670

Yamakawa S, Niwa T, Karakida T, Kobayashi K, Yamamoto R, Chiba R, Yamakoshi Y and Hosoya N. Effects of Er:YAG and Diode Laser Irradiation on Dental Pulp Cells and Tissues. Int. J. Mol. Sci. 査読あり、19 巻、2018、2429. doi.org/10.3390/ijms19082429.

Okubo M, Chiba R, Karakida T, Yamazaki H, Yamamoto R, Kobayashi S, Niwa T, Saito MM, Margolis HC, Nagano T, Yamakoshi Y and Gomi K. Potential Function of TGF- β Isoforms in Maturation-Stage Ameloblasts. J Oral Biosci. 査読あり、61 巻、2018、43-54. doi:https://doi.org/10.1016/j.job.2018.12.002

Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Arai Y, Terashima T, Tomooka Y, Nakamura Y, Nakashihima K, Kimura H, Shinkai Y, Takchibana M, Nifuji A, .Essential roles of G9a in cell proliferation during tooth development. Exp. Cell Res. 査読あり、357 巻 2017、202 - 210、

〔学会発表〕(計 18 件)

千葉理紗子, 山本竜司, 大久保水羽, 山越康雄, プタ幼若エナメル質中のケラチン 75 について、第 60 回 歯科基礎医学会学術大会、2018

Okubo M, Kobayashi S, Nagano T, Gomi K, Yamakoshi Y. TGF- β isoforms in enamel of Mmp20 knockout mice. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017

Saito M, Karakida T, Yamamoto R, Oida S, Yamakoshi Y. Effect of TGF- β and BMP on spheroid formation of dental pulp cells. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017

島崎絵美, 唐木田丈夫, 山本竜司, 朝田芳信, 山越康雄 生理的乳歯歯根吸収組織の存在する TGF- β 1 の発現と破歯細胞の分化誘導調節について、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016

唐木田丈夫, 大井田新一郎, 山本竜司, 齊藤まり, 山越康雄 プタ歯髓細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす BMP2 と TGF- β の影響、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大井田 新一郎

ローマ字氏名：Oida Shinichiro

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：10114745

研究分担者氏名：山越 康雄

ローマ字氏名：Yamakoshi Yasuo

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20182470

研究分担者氏名：唐木田 丈夫

ローマ字氏名：Karakida Takeo

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：40367305

研究分担者氏名：山本 竜司

ローマ字氏名：Yamamoto Ryuji

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：学内講師

研究者番号（8桁）：20410053

(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。