

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3月31日現在

機関番号：11301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592384
 研究課題名（和文） 歯原性嚢胞発生モデルマウスでの微小循環に関する経時的・立体的解析
 研究課題名（英文） Chronological and morphological analysis of microcirculation in transgenic mouse model with odontogenic cystic lesion.
 研究代表者
 小野寺 健（ONODERA KEN）
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
 研究者番号：30233597

研究成果の概要（和文）：モデルマウス作成に先立ち、すでに系が確立している ptc ノックアウトマウス胎児を用い、嚢胞の出現を検索した。その結果、下顎臼歯部の歯槽骨と歯根膜には組織学的に嚢胞の存在をみるも、上顎にはみられなかった。また、上記とは別にヒト歯原性嚢胞性病変について、CD31, CD34 および D2-40 を用いて検索を行った。用いた病変は、含歯性嚢胞、歯根嚢胞、角化嚢胞性歯原性腫瘍である。D2-40 は嚢胞壁のリンパ管に対し陽性所見を示し、CD31 と CD34 は嚢胞壁の血管に対し陽性所見を示した。とりわけ、歯根嚢胞においてリンパ管および血管の顕著な増生をみた。

研究成果の概要（英文）：Preliminary, we examined jaw cysts in heterozygous ptc knockout mouse. Mandibular cysts were often histologically detected in the alveolar bones or periodontal ligaments of the molars, but maxillary cysts were not detected. And we analyzed the expression of CD31, CD34 and D2-40 in human odontogenic cystic lesions of dentigerous cysts, radicular cysts and keratocystic odontogenic tumors. Distinctly positive staining for D2-40 was found in lymphatic vessels located in the cystic walls. Small blood vessels stained for CD31 and CD34 were also present in the cystic walls. Especially, numerous lymphatic vessels and blood vessels were present in the radicular cysts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・歯周治療系歯学

キーワード：歯学、病理学、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

顎骨内の循環系には大別して血管系とリンパ管系の2種類が存在する。従来、X線

等を用いて全体像をとらえることはしばしば行われてきたが、より局所—例えば歯周組織での微小循環—を観察することは非常

に困難であった。その理由として、切片標本では二次元的な観察のみが可能であり、立体的・動的な変化を観察し得ないためである。

この欠点の解消のために血管鋳型法—血管の中に低粘度で水に安定な合成樹脂を注入し、軟組織・硬組織を溶解して血管網を露出させる—あるいは血管内墨汁注入法による観察が行われてきた。松尾(1986)は、歯の移動時の歯根膜血管網及び歯槽骨表面の変化について血管鋳型法を用いて走査電顕にて観察しており、圧迫側及び牽引側のそれぞれで血管網に変化が生じることを報告している。

しかし上記の方法では、血管網と周囲軟組織あるいは硬組織との関連性が判然としないという欠点があり、また歯槽骨内の血管網についてはその表面をみるに過ぎない。また従来の方法では、血管系・リンパ管系をそれぞれ分離して観察することが困難であった。その理由としてリンパ管内皮細胞のみに特異的に染色する方法が、少なかったからであるが、近年の免疫組織学的手法(D2-40、PECAM-1、MHC classII などの)の発達により、リンパ管と血管を区別して染色することが容易になってきた。

研究代表者らは、イヌを用いて実験的な辺縁性歯周炎を作成し、発症・進行・治癒過程について線維芽細胞由来と言われるオキシタラン線維の動態を中心に報告し、また歯槽骨頂部および歯槽骨空隙内での線維芽細胞の細胞動態について AgNORs 数(核小体関連蛋白(NORs)の鍍銀染色、Plotonら、1986)の推移から報告してきた。In vitro では、歯肉増殖症における線維芽細胞の細胞増殖能を、AgNORs 染色、PCNA 染色を用いて検索を行っている。また、イヌを用いて実験的辺縁性歯周炎を発症させ、その進行および治癒過程における歯周組織の微小循環(血管およびリンパ管)の変化について立体構築学的に観察した。その結果、通常、辺縁性歯周炎を発症していない正常の歯根膜においては、血管とリンパ管は規則的なネットワークをなして平行に走行しているのに対し、辺縁性歯周炎を発症させた病変部では、血管およびリンパ管の走行には不規則性が生じ、管腔の大きさがばらつきの出ることが観察された。歯周組織を中心とした微小循環は様々な外因で変化を生じるということを明らかにした。

2. 研究の目的

顎骨内の歯原性嚢胞性病変に着目し、その形成過程での微小循環の変化について明らかにしていきたい。歯原性嚢胞性病変とは、歯原性上皮に由来する病変で、

その成り立ちの上から、腫瘍性病変、歯の発育に関連して生じる病変、発育完了後の根尖部歯周組織の炎症に基づく病変とに大別される。腫瘍性病変として代表的なものにエナメル上皮腫、角化嚢胞性歯原性腫瘍等があげられ、歯の発育に関連する病変として代表的なものには、含歯性嚢胞、歯肉嚢胞等があげられ、炎症性病変の代表的なものとして、歯根嚢胞等があげられる。

近年、遺伝子技術の発達により、様々な遺伝子欠損をもつノックアウトマウスが作製されてきている。なかでも、Msx1、Msx2 遺伝子欠損を持つノックアウトマウスは、唇・口蓋裂、神経管閉鎖不全、心奇形、四肢の奇形などをきたし、先天異常の遺伝子機構の解明に有用である。とりわけ角化嚢胞性歯原性腫瘍発生のモデルマウスとして注目されてきつつある。

今回、Msx 遺伝子欠損マウスを用いて顎骨内嚢胞を発生させ、その周囲の微小循環(血管及びリンパ管)の変化について、経時的かつ三次元構築を行って立体的に検討することを目的とする。また周囲軟組織及び骨組織と血管網との関連性についても併せて検討する。

また、他の歯原性嚢胞性病変(手術摘出標本)を用いて、同様に微小循環に着目して検討していく。

3. 研究の方法

(1) MSX 遺伝子欠損マウスに生じた顎骨内嚢胞について

その発生・成長段階別に標本を摘出し、脱灰・通法に従いパラフィン包埋標本とし、連続切片を作製した後、免疫染色を施す。そして、連続切片から立体構築を行う。

これにより、モデルマウスを用いて顎骨内嚢胞を発生させ、微小循環系(血管およびリンパ管)が、嚢胞の発育とともにどのように変化していくかを、経時的かつ三次元的に解析する。

(2) 歯原性嚢胞性病変(エナメル上皮腫、角化嚢胞性歯原性腫瘍、含歯性嚢胞、歯根嚢胞)の手術摘出標本について

腫瘍性発育を示す病変(エナメル上皮腫、角化嚢胞性歯原性腫瘍)、歯の発育に関連する病変(含歯性嚢胞)、炎症性病変(歯根嚢胞)を歯原性嚢胞性病変として手術摘出標本から抽出し、脱灰・通法に従いパラフィン包埋標本とし、連続切片を作製した後、免疫染色を施す。そして、連続切片から立体構築を行う。

これにより、手術摘出標本を用いて腫瘍性発育を示す病変、歯の発育に関連する病変、炎症性病変のそれぞれの病変で、顎骨内微小循環系(血管およびリンパ管)

の構成に差異があるか否かを解析する。

4. 研究成果

(1) ptcノックアウトマウスの病理組織学的観察：方法①のモデルマウス作成に先立ち、既に系が確立しているptc (マウス胚発生において神経管の背腹軸の決定に重要な役割を果たしている分泌性のタンパク質であるShhのレセプター) ノックアウトマウス胎児16匹を用い、ホルマリン固定・パラフィン包埋後、上下顎臼歯部を矢状断で厚さ3 μ mの連続切片として各々300枚作製し、5枚おきにHE染色を施した。そして顎骨内嚢胞発現の有無を検索した。その結果、ptcノックアウトマウスにおいて下顎臼歯部の歯槽骨および歯根膜内には組織学的に少数の顎骨内嚢胞をみるものの、上顎臼歯部において顎骨内嚢胞の出現をみるのは極めて困難と思われた。

(2) ヒト歯原性嚢胞性病変の病理組織学的観察：上記作業と併せて、方法(2)に関するヒト歯原性嚢胞性病変として、歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞を手術摘出標本から各々10例を抽出し、顕微鏡用にホルマリン固定・パラフィン包埋して連続切片を作製した。これらを用いて顎骨内における嚢胞形成を循環系という観点から明らかにしようとするものである。これらの標本を抽出した理由として、歯原性嚢胞性病変とは歯原性上皮に由来する病変であり、その成り立ちの上から、発育完了後の根尖部歯周組織の炎症に基づく病変、歯の発育に関連して生じる病変、腫瘍性病変とに大別されるためである。それぞれの病変を代表するものとして歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞を選択した。

その結果、HE染色では、歯根嚢胞は、中等度の慢性炎症性細胞浸潤を伴った肉芽-結合組織からなる嚢胞壁がみられ、上皮突起の伸長を伴った非角化性重層扁平上皮で裏装されていた。含歯性嚢胞は、ごく軽度の慢性炎症性細胞浸潤を伴った線維性結合組織からなる嚢胞壁がみられ、3~7層に並ぶ平坦あるいは立方上皮により裏装されていた。裏装上皮は角化していなかった。角化嚢胞性歯原性腫瘍は、ごく軽度の慢性炎症性細胞浸潤を伴った線維性結合組織からなる嚢胞壁がみられ、おおよそ5~9層に並ぶ角化重層扁平上皮により裏装されていた。上皮突起の伸長はみられなかった。

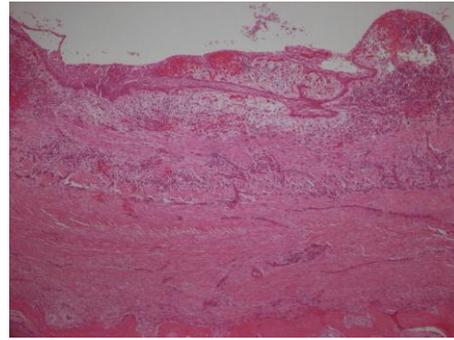


図1 歯根嚢胞

中等度の慢性炎症性細胞浸潤を伴った肉芽-結合組織からなる嚢胞壁と、上皮突起の伸長を伴った非角化性重層扁平上皮の裏装がみられる。(HE染色)

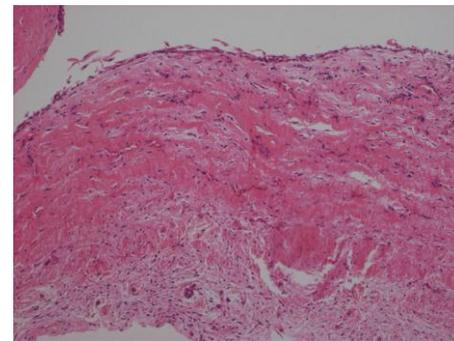


図2 含歯性嚢胞

ごく軽度の慢性炎症性細胞浸潤を伴った線維性結合組織からなる嚢胞壁と3~7層に並ぶ平坦あるいは立方上皮の裏装がみられる。裏装上皮は角化を伴っていない。(HE染色)

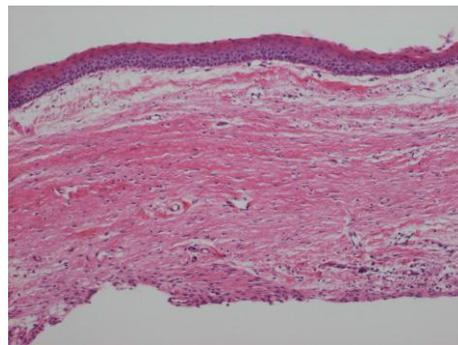


図3 角化嚢胞性歯原性腫瘍

ごく軽度の慢性炎症性細胞浸潤を伴った線維性結合組織からなる嚢胞壁がみられ、おおよそ5~9層に並ぶ角化重層扁平上皮の裏装がみられる。上皮突起の伸長はみられない。(HE染色)

免疫染色では、下図のようにD2-40はリンパ管に対して特異的に染色され、CD31とCD34は毛細血管に対して特異的に染色された。

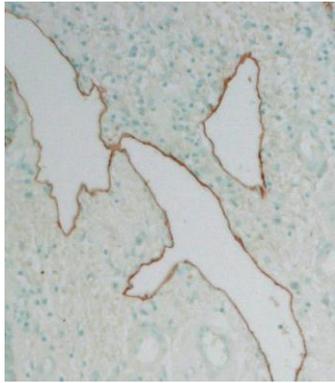


図4 リンパ管に対する免疫組織化学的染色(D2-40 染色)。嚢胞壁内のリンパ管が茶褐色に染色されている。

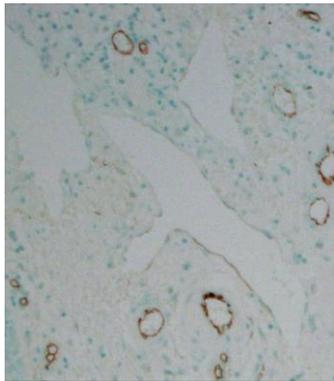


図5 血管に対する免疫組織化学染色(CD31 染色)。嚢胞壁の血管が茶褐色に染色されている。

各病変の連続切片に対して、HE 染色、CD31 染色、D2-40 染色の順で交互に染色を行い、その標本を元に立体構築を行った。

その結果、含菌性嚢胞および角化嚢胞性歯原性腫瘍では、少数の毛細血管・リンパ管がみられた。毛細血管とリンパ管はそれぞれ枝分かれをしながら走行する像がみられるものの両者の交通はほとんどみられなかった。

炎症性病変を呈する歯根嚢胞では、毛細血管・リンパ管ともにその数が顕著であった。両者とも複雑な吻合を繰り返しながら枝分かれをしており、血管とリンパ管の双方が交通する像もみられた。(図6)

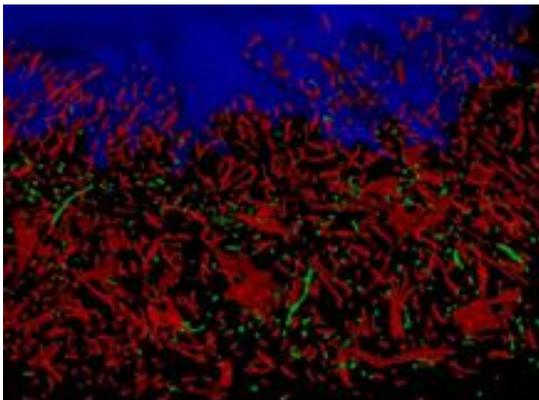


図6 歯根嚢胞の嚢胞壁における毛細血管(赤色)とリンパ管(緑色)の立体構築像。青は裏装上皮。裏装上皮に接するに従い、脈管腔の径は小さくなり、枝分かれが目立つようになる。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 小野寺健、熊本 裕行、「歯原性嚢胞性病変におけるサイトケラチン7,20 およびカルレチニンの発現に関する免疫組織学的検討」日本病理学会総会、2010年4月28日、東京。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計◇件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 健 (ONODERA KEN)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常

勤講師
研究者番号：30233597

(2)研究分担者
熊本 裕行 (KUMAMOTO HIROYUKI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70215028

(3)連携研究者
()

研究者番号：