

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19131

研究課題名(和文) オッセオインテグレーション獲得におけるPTHrP陽性細胞の役割の解明

研究課題名(英文) The role of PTHrP positive cells for osseointegration

研究代表者

高橋 良 (Akira, Takahashi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：60637924

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)：歯小嚢細胞特異的にTomatoを発現するPTHrP-CreER;R26RTomatoマウスに対してタモキシフェンを歯根形成開始期に投与することで、PTHrP陽性の歯小のう細胞を可視化(PTHrP-P3細胞)する。投与5日後にPTHrP-P3細胞群を回収し細胞培養を行ったところいくつかコロニーを形成することが確認された。シングルコロニーをピックアップし継代培養を行ったところ顕著に増殖能を有するPTHrP-P3細胞群を得ることができた。これらの細胞を各分化培地にて培養したところ自己複製能、脂肪細胞分化能、骨芽細胞分化能、軟骨細胞分化能を有する間葉系幹細胞としての性質を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTHrPを発現する歯小のう細胞は主に歯根膜細胞、骨芽細胞に分化するが、成長後も長期にわたり生体内に存在し、歯周組織の維持に関与している。本研究ではPTHrPにより標識される歯小のう細胞由来の細胞が、一部間葉系細胞としての性質を保持することが明らかとなった。これらの細胞がオッセオインテグレーションの獲得や歯周組織の維持、再生に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、今後当該研究分野においてオッセオインテグレーションの獲得や歯周組織の再生メカニズムの解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：For in vivo lineage-tracing experiments, we have created a new mouse line, PTHrP-creER^t BAC transgenic, and combined this line with Rosa26-tdTomato reporter line. In this system, when tamoxifen is injected at postnatal day 3, stop sequence will be removed by the enzyme cre recombinase. As a result, the PTHrP⁺ cells and their descendants will express red tdTomato fluorescence protein. Therefore, we are able to specifically induce follicle cells to become red at a specific time point and trace how these cells develop overtime. I cultured PTHrP-creER⁺ DF cells at P8 and subsequently isolated PTHrP-creER⁺ colonies and subcloned them individually. Then, we tested their self-renew ability and multipotency by subjecting cells to trilineage differentiation conditions. They had robust potential of self-renew ability and multi-potency. Moreover, all of them differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. So, PTHrP-creER⁺ cells have self-renew ability and multi-potency.

研究分野：生体歯科材料

キーワード：副甲状腺関連蛋白 オッセオインテグレーション

1. 研究開始当初の背景

チタンインプラント体は埋入後、周囲骨と直接結合するオッセオインテグレーションという現象を生じる。インプラント治療は技術面において大きく進歩している一方で、オッセオインテグレーションのメカニズムはほとんど分かっておらず未だ解明されていない。これまでにインプラント体と骨との間に介在する細胞がオステオカルシンやオステオポンチンなどの骨蛋白を発現していることが報告されている (Ayukawa et al) が、オッセオインテグレーションにおけるそれらの蛋白の機能については不明である。

歯の発生過程において、歯冠の周囲を取り囲む膜状の歯小囊という組織が歯根膜や骨芽細胞の形成および歯の発生に重要であることが報告されている (Yao S, JDR, 2008)。最近、歯小囊細胞をインプラント体表面にコーティングしたところ、インプラント周囲に歯根膜が形成されることが報告され (Oshima, 2014)、インプラント研究において、歯小囊細胞は非常に注目を集めている。

研究代表者はこれまで、歯小囊細胞特異的な PTHrP-creER マウス (PTHrP;副甲状腺関連蛋白) を用いて、時期特異的に PTHrP 陽性の歯小囊細胞を可視化し、genetic lineage tracing (ある遺伝子を発現する細胞やその子孫細胞を可視化し追跡) により、歯根形成の様々な段階において PTHrP 陽性細胞の分布および性質を解析してきた。

本研究では歯根形成期に PTHrP により標識され、その後分化した歯根膜細胞、骨芽細胞を含む細胞群が、抜歯あるいはインプラント体埋入などの外科的侵襲により周囲組織から分泌される成長因子などにより活性化され、インプラント体表面で増殖・分化し骨芽細胞などに分化することでオッセオインテグレーションの獲得や維持に重要な役割を果たしているのではないかという仮説のもと研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯根形成開始期 (生後 3 日目) の歯小囊細胞 (PTHrP-P3 細胞) を可視化し、抜歯窩および抜歯窩周囲に存在する PTHrP-P3 細胞由来の細胞群がオッセオインテグレーション獲得および維持に重要であるとの仮説のもと、その役割を解明することである。

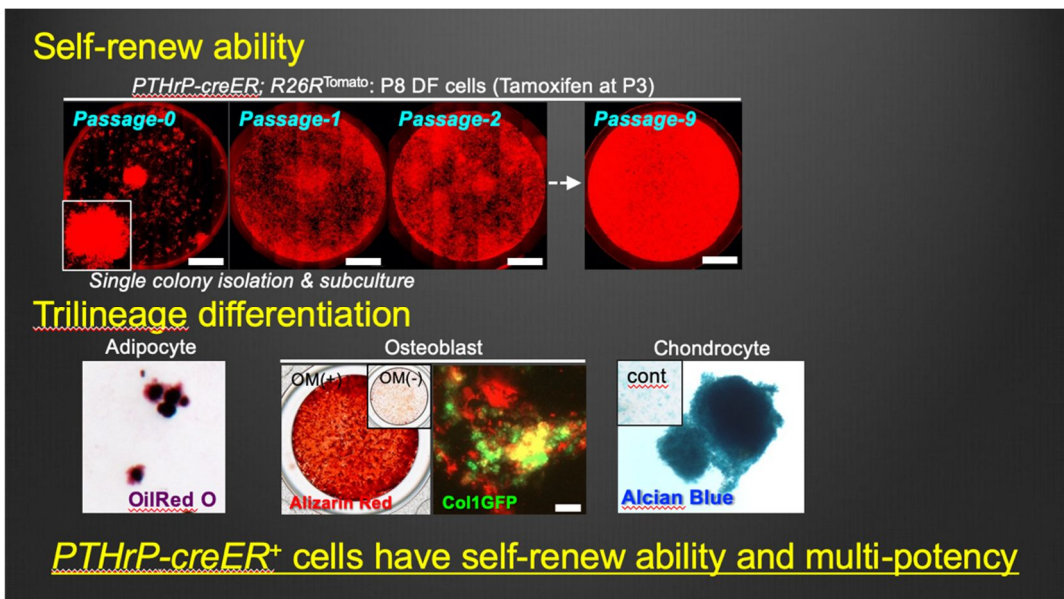
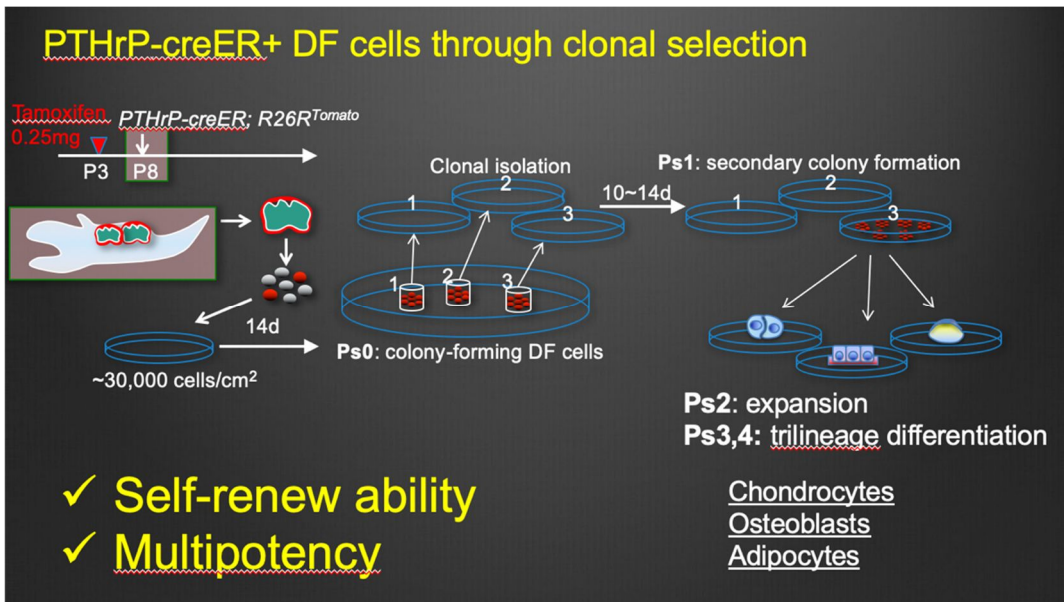
3. 研究の方法

PTHrP-CreER マウスと *Rosa26-loxP-stop-loxP-tdTomato* (*R26R-tdTomato*) マウスと交配させることにより得られた PTHrP-CreER;R26R^{Tomato} マウスに対してタモキシフェン (エストロゲン類似体; タモキシフェンを投与することで組み換え酵素 Cre が核内に移行し遺伝子組み換えを起こす) を歯根形成開始期 (生後 3 日目) に投与することで、PTHrP 陽性の歯小囊細胞を可視化 (PTHrP-P3 細胞) する。生後 8 日目にマウスを屠殺し歯胚および歯小囊細胞周囲組織を下顎骨より摘出し、リベラーゼ酵素処理により組織分離することで PTHrP-P3 細胞を含む細胞群を回収する。PTHrP-P3 細胞の自己複製能、多分化能を調べるため培養実験を行う。

4. 研究成果

PTHrP-P3 細胞を含む細胞群をディッシュ上に播種し細胞培養を行ったところ培養 14 日以降より Tomato 蛍光蛋白を発現する PTHrP-P3 細胞がいくつかコロニーを形成していることが確認された。シングルコロニーをピックアップしコロニーごとに継代培養を行ったところその中から顕著に増殖能を有する PTHrP-P3 細胞群を得ることができた。数回継代培養を行った後にこれらの細胞の分化能を調べるため脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞を分化させるための分化培地にて培養したところ各細胞への分化能を有することが確認できた。これらの実験結果より PTHrP-P3 細胞は自己複製能、脂肪細胞分化能、骨芽細胞分化能、軟骨細胞分化能を有する間葉系幹細胞としての性質を有するこ

とが明らかとなった。



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 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tokavanich Nicha, Gupta Aditi, Nagata Mizuki, Takahashi Akira, Matsushita Yuki, Yatabe Marilia, Ruellas Antonio, Cevidanes Lucia, Maki Koutaro, Yamaguchi Tetsutaro, Ono Noriaki, Ono Wanida | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 A three dimensional analysis of primary failure of eruption in humans and mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Oral Diseases | 6. 最初と最後の頁 391 ~ 400 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13249 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋良 |
| 2. 発表標題 歯の萌出および歯根形成における副甲状腺ホルモン受容体シグナルの役割 |
| 3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第128回学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akira Takahashi |
| 2. 発表標題 Autocrine regulation of mesenchymal progenitor cell fates orchestrates tooth eruption |
| 3. 学会等名 KOB (Kyudai Oral Biosciences)・OBT 合同国際シンポジウム (国際学会) |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|