

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（c）

研究期間：2009 年 ～ 2011 年

課題番号：21592322

研究課題名（和文）新たに同定したセメント芽細胞特異マーカーを用いたセメント質形成過程

研究課題名（英文）Morphological analysis of cementogenesis using a newly identified cementoblast specific marker

研究代表者

河野 芳朗 (KAWANO YOSHIRO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60303129

研究成果の概要（和文）：

セメント質形成における、アクアポリンの発現解析により、有根歯のセメント質形成過程では無細胞セメント質形成時に歯根表面出現する細胞がアクアポリンを発現し、形態学および免疫組織化学的所見からこれがセメント芽細胞であることを明らかにした。また、固有歯槽骨の発生では、アクアポリンは歯根膜-歯槽骨境界面の線維芽細胞様細胞に発現していた。これらの細胞はセメント芽細胞とは異なる形態を示し、翼状の細胞突起を発達させていた。これらの所見からアクアポリンは歯周組織の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated the expression of aquaporin during cementogenesis. Cells on the developing root surface expressed aquaporin in rat molars during acellular cementogenesis. We immuno-histochemically identified these cells as cementoblasts. The expression of aquaporin was observed on the cells on the interface between periodontal ligament and alveolar bone during alveolar bone development. These cells showed the different shapes from cementoblasts and possessed wing-like projections. These results suggest that aquaporin plays an important role during the development of periodontal tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、形態系基礎歯科学

キーワード：歯根形成 アクアポリン セメント質 顕微解剖学 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

系統発生学的にセメント質は歯足骨に由来することから、セメント質と骨は相同性に富んでいるが、骨組織の研究が網羅的にかつ詳細になされるのに対して、セメント質形成、特にセメント芽細胞の動態に関しては未解決の多くの問題が残されてい

る。たとえば、ヘルトビッチの上皮鞘（HERS）は歯根形成の中心的役割を果たし、象牙芽細胞分化を誘導する上皮-間葉相互作用における HERS の関与については広く受け入れられているが、セメント質形成における HERS の役割についてはよく解っていない。さらに、歯周組織再生治療においては、

セメント芽細胞の前駆細胞はどこに由来するのか、また完成した歯根膜ではその前駆細胞はどこに存在するのかについては全く明らかにされていない。どのような因子がセメント芽細胞を誘導するのかといった疑問点を解決することは歯科臨床においても大変重要である。

これらセメント芽細胞に関する多くの問題が他の細胞成分（エナメル芽細胞、象牙芽細胞）と比べて大きく遅れているのは、これまでセメント芽細胞は、骨芽細胞に類似した細胞と考えられ、セメント芽細胞を歯周組織形成細胞、特に骨芽細胞、および歯根膜線維芽細胞と明瞭に分別できるマーカー遺伝子・タンパクが存在しないことが障害となっていた。我々はこれまでのラット切歯の硬組織形成に関連する遺伝子・タンパクのスクリーニング研究の結果、セメント芽細胞に特異的に発現する遺伝子・タンパクとして、水チャンネルの一つであるアクアポリンのサブタイプであるアクアポリン1が歯根表面の細胞群に特異的に発現していることを明らかにした。その後、*in situ* hybridizationによる遺伝子発現、オステオポンチンやアルカリフォスファターゼ活性などの従来から知られるセメント芽細胞のマーカーの免疫二重染色による共発現、カルセインを用いた硬組織生体描記による石灰化能の観察によりセメント芽細胞マーカーとしてのアクアポリン1の有用性を確認した。このアクアポリン1はセメント芽細胞と類似性が指摘されている骨芽細胞には全く発現が見られないが、セメント芽細胞の分化の初期段階から発現が見られるのが特徴で、セメント芽細胞の特異的な細胞マーカーとして利用できることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

セメント質・セメント芽細胞は歯周組織再生のための重要な硬組織であるが、その形成過程には不明な点が多い。本研究ではセメント芽細胞のタンパク・遺伝子レベルのマーカーとしてアクアポリン1を用い、ラット歯牙発生における生理学的状態下での有根歯、無根歯のセメント質形成過程のセメント芽細胞の細胞動態を明らかにし様とするものである。

3. 研究の方法

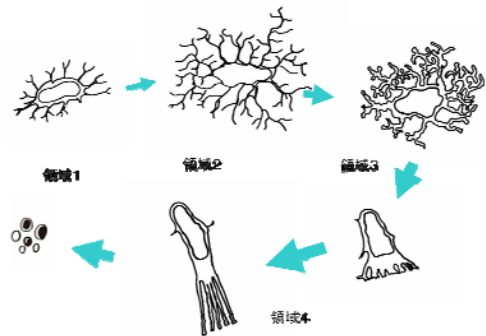
- (1) 常生歯におけるアクアポリン1陽性細胞の動態の解明
 - ① ラット切歯のパラフィン切片を作成し、H-E染色、鍍銀染色、AZAN染、アクアポリン免疫線色を行い、常生歯の無細胞セメント質の形成過程を組織学的に明らかにした。同様に臼歯においても解析した。更に、電子顕微鏡的免疫細胞化学凍結切片に対して、アクアポリン1抗体による免疫染色を行った。一部の試料は免疫染色後、樹脂包埋し、電顕観察を行った。この際、アクアポリン1陽性のセメント芽細胞、束状骨形成細胞の細胞動態とコラーゲン線維の関係について検討した。

- ② 歯槽骨の発生については、歯根膜線維とアクアポリン1陽性細胞との位置的關係および歯槽骨の形成に焦点を当てて観察した。
- (2) 歯周組織細胞マーカーとアクアポリン1陽性細胞の共発現の検討
歯周組織細胞のマーカーであるOPN (osteopontin)、BSP(bone sialoprotein)、OCN (osteocalcin)、TNAP(Tissue-non-specific Alkaline phosphatase)とアクアポリン1の共存関係を二重免疫細胞化学で検討した。

4. 研究成果

- (1) 齧歯類切歯の舌側歯根相当部は無細胞セメント質でおおわれ、その歯周組織は萌出する切歯とともに切縁方向に移動する。切歯付着歯肉部位には持続的に細胞成分や歯根膜線維の流入が起こっているにもかかわらず、萌出した切歯舌側歯根相当部表面には細胞成分や歯根膜線維は見られない。
付着上皮直下でこれらが処理されることが推測されるがその機序については不明な点が多かった。我々は臼歯の歯根発生を詳細に観察しセメント質表面のアクアポリン1陽性細胞が、形態学的、免疫組織学的、発生学的な検討によりセメント芽細胞であることを明らかにした。また、アクアポリン1をセメント芽細胞のマーカーとして持続的にセメント質形成が起こる齧歯類無根歯付着上皮直下でのセメント芽細胞の動態について観察した。

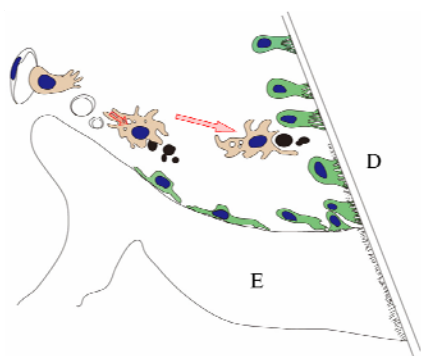
セメント質表面歯根膜細胞の形態変化



付着上皮直下に来たアクアポリン1陽性細胞は付着上皮を越えられずにセメント質表面を離脱して歯肉上皮下へ流れていく象が観察された。また、舌側歯肉上皮直下には多数のアポトーシス像が観察され、それらの中にはアクアポリン1陽性を示す物も見られた。また、下顎切歯の切縁を削合して切歯の萌出速度を変化させた実験群ではアクアポリン1陽性細胞は付着歯肉境界部に到達することなくアポトーシス様変性を起こして消失していく像が観察された。また、付着上皮直下にはED1陽性細胞が多数存在しアクアポリン1陽性細胞を貪食しているような像が観察された。これらのことから、無根歯セメント芽細胞は萌

出直前に生理的条件下および非生理的条件下においてもアポトーシスを起こして消失することが明らかになった。

切歯歯肉境界部でのセメント芽細胞の動態



- (2) 歯根周囲に存在する歯槽骨は、歯根膜が埋入された特殊な骨組織で固有歯槽骨とよばれている。組織像からその形成過程は、Sharpey線維の合成とその石灰化が起こることが予測されるが、どのように形成されているのかについては不明な点が多かった。我々はラット歯根の発生過程を観察することにより、歯根表層歯周組織にアクアポリン1陽性細胞が存在することを確認し、発生学的、および形態学的な検索によりセメント芽細胞であることを明らかにした。歯槽骨の発生過程では、固有歯槽骨の発生時期に一致してアクアポリン1陽性細胞が歯槽骨上に出現し、この細胞は、生体ラベリングおよび、免疫組織化学的検索の結果、硬組織形成能を有し、骨芽細胞分化マーカーを発現していることを確認した。このアクアポリン1陽性細胞は15日齢歯胚周囲の固有歯槽骨形成時期に出現し線維芽細胞様を呈しALP陽性を示していた。18日齢になると歯槽頂部からSharpey線維の形成が見られるようになり、その近傍にはアクアポリン1陽性細胞が観察された。この時期に歯槽骨上には骨芽細胞は観察されなかった。20日齢になると、歯根膜主線維が観察されるようになり、それと同時に骨芽細胞が歯槽骨に埋入される主線維の間に観察されるようになった。また、このアクアポリン1陽性細胞は様々な線維芽細胞マーカーにも陽性を示していた。以上のことより、固有歯槽骨の形成には歯根膜におけるアクアポリン1陽性細胞が歯槽骨に埋入されるSharpey線維を作り、その後骨芽細胞に分化して固有歯槽骨を形成する可能性が示唆された。

セメント質は歯牙-歯根膜を連結する組織である、また固有歯槽骨は支持歯槽骨と歯根膜とを連結する組織である。セメント質形成における、アクアポリン1の発現解析により、有根歯のセメント質の形成過程では無細胞セメント質形成時に歯根表面出現する細胞がアクアポリン1を発現し、形態学および免疫組織化学的所見からこれがセメン

ト芽細胞であることを明らかにした。また、これらの細胞はセメント質に埋入される歯根膜線維の成熟に伴ってその形態を変化させ、無数の細胞突起を発達させることから、歯根膜線維のセメント質の埋入に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、歯根形成後期では有細胞セメント質形成時の有細胞セメント芽細胞に発現が見られた。さらに、これらの細胞での遺伝子発現も確認された。また、固有歯槽骨の発生を解析することにより、アクアポリン1は歯根膜-歯槽骨境界面の線維芽細胞様細胞に発現していた。これらの細胞はセメント芽細胞とは異なる形態を示し、翼状の細胞突起を発達させていた。また、セメント芽細胞と同様に歯根膜線維の発達とともにアクアポリン1発現が上昇することから、これらの細胞は歯根膜線維の歯槽骨への埋入に大きく関与している可能性が示唆された。さらにこれらの細胞は高いアルカリフォスファターゼ活性を示し、その他の骨芽細胞分化マーカーも発現していたことから、歯根膜表層のアクアポリン1陽性細胞は歯槽骨に埋入されたシャープビー線維の石灰化さらに、固有歯槽骨の形成に関与している可能性が示唆された。

セメント芽細胞のアクアポリン1を指標にした解析により、これまで全く解明されていなかったセメント芽細胞に関する知見を飛躍的に拡大することができた。これにより

- ① 常態下ばかりでなく確立された様々な臨床的実験モデルを用いてセメント芽細胞の動態を形態学的に観察することが可能となるので、この研究成果は基礎歯学への貢献ばかりでなく、臨床歯学への還元が期待される。
- ② 臨床的には、実験的に破壊した歯周組織の再生実験、特に再生セメント質の再生歯槽骨と歯根膜線維の研究に役立つ。それによって今後予想される歯周組織再生治療の発展に役立つ基盤的知見をもたらすことができる。

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 6件)

- ① Rahman F, Harada F, Saito I, Suzuki A, Kawano Y, Izumi K, Nozawa-Inoue K, Maeda T: Detection of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in periodontal Ruffini endings of mouse incisors. *Neurosci. Lett.* 査読有り, 488(2): 173-177, 2011.
- ② Miyako H, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Magara J, Kawano Y, Ono K, Maeda T: Phenotypes of articular disc cells in the rat temporomandibular joint as demonstrated by immunohistochemistry for nestin and GFAP. *J. Anat.* 査読有り,

219(4): 472-480, 2011.

- ③ Saito S, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Hoshino M, Saito C, Maeda T: Immunohistochemical detection of nestin in the periodontal Ruffini endings of the rat incisor. *Neurosci. Lett.* 査読有り, 449: 195-200, 2009.
- ④ Iizuka N, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Nandasena BGTL, Okiji T, Maeda T: Differential cell-specific location of Cav-1 and Ca²⁺ ATPase in terminal Schwann cells and mechanoreceptive Ruffini endings in the periodontal ligament of the rat incisor. *J. Anat.* 査読有り, 214(2): 264-274, 2009.

[学会発表] (計 21 件)

- ① Anwar Humayra Binte : Reaction of AQP-1 positive cells in rat periodontal ligament during experimental tooth movement. 平成 23 年度新潟歯学会第 2 回例会, 新潟, 2011. 11. 12, *新潟歯学会雑誌*, 41(2): 128-129, 2011.
- ② Anwar Humayra Binte : 実験的矯正移動にともなうアクアポリン 1 陽性細胞の観察. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岐阜, 2011. 9. 30- 10.2, *歯科基礎医学会雑誌*, 53 (Suppl.): 151, 2011.
- ③ 三富智恵: アルキル化抗腫瘍薬によるラット歯根形成障害に関する組織形態学的解析. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2010. 9. 20-22, *歯科基礎医学会雑誌*, 52 (Suppl.): 151, 2010.
- ④ 河野承子 : 実験的咬合性外傷における歯周組織破壊・改変に伴うアクアポリン 1 発現の変化. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2010. 9. 20-22, *歯科基礎医学会雑誌*, 52 (Suppl.): 148, 2010.
- ⑤ 河野承子 : 実験的外傷歯の歯周組織における AQP1 陽性細胞の動態. 第 48 回日本小児歯科学会大会, 名古屋, 2010. 5. 19-20, *小児歯誌*, 48(2): 338, 2010.
- ⑥ 三富智恵, : 抗腫瘍薬がラット臼歯歯根形成におよぼす影響. 第 48 回日本小児歯科学会大会, 名古屋, 2010. 5. 19-20, *小児歯誌*, 48(2): 246, 2010.
- ⑦ 河野芳朗 : ラット切歯におけるセメント芽細胞の運命. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術大会, 岩手, 2010. 3. 28-30, *解剖学会雑誌*, 85 (Suppl):110, 2010.
- ⑧ 河野芳朗 : 歯胚中間層における 67kD laminin receptor(67LR)の発現: 星状網における血管網形成との相関. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2009. 9. 9- 11, *歯科基礎医学会雑誌*, 51 (Suppl.): 73, 2009.
- ⑨ 河野芳朗 : 歯槽骨の発生におけるアクアポリン 1 (AQP1) 陽性細胞の出現. 第 114 回

日本解剖学会総会・全国学術大会, 岡山, 2009. 3. 28-30, *解剖学会雑誌*, 84 (Suppl):179, 2009.

[図書] (計 1 件)

- ① 河野芳朗: II編 7 章 4. 特殊感覚器の構造と機能. 最新歯科衛生士教本 人体の構造と機能 1 解剖学・組織発生学・生理学 (前田健康, 山田小枝子編), 198-205 頁, 医歯薬出版, 東京, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 芳朗 (KAWANO YOSHIRO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 60303129

(2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 40183941

(3) 連携研究者

なし