

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09581

研究課題名(和文) 多色細胞系譜追跡法を用いた歯肉接合上皮幹細胞の探索

研究課題名(英文) Exploration of the junctional epithelial stem cell by multicolor lineage tracing

研究代表者

山本 松男 (Yamamoto, Matsuo)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50332896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯に上皮が接着する部位は接合上皮と呼ばれる。発生学的に歯原性上皮で、歯の萌出後は口腔粘膜上皮由来の細胞によって置換・維持されるとされるが、接合上皮組織を維持するメカニズムの詳細は不明な点が多い。接合上皮部創傷治癒における口腔由来細胞の動態、接合上皮幹細胞の同定とその支配する領域の探索を行った。創傷治癒においては口腔上皮由来の細胞が創傷部に異動して接合上皮様細胞となり治癒に貢献することが判明した。常態における組織維持については、幹細胞に固有の蛍光タンパク質を発色させ、経時的にその子孫細胞を観察する方法の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の8割が罹患しているといわれる歯周病は歯の喪失の原因だけではなく、その慢性炎症は、糖尿病や非アルコール性肝炎、がん、アルツハイマー病など様々な疾患に悪影響を与えられている。歯周病は、口腔内細菌が歯の生えぎわから上皮付着を破壊することから始まるが、この防御にはエナメル質への接合上皮の付着が重要である。しかし、接合上皮が維持される仕組みについては不明な点が多く残されている。接合上皮が損傷を受けた場合の修復や、常態での接合上皮組織の維持機構について詳細なメカニズムが明らかになれば、歯周病の予防や治癒促進、再生、老化に対する対応の基盤となり、学術的および社会的な意義は大変大きい。

研究成果の概要(英文)：The junctional epithelium adheres to the enamel surface tightly and prevents the pathogens physically and immunologically. It is widely accepted that the JE derived from odontogenic epithelium, and that it is replaced and maintained by cells derived from the oral mucosal epithelium after tooth eruption. However, the details of the mechanism for maintaining the JE tissue are unclear. We investigated the dynamics of oral-derived cells in wound healing of the JE, and the identification of junctional epithelial stem cells and its clonal region. In wound healing model, it was found that cells derived from the oral epithelium migrate to the wound and become junctional epithelial-like cells, which contribute to healing. For observation the mechanism of normal JE tissue maintenance, we established a multi-colored fluorescent mouse for tracing cellular lineage by stem cells and their progeny cells expressing individually unique fluorescent color.

研究分野：保存治療系歯学関連、歯周病学

キーワード：歯周病 創傷治癒 接合上皮 幹細胞 多色細胞系譜追跡

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は 20 歳代より増え始め、中高年以降では歯周ポケットが 6 mm 以上の歯が増え、喪失歯も増加する(平成 28 年度歯科疾患実態調査)。歯周病は、歯を失う大きな原因の一つだが、細菌や菌体成分の体内への侵入や炎症関連物質の持続的な供給源でもあり、糖尿病等全身疾患への強いリスク因子として関心を集め、超高齢社会での解決すべき大きな課題である。

歯の生えぎわ(歯肉溝)に口腔常在菌が慢性的に付着することで炎症が生じ、歯肉炎の状態を経て、歯肉結合組織や歯槽骨の炎症性破壊を伴う歯周炎へと進行する。微生物侵入防御は、歯の表面に歯肉が接合上皮を介して付着し、外来物質の透過侵入に対する物理的な防御と自然免疫による防御がなされている。接合上皮は非角化で、血漿由来の抗菌物質や抗体、好中球などが組織内部から口腔内部へ通過していく性質があり、異物侵入防御の中心的役割をなすと考えられている。

接合上皮は、エナメル質をつくったエナメル上皮が歯萌出時に口腔粘膜上皮と癒合し、歯頸部で歯を取り囲むように残った歯原性上皮細胞である。接合上皮は未分化マーカーの一つサイトケラチン(Ck)19 を発現し、ラミニン(Ln)5 の豊富な歯面(内側基板)に付着する。常在菌により健康歯肉でも常に軽微な炎症状態にあり、細胞のターンオーバーはマウスで 4-6 日程である (Schroeder et al. 1997)。直接歯面に付着する細胞を directly attached to the tooth (DAT)細胞と呼ばれ、歯面に沿いながら分裂し口腔内へ脱落していく。歯肉を切除しても歯周組織が復元することから、接合上皮細胞は周囲の口腔上皮から供給されると考えられているが、詳細なメカニズムは不明な点が多い。

我々は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を全細胞で発現する GFP マウスの歯胚から歯原性上皮細胞塊を採取し、同種野生型マウス歯胚の間葉系細胞塊とあわせて歯胚を再構成した(人工再構成歯胚作成)。これを成獣マウスの上顎抜歯窩に移植すると、歯原性上皮系の組織が GFP によりマーキングされた歯が萌出し、「萌出後の接合上皮は全て歯原性上皮」であることが観察された。しかし、接合上皮の組織維持という点では、口腔粘膜由来の細胞により置換されることが成書等に記載されているものの、歯原性上皮細胞が口腔粘膜上皮に置き換わる時期、創傷治癒の過程での口腔上皮細胞の動態、常態における接合上皮組織の維持のメカニズムなどについて不明な点が多く残っている。

接合上皮が損傷を受けた場合の修復や、常態での接合上皮組織の維持機構について詳細なメカニズムが明らかになれば、歯周病の予防や治癒促進、再生、老化に対する対応の基盤となり、歯周病学の核心をなす学問的問いである。

### 2. 研究の目的

異物の侵入を防ぐ防御の最前線を司る接合上皮が損傷を受けた場合の修復や、常態での接合上皮組織の維持機構、それらに寄与する細胞の動態を探索するのが目的である。具体的には、(1)歯原性上皮由来接合上皮の口腔粘膜由来細胞による置換メカニズムの解析、(2) 接合上皮幹細胞の存在の確認、一幹細胞に由来する領域探索(細胞系譜の追跡)、(3) 加齢(週齢)による幹細胞数の変化の解析(領域の経時的な解析)を行うことである。

### 3. 研究の方法

#### ●GFP マウス歯胚の、同種 TOMATO マウス(赤色蛍光タンパク質発現マウス)への移植

全身に tdTomato を発現する C57BL/6-K1 (ROSA-mTmG) マウスで、3 週齢の時点で上顎第 1 臼歯抜歯を実施し、その後 3 週間治癒を待つ。そして、胎生 14 日齢 C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) マウスより採取した GFP 陽性歯胚を器官培養(37°C, 4 日)し、tdTOMATO マウス上顎第一臼歯抜歯部位に作成した直径 1.0mm の欠損に移植した。どの個体も、ほぼ 50 日後に GFP 陽性移植歯が萌出した。歯胚移植の時点をも 0 日とし、80, 110, 140, 200 日に屠殺し、組織学的観察を行った。

#### ●口蓋側歯肉切除

C57BL/6-KI (ROSA-mTmG) マウスの代わりに、同種齢 C57BL/6(野性型) マウスの上顎に上顎第一臼歯抜歯部位に作成した直径 1.0mm の欠損を作成し、同様に胎生 14 日齢 C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) マウスより採取した GFP 陽性歯胚を移植した。どの個体も、ほぼ 50 日後に GFP 陽性移植歯が萌出した。萌出後 14 日後に周囲の歯肉を口蓋側(半周)もしくは全周切除し創傷治癒モデルとした。治癒前後および口腔粘膜の採取した組織片からは全 RNA を抽出し、RNA シークエンシング解析を行い、発現遺伝子の検索を行った。

●免疫組織化学的染色

各組織は 4%パラホルムアルデヒドによる固定の後 10%EDTA で脱灰し、OCT コンパウンド(SAKURA 社)に包埋後 5μm の薄切切片を作成した。HE 染色、インテグリンβ4、ラミニン5、に対する免疫染色を行った。

●遺伝子発現解析

RT-PCR により、Odam、Icam-1、S100a8、S100a9、GAPDH の発現を解析した。

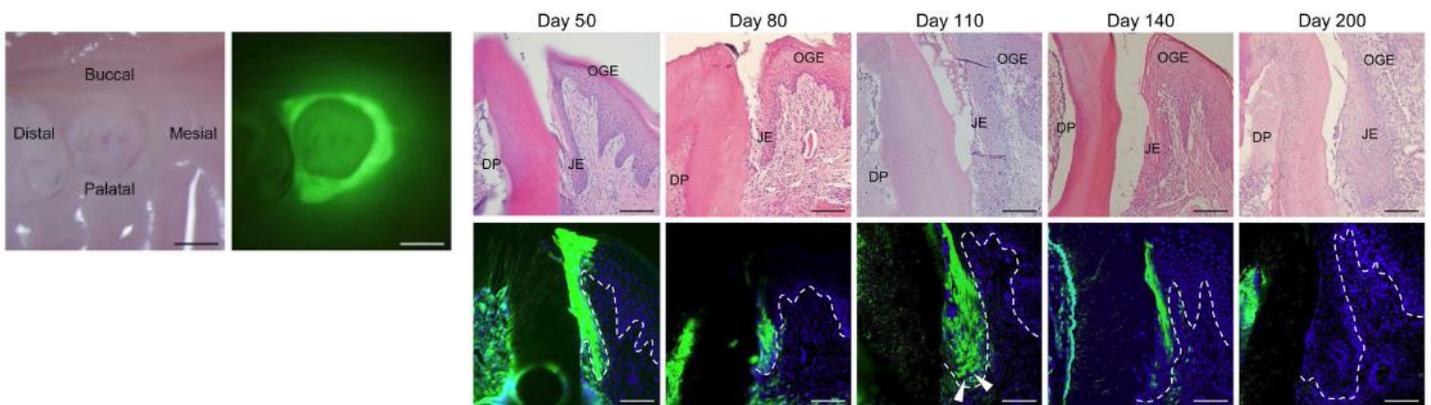
●多色細胞系譜追跡法

タモキシフェン誘導性 Cre-loxp システムを応用し、Rosa26<sup>Cr</sup> と Rosa26<sup>Rainbow</sup> を掛け合わせ Rosa26<sup>Cre/rbw</sup> マウスを作成した。発色はタモキシフェンを腹腔内注射することにより誘導する。

4. 研究成果

○GFP 陽性移植歯の接合上皮は歯原性上皮であった

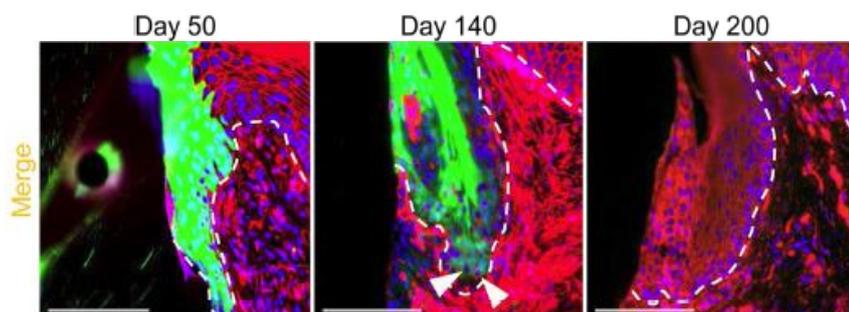
図に示すように萌出直後の移植歯胚に由来する歯の周囲では GFP 陽性接合上皮が確認された。経時的な変化を確認したところ萌出後 140 日程度で接合上皮における GFP 陽性細胞は減少し 200 日の時点では確認が出来なかった。



Kato M, Yamamoto M, *et al.* Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy.Sci Rep. 2019 May 21;9(1):7640. doi: 10.1038/s41598-019-44065-x. Fig.1 から抜粋

○歯原性上皮由来接合上皮は、口腔粘膜由来細胞により置換される

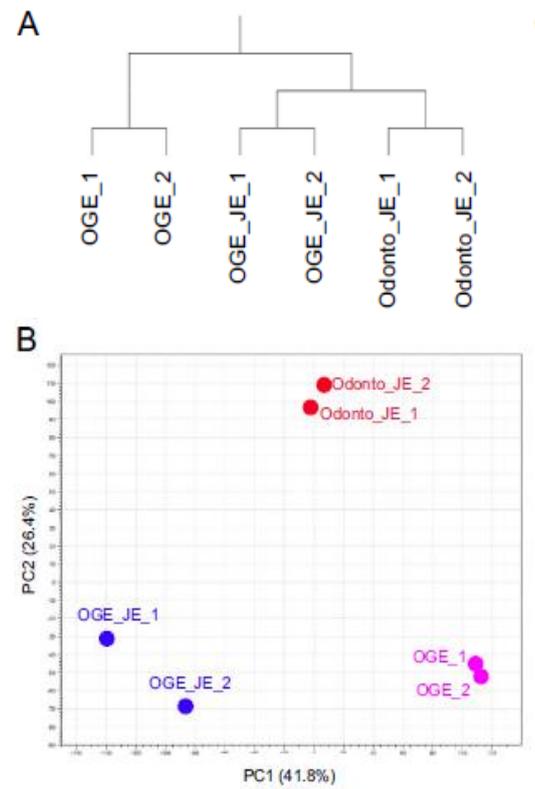
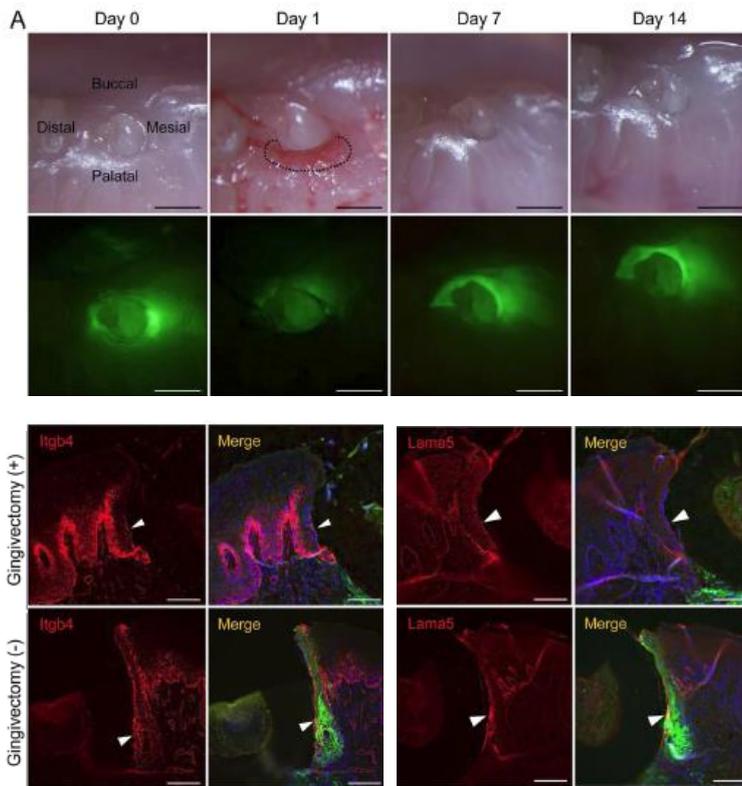
GFP マウス歯胚の、同種 TOMATO マウス(赤色蛍光タンパク質発現マウス)への移植を行ったところ、萌出後 140 日の時点で接合上皮と結合上皮の境界をなす基底部分(外側基板)から口腔粘膜由来と思われる赤色蛍光タンパク質を発現した細胞が接合上皮内に侵入していること、さらに 200 日では接合上皮全体が赤色蛍光タンパク質を発現する細胞によって占められていることが確認された。



Kato M, Yamamoto M *et al.* Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy.Sci Rep. 2019 May 21;9(1):7640. doi: 10.1038/s41598-019-44065-x. Fig.3 から抜粋

○創傷治癒モデルでは口腔上皮によって修復されるが、正常な組織像を示していた

歯肉切除した部位の観察により、14 日後の修復後の組織において、HE 染色像および  $\beta$  インテグリン、ラミニン 5 の染色像から、正常組織に極めて類似した組織による治癒が確認された（下左図）。



Kato M, Yamamoto M, *et al.* Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy. *Sci Rep.* 2019 May 21;9(1):7640. doi: 10.1038/s41598-019-44065-x. Fig.4 から（左図）、Fig.5 から（右図）

○修復された部位の細胞における遺伝子発現は、切除前接合上皮とも、口腔粘膜上皮とも異なっていた

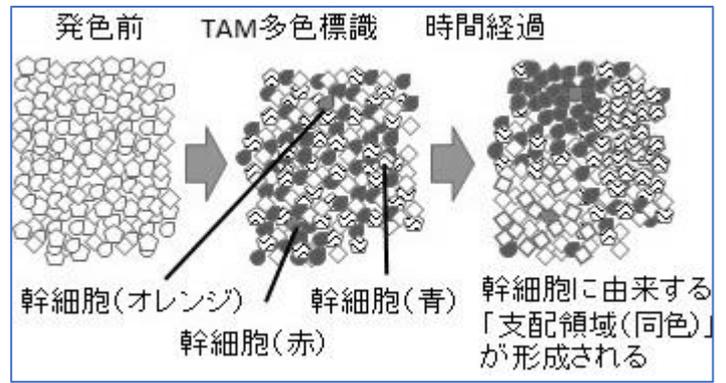
切除前の細胞集団を Odont\_JE、周囲の口腔粘膜組織の細胞集団を OGE、創傷治癒後の接合上皮の細胞集団を OGE\_JE と名付けた。それぞれの組織塊から全 RNA を採取して発現遺伝子の網羅的解析を行い、主成分解析を行ったところ、創傷治癒の起こった治癒後の接合上皮を構成する細胞では、接合上皮に共通の遺伝子の発現上昇が確認されたが、オリジナルの接合上皮細胞の遺伝子発現パターンとは異なり、そして口腔粘膜上皮のそれとも異なっていた（上右図）。

以上のことから、接合上皮の由来は歯原性上皮であることが明らかであるが、少なくとも本方法によって可視化した接合上皮は萌出後 4 ヶ月以上経過すると口腔粘膜由来と思われる細胞によって置換される可能性が示唆され、また創傷治癒においてはより短時間で口腔粘膜を代表とする周囲の上皮系細胞による修復が成立する可能性が示唆された。しかし、修復される部位の構造は受傷前の組織構造に極めて類似しているものの、その細胞集団はオリジナルの接合上皮細胞のものとも、周囲の口腔粘膜上皮のものとも異なるのであった。接合上皮に特徴的な遺伝子 (Odam, S100a8, S100a9, Icam1) の発現が上昇しており、周囲の口腔粘膜由来の細胞が環境に応じて遺伝子発現を変化させ創傷治癒後の接合上皮細胞に分化しているのかもしれない。

○接合上皮幹細胞の存在の確認、一幹細胞に由来する領域探索（細胞系譜の追跡）

移植した歯胚から萌出した歯の接合上皮では時間の経過とともにレシピエント（宿主）の細胞により置換されていくことが示唆されたが、そもそも生来の組織維持のメカニズムについては、特に細胞供給についてはほとんど明らかになっていない。つまり接合上皮幹細胞が存在するのかどうかを探索することが、組織維持のメ

カニズムの根幹的関心事である。しかし、接合上皮幹細胞は推定上存在すると考えられているものの、特異的マーカーは知られておらず、その存在を示す方法の確立が求められた。BrdU/EdU パルス法では投与時点で分裂する全ての細胞に取り込まれ、自己複製する幹細胞を見分けることができない。そこで、舌や毛根等の幹細胞解析で開発された多色細胞系譜追跡法（タモキシフェン誘導型多色キメラマウス（ $Rosa26^{CreERT}/rbw/+$ ）を作出）により、自己複製が多細胞分裂を維持する事による幹細胞が支配する組織領域を視覚化することとした。支配領域の視覚化の図を右に示す。

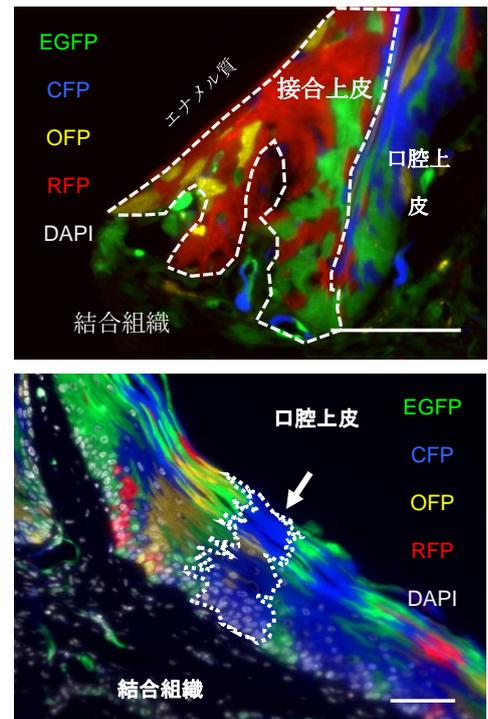


これにより、幹細胞によって組織を構成する細胞が供給される領域では幹細胞と同色になるので、間接的に幹細胞の存在を示す根拠となる。

タモキシフェン誘導性 Cre-loxp システムを応用し、 $Rosa26^{Cre}$  と  $Rosa26^{Rainbow}$  を掛け合わせた  $Rosa26^{Cre/rbw}$  マウスの繁殖に成功した。

任意のタイミングでタモキシフェンを投与することで、個々の接合上皮細胞および口腔粘膜上皮細胞に赤、青、緑、黄のいずれかの蛍光タンパクをランダムに一色だけ発現させることに成功した。

しかし、遺伝子組換えが起こらずに GFP（緑色）を発現する細胞が一定数あり、組換え効率について検討を要することが判明した。歯の発生・萌出の次期とタモキシフェン投与のタイミングについて詳細な検討が必要であることが判明した。細胞系譜の解析を行う基盤的技術が確立された。しかし、接合上皮を構成する細胞の細胞系譜を追跡するためには、発色および観察の期間（タイムスケジュールの検討）等の条件決定が必要である。接合上皮幹細胞の存在の確認、一幹細胞に由来する領域探索（細胞系譜の追跡）、加齢（週齢）による幹細胞数の変化の解析（領域の経時的な解析）のためには、さらなる解析が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato M, Tanaka J, Aizawa R, Yajima-Himuro S, Seki T, Tanaka K, Yamada A, Ogawa M, Kamijo R, Tsuji T, Mishima K, Yamamoto M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 7640-7650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44065-x.	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mayu Kato, Ryo Aizawa, Junichi Tanaka, Sara Yajima-Himuro, Tatsuaki Seki, Keisuke Tanaka, Kenji Mishima, Matsuo Yamamoto
2. 発表標題 Replacement of junctional epithelium by oral epithelium
3. 学会等名 2018 annual meeting of American Academy of Periodontology AAP-JACP-JSP（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka K, Tanaka J, Aizawa R, Kato-Tanaka M, Ueno H, Mishima K, Yamamoto M
2. 発表標題 Investigation of junctional epithelial stem/progenitor cells using the multicolor lineage tracing method.
3. 学会等名 第106回アメリカ歯周病学会共催日本歯周病学会・日本臨床歯周病学会2020年大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本松男
2. 発表標題 接合上皮の発生と恒常性維持
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会(第152回) シンポジウム3 歯周組織の恒常性維持機構を再考する 神戸, 神戸国際展示場（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤麻友、田中準一、相澤 怜、水室沙羅、関 辰明、田中慧介、山田 篤、上條竜太郎、美島健二、山本松男
2. 発表標題 口腔歯肉上皮由来細胞による接合上皮細胞置換の可視化
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中慧介、相澤 怜、田中準一、澤田直子、関 辰明、田中麻友、相内敏弘、板部洋之、美島健二、山本松男
2. 発表標題 ハイドロキシアパタイト上での培養が不死化接合上皮細胞および口腔上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中慧介、田中準一、相澤 怜、吉田真子、松浦 徹、藤田恭平、田中麻友、上野博夫、美島健二、山本松男
2. 発表標題 多色細胞系譜追跡法を用いた歯肉接合上皮細胞のクローナリティ解析
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020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 分担者	田中 準一  (Tanaka Junichi)  (40710166)	昭和大学・歯学部・講師   (32622)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	美島 健二  (Mishima Kenji)  (50275343)	昭和大学・歯学部・教授    (32622)	
研究分担者	相澤 怜  (Aizawa Ryo)  (80710673)	昭和大学・歯学部・助教    (32622)	

	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	加藤（田中） 麻友  (Kato-Tanaka Mayu)		
研究協力者	田中 慧介  (Tanaka Keisuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関