

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年11月5日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890077

研究課題名（和文） 歯周組織に存在する幹細胞とその幹細胞ニッチの同定

研究課題名（英文） Identification of periodontal stem cells and their stem cell niche

研究代表者

小野 法明（ONO NORIAKI）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20451908

研究成果の概要：

歯を支える周りの組織（歯周組織）は外部からの刺激に対して適応する能力に優れ、高い再生能力を有する。本研究においては、硬組織の新鮮切片を用いた蛍光抗体による多重染色を行い、歯周組織において「上皮系細胞」と「血管内皮細胞」が特殊な鞘状の構造を形成し、その周囲に未熟な細胞の集団が存在することを同定した。この未熟な細胞の集団は組織の恒常性の維持と再生能に関与していることが示唆される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学／矯正・小児系歯学

キーワード：(1) 歯周組織 (2) 幹細胞 (3) 幹細胞ニッチ (4) 外胚葉性間葉 (5) 血管内皮 (6) 血管周皮 (7) 血管形成 (8) 微小血管

1. 研究開始当初の背景

歯周組織は高い再生能力を有しており、これまでの研究より組織特異的な幹細胞が存在することが示唆されている。この組織特異的な幹細胞は分化した細胞や細胞外基質タンパクにより構成される複雑な微小環境（幹細胞ニッチ）に維持されると考えられ、様々なシグナルがこの微小環境を介し幹細胞を制御し組織の恒常性の維持と再生に関与している。近年、造血系幹細胞においてはその制御機構が明らかにされている一方、歯周組織に存在すると考えられる間葉系幹細胞における制御機構はこれまで明らかされていない。

2. 研究の目的

(1) 歯周組織に存在する幹細胞の *in vivo* における局在とその微小環境（幹細胞ニッチ）を同定する。

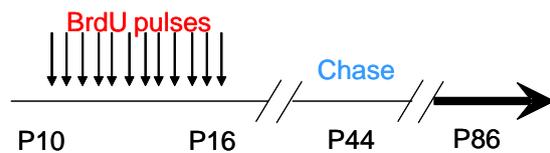
(2) 歯周組織に存在する幹細胞の *in vivo* における表現型と動態を明らかとし、幹細胞ニッチを介した分子制御機構を解明する。

3. 研究の方法

BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridine) による *in vivo* における標識法 (pulse / chase 法) を用い、歯周組織に存在する組織特異的な幹細胞およびその幹細胞ニッチを同定する。さらにこの幹細胞の *in vivo* における表現型と動態を解析する。

1) 歯周組織における BrdU ラベル保持細胞 (BrdU-LRC) の局在の同定

組織特異的な幹細胞を BrdU による pulse / chase 法を用いて標識し局在を同定する。組織発生過程において対称分裂が盛んな時期に BrdU を頻回投与し、その後テンプレート DNA が幹細胞特異的に保存される性質を利用して成体において保持される幹細胞を標識する。観察部位はマウス上顎臼歯部とする。



第一臼歯の根形成開始期である生後 10 日 (P10) から 1 日 2 回 6 日間 BrdU を投与し (pulse)、4 週間あるいは 10 週間後 (chase) に屠殺する。

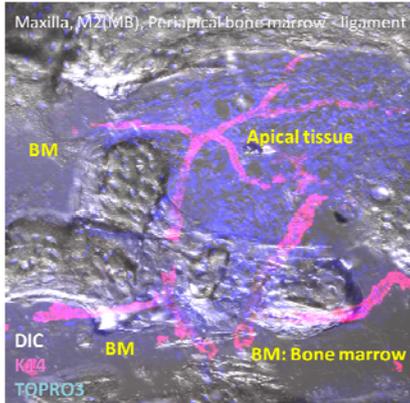
2) 硬組織未固定新鮮凍結切片を用いた多重蛍光染色法および共焦点レーザー顕微鏡による観察

免疫組織化学は硬組織未固定新鮮凍結切片を用いて行う。タングステン・ナイフを用い第一臼歯歯根部の水平断切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた多重蛍光染色法による単一細胞レベルでの観察を行う。BrdU ラベル保持細胞 (BrdU-LRC) を検索し、血管内皮細胞マーカー (CD31)、幹細胞抗原 (Sca-1)、上皮細胞マーカー (K14) などのマーカーとの多重染色を行う。

4. 研究成果

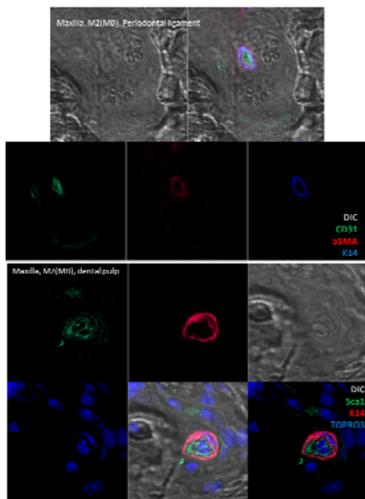
1) 歯周組織において骨髓腔から歯根膜へ伸展する K-14 陽性上皮系細胞集団が構成する鞘状構造が認められ、そのネットワークは特に根尖部において顕著に観察された。この鞘状構造は歯髓腔内にも認められ、根尖孔部において歯根膜から歯髓腔内にその構造が進展する像が認められた。

(図 1)



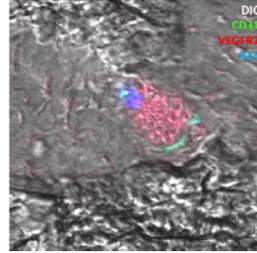
2) K-14 陽性上皮系細胞は周皮細胞マーカーである α SMA (alpha-Smooth Muscle Actin) を共発現し、その鞘状構造の内部には幹細胞抗原 Sca-1 を共発現する CD31 陽性血管内皮細胞が存在した。

(図 2)



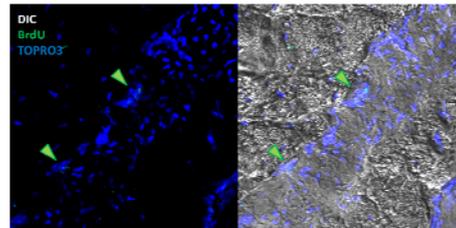
3) 歯根膜および歯髓において線維芽細胞とは著明に異なる Flk-1 陽性の球状の細胞塊が存在し、上皮系細胞が形成する鞘状構造はその一部を構成していた。

(図 3)



4) BrdU ラベル保持細胞は歯根膜の歯槽骨近傍の細胞塊中に局在することが認められた。

(図 4)



以上の所見より歯髓および歯周組織において、上皮系マーカーを共発現する周皮細胞が形成する鞘状構造の周囲に幹細胞の性質を有する細胞集団が存在することが示唆され、組織恒常性の維持に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2件)

① Noriaki Ono, Kazuhisa Nakashima, Susan R. Rittling, Ernestina Schipani, Tadayoshi Hayata, Yoichi Ezura, Kunimichi Soma, David T. Denhardt, Henry M. Kronenberg and Masaki Noda

Osteopontin Negatively Regulates Parathyroid Hormone Receptor Signaling in Osteoblasts

The Journal of Biological Chemistry vol. 283(28), pp. 19400-9., 2008 (査読有)

② Noriaki Ono, Kazuhisa Nakashima, Ernestina Schipani, Tadayoshi Hayata, Yoichi Ezura, Kunimichi Soma, Henry M. Kronenberg and Masaki Noda

Constitutively Active Parathyroid Hormone Receptor Signaling in Cells in Osteoblastic Lineage Suppresses Mechanical Unloading-induced Bone Resorption

The Journal of Biological Chemistry vol. 282(35), pp. 25509-16., 2007 (査読有)

[学会発表] (計 2件)

① Ono N, Nakashima K, Schipani E, Hayata T, Ezura Y, Soma K, Kronenberg HM, Noda M

Osteoblast-specific constitutive activation of PTH/PTHrP receptor enhances marrow-ablation-induced osteoprogenitor activities.

International Association for Dental Research, 86th General Session & Exhibition, July 2008

② Ono N

Modulation of parathyroid hormone receptor signaling by microenvironment: Its role in bone metabolism and its implication for orthodontics.

The 35th Annual International Conference on Craniofacial Research, University of Michigan, February 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 法明 (ONO NORIAKI)

東京医科歯科大学大学院・歯学部附属病院
医員

研究者番号：20451908