

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17305

研究課題名(和文) Scleraxisによる歯根膜間葉系幹細胞の分化制御の解明と歯周組織再生への応用

研究課題名(英文) Scx regulates differentiation of PDL cells into osteoblasts under tensile force loading

研究代表者

川津 正慶 (Kawatsu, Masayoshi)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70712925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、メカニカルストレスが負荷された環境におけるScxによる歯根膜(PDL)細胞の運命決定の分子メカニズムの解明を目的とした。マウスを用いた実験的歯の移動の牽引側では、Scxを発現するPDL細胞が増加した。また、牽引側のPDL細胞におけるTGF- $\beta$ 1とp-Smad3の発現が増加した。In vitroにおけるPDL細胞への牽引力負荷実験の結果、TGF- $\beta$ 1シグナリングによるScx発現制御が示された。また、Scxノックダウンにより、牽引力によるALP発現が上昇した一方、ephrin A2の発現は減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、メカニカルストレスが負荷された環境におけるScxによるPDL細胞の骨芽細胞分化の抑制的制御と、その分子メカニズムが明らかになった。これらの成果は、歯根膜細胞シートを用いた歯周組織再生治療方法の開発へとつながる基盤的知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：I examined effect of Scx on tensile force-induced osteoblast differentiation and its underlying mechanisms. In the mouse experimental tooth movement model, expression of Scx, TGF- $\beta$ 1, p-Smad3 increased on the tension side PDL. I loaded tensile force onto cultured PDL cells. The in vitro data showed TGF signaling regulated tensile force-induced Scx expression. Scx knockdown in PDL cells upregulated ALP expression, while inhibited ephrin A2 expression.

研究分野：矯正歯科

キーワード：scleraxis 歯根膜細胞 機械的刺激

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、歯槽骨と歯のセメント質の二つの硬組織の間に存在する線維性組織であり、生理的状态下において歯の支持、感覚の受容、血管網による栄養の供給、および歯周組織の維持・再生に役割を果たしている。また歯根膜は、咬合などのメカニカルストレスを受容し緩衝作用を発揮することにより、歯と周囲組織をこれらの刺激から保護する。ところで、歯に矯正力を負荷すると、歯根膜では牽引および圧迫領域が生じ、牽引側では骨芽細胞による骨形成が、圧迫側では破骨細胞による骨吸収が起こり、歯槽骨のリモデリングにより歯槽骨中を歯が移動する。興味深いことに、健全な歯周組織を有する患者における矯正歯の移動の間、過剰な骨形成に起因する歯と歯槽骨の骨性癒着は生じず、歯根膜組織は恒常的に維持される。このメカニカルストレスが負荷された歯根膜の恒常性維持機構の詳細を知ることは、健全な矯正歯の移動を達成するうえで有益である。歯根膜細胞は、歯根膜および歯槽骨を含む歯周組織への分化能を持つことから、歯根膜細胞の運命決定に関わる分子機構が、メカニカルストレスが負荷された歯根膜の恒常性維持に関わると考えられるが、その詳細は不明である。

Scleraxis (Scx)は胚発生において腱・靭帯形成領域で発現する basic helix-loop-helix 型の転写因子であり、腱細胞の分化および成熟において重要な役割を担っている。近年、我々のグループは、Scx のプロモーター活性により GFP を発現するトランスジェニックマウスを樹立し、実験的歯の移動手法の一つである Waldo 法を行い、メカニカルストレスが負荷された歯根膜における Scx の発現を解析した。その結果、メカニカルストレス負荷後 48 時間の牽引側歯根膜において、Scx の発現が上昇することを明らかにした(Takimoto, Kawatsu et al., Development, 2015)。また in vitro において、ラット歯根膜細胞で Scx を過剰発現させたところ、骨芽細胞マーカーであるオステオカルシンが顕著に抑制され、一方、Scx をノックダウンすると、オステオカルシンの発現が上昇した(Takimoto, Kawatsu et al., Development, 2015)。これらのことから、Scx は歯根膜細胞の骨芽細胞分化を抑制的に制御することが明らかになり、Scx が歯根膜の恒常性維持に役割を果たすことが示唆される。

歯周病は、プラーク(歯垢)に潜む歯周病菌が原因となって引き起こされる感染症であり、重症化すると歯周組織が破壊され、やがては抜歯が不可避となる。失われた歯周組織の再生を促す治療方法として組織再生誘導法(guided tissue regeneration, GTR)や、エムドゲインが知られている。一方で、歯根膜細胞をシート状に培養し、歯周組織再生に応用する研究が進められてきた。現在では「自己培養歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再建」と題した臨床試験がスタートし、患者自身の歯根膜細胞を用いた細胞シートの自家移植による歯周組織の再生医療が現実的となってきた。人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、無限の増殖能と多分化能を有し、倫理的問題が少ないことから、再生医療の有効な細胞ソースとして、社会から大きな期待が寄せられている。iPS 細胞から歯根膜細胞を誘導し細胞シートを作製する技術が開発できれば、患者の歯根膜細胞供給源の制限を受けることなく、また歯根膜細胞を採取する際の外科的侵襲なく、歯根膜細胞シートを用いた歯周組織再生治療を患者に提供することが可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、iPS 細胞から歯根膜細胞への効果的な分化誘導の確立を目指して、メカニカルストレスが負荷された環境における Scx による歯根膜細胞の運命決定の分子メカニズムの解明を行うことである。

## 3. 研究の方法

(1) 実験的歯の移動モデルを用いた歯根膜における間葉系幹細胞の局在と Scx, TGF- $\beta$ 1, Smad3 発現の解析

麻酔下においてマウスを固定し、第一および第二臼歯の間にエラスティックを挿入し、第一臼歯に対して近心方向のメカニカルストレスを負荷した。実験的歯の移動後、凍結非脱灰切片を製作して、Scx, TGF- $\beta$ 1, Smad3 の発現を蛍光免疫染色により解析した。

(2) ヒト歯根細胞への牽引力負荷

ヒトの抜去歯から歯根膜組織を採取して、10% FBS 含有  $\alpha$ -MEM を用いてアウトグロース法に従い培養を行う。Sub-confluent に達したらトリプシンを用いて継代し、0.05 mg/ml fibronectin を用いてコーティング処理したストレッチチャンバーに細胞を播種した。牽引力負荷後の 3、6 時間に細胞を回収し、western blot と real time PCR による解析のサンプルとした。細胞内シグナリング分子と Scx 発現の関連を解明するために TGF- $\beta$ 1 シグナリングの inhibitor 実験を行った。

(3) Scx による歯根膜細胞の骨芽細胞分化制御の解析

Scx が歯根膜細胞の骨芽細胞分化の制御に関わるかを解析するために、牽引力負荷下にて Scx のノックダウンを行い、骨芽細胞分化マーカー発現への影響を real time PCR 法により解析した。また Scx 下流因子の候補として ephrin A2 (EFNA2) に着目し、Scx のノックダウンののち、EFNA2 の発現を解析した。さらに、EFNA2 ノックダウンの後、骨芽細胞分化マーカー発現を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 牽引力に対する PDL の反応における Scx 発現細胞の増加

マウスを用いて実験的歯の移動を行い、PDL における Scx の発現を解析した。機械的刺激負荷後、上顎第一臼歯と第二臼歯間距離が経時的に増加した。HE 染色による組織学的解析の結果、牽引側の PDL の幅が広がり、PDL 細胞の伸展が認められた。一方、圧迫側では PDL の幅が狭くなり、PDL 細胞が圧縮された形を呈した。次に牽引側および圧迫側の PDL における Scx 発現を解析した。牽引側では、Scx を発現する PDL 細胞が 3、6 時間において対照群と比較して有意に増加した。一方、圧迫側では Scx を発現する PDL 細胞は経時的に減少し、6 時間で有意に減少を示した。

(2) 牽引力が負荷された PDL における TGF- $\beta$  シグナリングの活性化

TGF- $\beta$ 1 およびリン酸化 Smad3 (p-Smad3) の発現をマウス実験的歯の移動における牽引側および圧迫側 PDL で解析した結果、牽引側の PDL では、0 時間および 1 時間と比較して 3 時間および 6 時間で TGF- $\beta$ 1 が多く検出された。一方、圧迫側の PDL では機械的刺激負荷後 6 時間における TGF- $\beta$ 1 の発現に著しい変化はなかった。牽引側の p-Smad3 を発現する PDL 細胞数は、3、6 時間において対照群と比較して有意に増加した。一方、圧迫側における p-Smad3 を発現する PDL 細胞数は、顕著な変化を示さなかった。

(3) 牽引力が負荷された PDL 細胞における TGF- $\beta$  シグナリングの Scx の発現への影響

PDL 細胞における牽引力による Scx の発現亢進への TGF- $\beta$ 1 シグナリングの影響を、in vitro において解析した。PDL 細胞における Scx 発現は、牽引力を負荷して 3 時間および 6 時間で上昇した。TGF- $\beta$ 1 の発現もまた、3 時間および 6 時間で上昇した。さらに、牽引力を負荷して 3 時間後に、TGF- $\beta$  type I receptor 阻害剤である SB-431542 により、p-Smad3 発現の抑制が認められた。また PDL 細胞への牽引力負荷により亢進した Scx の発現は、SB-431542 により抑制された。さらに Smad3 特異的阻害剤である SIS3 を用いて同様の解析を行った。PDL 細胞への牽引力による Smad3 のリン酸化の亢進は、SIS3 により低下した。SIS3 は、牽引力により上昇した PDL 細胞における Scx の発現を抑制した。

#### (4) 牽引力が促す PDL 細胞の骨芽細胞分化に対する Scx の影響

牽引力に応答した PDL 細胞の骨芽細胞分化における Scx の役割を解析するために Scx のノックダウンを行った結果、牽引力による PDL 細胞の Scx 発現の上昇は抑制された。牽引力が負荷された PDL 細胞における骨芽細胞分化マーカーである ALP の発現レベルは、牽引力負荷 3 時間後に有意に上昇し、骨芽細胞分化が亢進したことを示した。Scx をノックダウンした PDL 細胞に牽引力を負荷すると、牽引力による ALP 発現上昇のさらなる有意な亢進が認められた。EFN は、骨代謝に関わる因子である。EFN のなかで EFNA2 は、骨芽細胞分化を抑制的に制御する。牽引力負荷 3 時間後、PDL 細胞における EFNA2 の発現は、有意に上昇した。一方、Scx ノックダウンした PDL 細胞では、牽引力による EFNA2 の発現上昇が有意に抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野郁子、竹下信郎、関大輔、大柳俊仁、吉田倫子、木村晴地、川津正慶、山本照子
2. 発表標題 Odz3はRhoA、アクチン制御を介した遊走促進および分化の促進により、ATDC5の軟骨細胞分化を調整する
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川津正慶、竹下信郎、吉田倫子、木村晴地、清流正弘、滝本晶、宿南知佐、山本照子
2. 発表標題 牽引力負荷された歯根膜の初期反応におけるscleraxisの発現機序と機能の解析
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会学術大会
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