

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17090

研究課題名(和文)新機軸イメージングによる歯根膜線維形成過程の解明

研究課題名(英文)An investigation into the formation processes of collagen bundles in periodontal ligament by innovative imaging methods

研究代表者

平嶋 伸悟(Hirashima, Shingo)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70647784

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究ではFIB-SEMを用いて、歯根膜細胞・線維束の3次元微細構造について解析した。その結果、歯根膜細胞は紡錘形ではなく、扁平な形態であること、また線維束は歯根膜細胞に覆われた複数の分岐を持つ形態であることが明らかとなり、歯根膜細胞性ネットワークの存在を形態学的に示した。さらに、力学的負荷が変化した場合の細胞と線維の変化についても解析した。その結果、細胞性ネットワークを維持したまま、細胞の配列が変化し、線維束は細くなる傾向があることを示した。本研究を含めたこれまでの研究から、セメント質・歯根膜・骨における異種細胞間ネットワークが存在し、歯根膜の形成・配向性決定に関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜は歯の周囲に存在し、コラーゲン線維(歯根膜線維)を主体とする組織であり、歯の機能に必須である。また、臨床的にも治療の予後に関わる重要な組織である。しかしながら、歯-骨間にわたる長い歯根膜線維の形成過程、線維の配向性はどのように決められるのか、力学的負荷による歯根膜線維の改変過程など、未だ不明な点が多い。本研究は、これまで技術的な問題から困難であったメソスケールでの歯根膜細胞と歯根膜線維束の3次元微細構造を明らかにした。また、セメント質-歯根膜-骨における異種細胞間ネットワークの存在を形態学的に示した。本研究の結果は今後、歯の再生治療を検討していく上で、基盤的知見になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文):The periodontal ligament (PDL) has important functions besides tooth anchoring including proprioception, sensory detection, and repair of damaged tissue. However, little is known about how the regular-PDL fiber bundle arrays are formed, maintained, and remodeled over large distances from cementum to alveolar bone. We investigated the three-dimensional ultrastructure of PDL fibroblasts (PDLFs) and PDL collagen bundles by FIB-SEM tomography. We have shown that PDLFs have a flat shape with long processes or a wing-like shape, not spindle shape, while PDL bundles are a multiple-branched structure wrapped in thin sheets of PDLF cytoplasm. Furthermore, PDLFs form an extensive cellular network between the cementum and alveolar bone. Our previous histomorphological study revealed the osteocyte-osteoblast-PDL cellular network. We extended this knowledge and revealed the cementum-PDL-bone cellular network, which may orchestrate the remodeling and modification of periodontal tissue.

研究分野：解剖学

キーワード：歯根膜 FIB-SEM 3次元解析 コラーゲン線維 ボリュームイメージング 定量解析 細胞性ネットワーク 異種細胞間ネットワーク

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯の周囲に存在し、コラーゲン線維(歯根膜線維)を主体とする線維性結合組織である。歯根膜線維は歯-骨間を走行し、その両端は硬組織中(セメント質、骨)に存在する特殊な構造を持ち、部位により一定の配向性を示す。歯根膜の機能は歯の顎骨へ固定・咬合力の干渉・噛み応え(力学的負荷)の感知などがあげられ、歯の機能を維持している。成長や加齢、臨在歯や対合歯の喪失等の力学的負荷の変化により歯根膜線維の改変・歯槽骨のリモデリングが起こり、歯は移動する。歯根膜が存在しない骨性癒着歯の場合、力学的負荷が変化しても歯の移動は起こらない。歯科臨床において、力学的負荷の変化による歯の移動を応用したのが、矯正治療である。また、歯周治療や再生療法では歯根膜再生が治療のキーポイントである。歯根膜に関しては歯根膜内の細胞はギャップ結合により連結している事、歯根膜の線維芽細胞が歯根膜線維を形成する事等は知られているものの、歯-骨間にわたる単一細胞だけではカバーできない長い歯根膜線維がどのように形成されるのか、線維の配向性はどのように決められるのか、力学的負荷による歯根膜線維の改変はどのような過程を辿るのかなどは、技術的な問題から機能形態学的・動態学的に未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

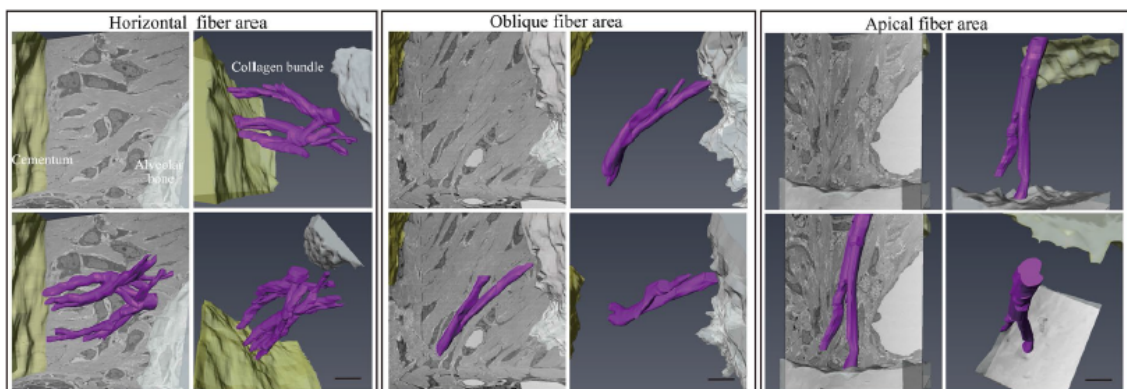
申請者はこれまでに歯根膜細胞の3次元形態、細胞と線維との3次元的な関係性について解析を進めてきた。本研究計画の3年間ではこれまでの成果に加え、**FIB-SEM tomography**を基軸とした解析を進める。これにより、歯根膜における線維形成と細胞間ネットワークとの関連性、力学的負荷の変化により線維形成と細胞間ネットワークにどのような変化が見られるか、力学的負荷の変化による線維改変過程を、3次元的かつ定量的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

観察対象歯(下顎第一臼歯)の対合歯の削合もしくは抜去をし、咬合圧を除去した歯全体に力学的負荷がないモデルを作成し、解析する。具体的方法はC57BL/6マウスを用い、イソフルレン麻酔下に片側の下顎第一～三臼歯の歯冠を歯科用スチールバーで歯肉縁部まで削合する。術後1週目に実験動物を深麻酔後、脱血を行う。half Karnovsky液にて灌流固定した後下顎骨を採取。その後、脱灰し、下顎骨から歯根膜を含む歯周組織を一塊として摘出、トリミング後、*en bloc*染色を行う。染色後はエポキシ樹脂に包埋し、重合させる。樹脂包埋された試料をトリミングし、準超薄切片にて観察の目的部位を確認後、試料をFIB/SEMで観察する。観察は歯槽縁部、歯根中央部、根尖部とする。観察範囲は100 μ m角とし、100nm間隔で試料表面の切削を行い、画像取得を行う(2,000～3,500倍)。この観察範囲でマウスの歯から骨までの範囲をカバーでき、歯-骨間に存在する歯根膜線維と細胞を高分解能で観察することができる。解析ソフトを用い、得られた画像データから線維と細胞の3次元再構築を行う。3次元的な定量解析により細胞の体積、表面積、異方性、偏平率、伸展度等を明らかにし、さらに歯根膜線束の断面の直径・面積を観察部位別に明らかにし、正常歯根膜との比較を行う。

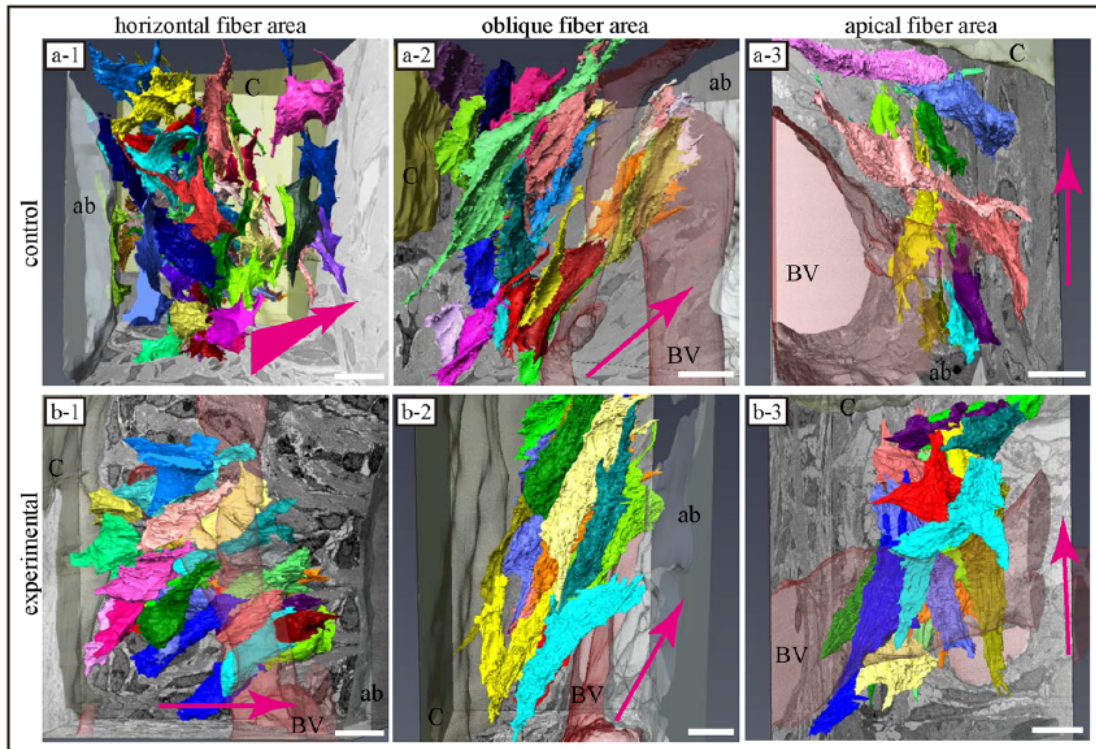
4. 研究成果

まず正常歯根膜における歯根膜線維束の微細形態について解析を行った。その結果、正常な歯根膜線維において水平線維群、斜走線維群、根尖線維群では線維束の形態が異なり、水平線維群は網目状構造で分岐を複数持っているが、斜走線維群、根尖線維群ではロープ状形態で分岐が少ない事がわかった。また、その断面の直径・面積は水平線維群と斜走線維群、根尖線維群とでは有為な差がみられ、水平線維群が直径が太い事がわかった。(下図)

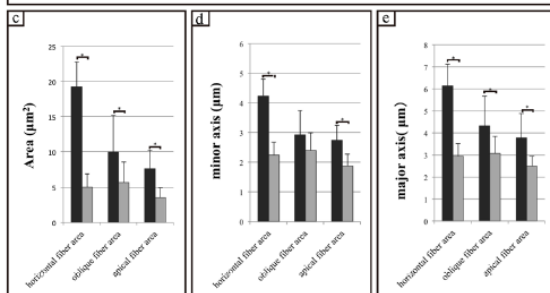
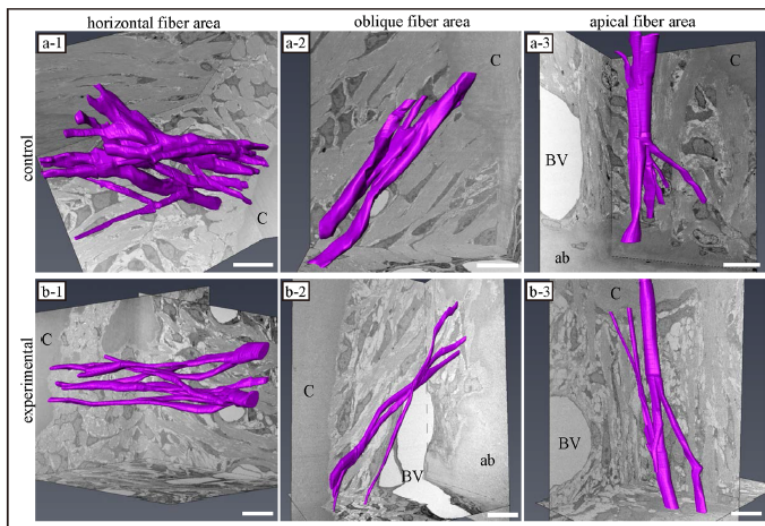


(歯根膜線維束の3次元再構築による形態解析)

次に通常の力学的負荷を変化させたモデルマウスを作成・解析を進めた。モデルマウスとして観察対象歯の対合歯を削合し、咬合圧を除去した（咬合圧除去モデル）モデルを作成・使用した。FIB-SEMを基軸に、歯根膜細胞と線維の3次元構築について部位別（水平線維群・斜走線維群・根尖線維群）に観察し、3次元微細構造の変化について解析を行った。その結果、力学的負荷が変化すると歯根膜線維束は全ての部位で細くなる傾向を示した。細胞形態に関する定量解析において、水平線維群では細胞の長軸と線維束のなす角度は有為な差を示し、水平線維群において細胞配列が変化した（下図）。



(咬合喪失に伴う歯根膜細胞の変化、上段：対照群、下段：実験群)

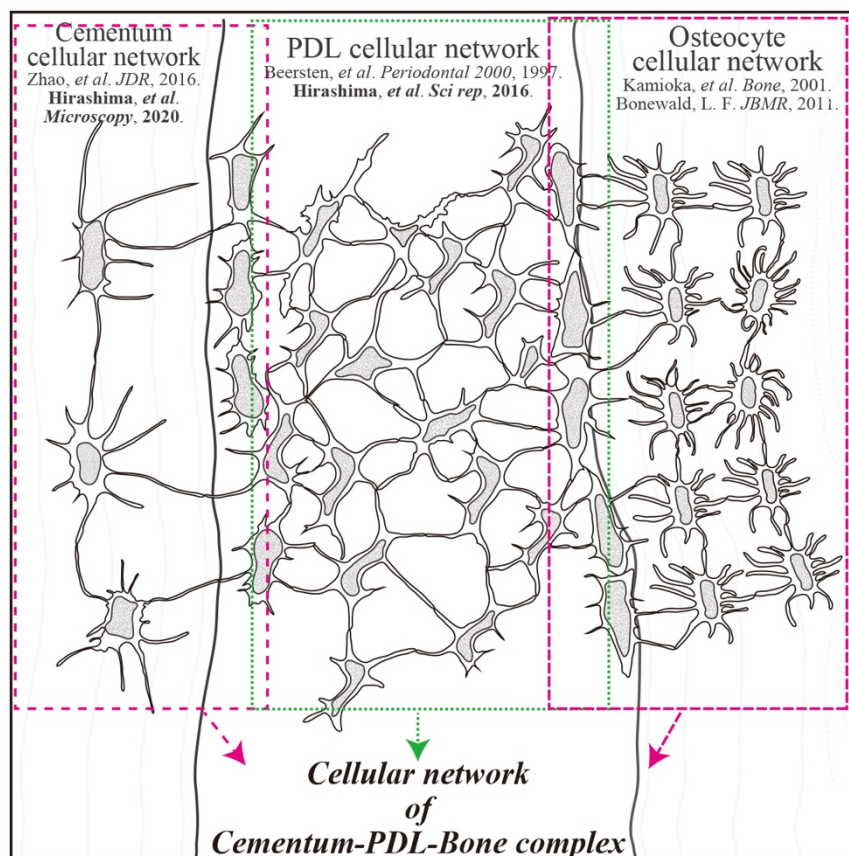


(咬合喪失に伴う歯根膜線維束の変化と形態計測 a：対照群、b：実験群、c～e：形態計測のグラフ)

また、細胞が周囲の線維と接する比表面積は（1細胞の体積あたりの表面積）変化しなかった。さらに、実験群および対照群のいずれにおいても広範囲な細胞性ネットワークが存在することをも示した。今回の結果により、歯根膜線維は細胞内-外・細胞間での形成の過程を辿るため、力学的負荷が変化しても細胞形態は変化しないこと・歯根膜線維は1細胞だけでは賅いきれない長い距離があるため、線維束の改変には細胞性ネットワークが機能している可能性があることが考えられる。

さらに歯根膜細胞性ネットワークのセメント質境界面における形態的特徴について、FIB-SEMを用い3次元構造解析を行った。その結果、歯根膜細胞の突起とセメント細胞の突起が連結しており、セメント質内の細胞も細胞性ネットワークを形成していた。

これまでに我々は歯根膜細胞と骨芽細胞・骨細胞の形態学的な連結も報告してきた（2016年度 Scientific reports 誌）。これらの結果と本研究の結果より、セメント質-歯根膜-骨細胞ネットワークが存在しており、この異種細胞間ネットワークは歯根膜（歯・骨間を走行し、その両端がセメント質・骨内に存在する特殊な構造を持つ）の形成に関与する可能性が考えられた（下図）。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirashima Shingo, Ohta Keisuke, Kanazawa Tomonoshin, Okayama Satoko, Togo Akinobu, Miyazono Yoshihiro, Kusakawa Jingo, Nakamura Kei ichiro	4. 巻 55
2. 論文標題 Three dimensional ultrastructural analysis and histomorphometry of collagen bundles in the periodontal ligament using focused ion beam/scanning electron microscope tomography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 23～31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazono Yoshihiro, Hirashima Shingo, Ishihara Naotada, Kusakawa Jingo, Nakamura Kei-ichiro, Ohta Keisuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 39435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-18582-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirashima Shingo, Ohta Keisuke, Kanazawa Tomonoshin, Togo Akinobu, Kakuma Tatsuyuki, Kusakawa Jingo, Nakamura Kei-ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructural and histomorphological analysis of the periodontal ligament with occlusal hypofunction via focused ion beam/scanning electron microscope tomography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45963-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirashima Shingo, Kanazawa Tomonoshin, Ohta Keisuke, Nakamura Kei-ichiro	4. 巻 95
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructural imaging and quantitative analysis of the periodontal ligament	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 1～11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-019-00502-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirashima Shingo, Ohta Keisuke, Kanazawa Tomonoshin, Togo Akinobu, Tsuneyoshi Risa, Kusakawa Jingo, Nakamura Kei-ichiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Cellular network across cementum and periodontal ligament elucidated by FIB/SEM tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 53 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfz117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平嶋伸悟, 都合亜記暢, 常吉梨沙, 太田啓介, 楠川仁悟, 中村桂一郎
2. 発表標題 セメント細胞ネットワークの3次元構造解析
3. 学会等名 日本解剖学会第75回九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平嶋伸悟
2. 発表標題 FIB/SEM tomographyを用いた咬合喪失時 (挺出時) における歯根膜の3次元構造解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 啓介, 都合 亜記暢, 東 龍平, 平嶋 伸悟, 力丸 由起子, 中村 桂一郎
2. 発表標題 樹脂包埋試料の FIB-SEM tomography への応用と切片観察との違い
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第75回学術講演 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平嶋伸悟
2. 発表標題 新機軸イメージングによる歯根膜形成過程の解明
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平嶋伸悟, 金澤知之進, 都合亜記暢, 岡山聡, 宮園 佳宏, 太田啓介, 楠川仁悟, 中村桂一郎.
2. 発表標題 歯根膜線維束の3次元組織形態計測.
3. 学会等名 日本解剖学会第74回九州支部学術集会. 口演発表
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平嶋伸悟
2. 発表標題 3Dボリュームイメージングによる歯根膜のメソスケール構造解析
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 卓, 金澤 知之進, 太田 啓介, 平嶋 伸悟, 中村 桂一郎
2. 発表標題 正常腭骨付着部発達における付着部細胞の形態分布変化
3. 学会等名 日本顕微鏡学会総会第74回学術講演
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田啓介、力丸由起子、岡毅、右田尚、古賀憲幸、平嶋伸悟、中村桂一郎
2. 発表標題 FIB-SEMトモグラフィーの皮膚臨床課題への挑戦
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平嶋伸悟、金澤知之進、都合亜記暢、岡山聡子、太田啓介、中村桂一郎
2. 発表標題 力学的負荷に対する歯根膜細胞の3次元形態変化の計測
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平嶋伸悟、太田啓介、金澤知之進、都合亜記暢、岡山聡子、中村桂一郎
2. 発表標題 FIB/SEM tomographyを用いた歯根膜細胞の3次元形態計測
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第73回学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中村 桂一郎 (Nakamura Kei-ichiro)	久留米大学・医学部 解剖学講座 顕微解剖・生体形成部門・教授	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	太田 啓介 (Ohta Keisuke)	久留米大学・先端イメージング研究センター・教授	
研究協力者	金澤 知之進 (Kanazawa Tomonoshin)	久留米大学・医学部 解剖学講座 顕微解剖・生体形成部門・客員教授	
研究協力者	都合 亜記暢 (Togo Akinobu)	久留米大学・先端イメージング研究センター・技術職員	