

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 6月 5日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592571

研究課題名（和文）ヘパラーゼによる上皮鞘基底膜断裂と歯周組織再生制御機構の解明に関する研究

研究課題名（英文）Heparanase localization and stimulatory effect during formation and regeneration of periodontal tissues

研究代表者

平田 あずみ（HIRATA AZUMI）

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40263587

研究成果の概要（和文）：ヘパラーゼは上皮鞘基底膜パルカンを分解することにより歯根形成、特にセメント質形成に関わる。本研究ではヘパラーゼの歯周組織形成・再生への関与を検討した。ヘパラーゼは骨芽細胞、口腔粘膜上皮細胞に局在することを明らかにした。また、モデルマウスの解析より歯根膜内埋入ヘパラーゼビーズ表層に硬組織様基質が観察された。これらのことより、ヘパラーゼは歯周組織を構成する細胞の分化・増殖に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported that heparanase may contribute to root formation, especially cementoblast differentiation, by degrading perlecan in the dental basement membrane. The aim of this study was to determine whether heparanase might function in periodontal development and regeneration. Our studies indicated that 1) Heparanase localization was observed in osteoblasts and in the basal cells of the oral epithelium. 2) Palatal epithelial cells were labeled with intense heparanase signal during palatogenesis; in contrast, perlecan labeling was sparse in the basement membrane of medial epithelial seam. 3) Exogenous heparanase might exhibit proliferative potential to dental mesenchymal stem cells in the apical space. These findings suggested that heparanase may have an important role during the process of formation and regeneration of periodontal tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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・外科系歯学

キーワード：ヘパラーゼ・歯周組織・基底膜・器官培養・モデルマウス・幹細胞・組織再生

1. 研究開始当初の背景

歯の再生への関心の高まりとともにその基礎となる歯根・歯周組織形成に関する研究が世界的に注目されている。歯・歯周組織形成

には上皮組織と間葉組織の相互作用が必須で、その分化誘導シグナルとして細胞外基質に存在するさまざまなサイトカインや増殖因子の関与が明らかにされている。歯周組織

のひとつであるセメント質は、歯根を覆い、咀嚼力に耐えるための緩衝材となる歯根膜を歯に固定する機能を果たしている。歯周病治療、自家歯牙移植の際に移植歯を生着させ機能させるためにはセメント質・歯根膜・歯槽骨といった歯周組織が重要であり、またインプラント治療においてもインプラント体を維持・機能させるためには良質な歯槽骨が必要である。

われわれはこれまで、セメント芽細胞分化メカニズムを明らかにするために「Hertwig 上皮鞘基底膜」に着目し、上皮鞘基底膜へパラン硫酸プロテオグリカン（パールカン）の消失とパールカンの分解酵素ヘパラーゼのセメント芽細胞分化・増殖への関与について報告してきた（Hirata, A. and Nakamura, H. J Histochem Cytochem 54, 2006）。しかしながら、ヘパラーゼによりパールカンへパラン硫酸鎖から実際に遊離・活性化される成長因子、さらにはその成長因子が作用する標的細胞の同定には至っていない。

2. 研究の目的

apical space は象牙質と歯髄および歯周組織の界面に相当し、これらの組織を構成する象牙芽細胞・歯髄細胞・セメント芽細胞・歯根膜細胞の前駆細胞が豊富に存在する領域である。本研究では apical space へのヘパラーゼの局所刺激により誘導される前駆細胞の分化を観察することによって、歯周組織前駆細胞の同定と歯根・歯周組織形成へのヘパラーゼの作用について検討し、ヘパラーゼによる基底膜断裂と歯周組織再生・分化を直接結びつけるメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス歯周組織形成過程の免疫組織化学的検討

- ①セメント芽細胞分化マーカーの探索：セメント質と骨組織は類似した組織であることを踏まえ、骨芽細胞分化因子のセメント芽細胞分化マーカーとしての有用性について検討する。
- ②口蓋骨形成とヘパラーゼ：骨組織形成へのヘパラン硫酸とヘパラーゼの関与を明らかにするために骨芽細胞分化因子、ヘパラン硫酸、ヘパラーゼの局在を検討する。
- ③口腔粘膜形成とヘパラーゼ：二次口蓋形成過程における口腔粘膜基底膜の動態とヘパラーゼ局在について検討する。
- ④二次口蓋形成における Homeobox 遺伝子局在：頭蓋顎顔面発生に重要な Homeobox 遺伝子に属す *Hoxc* 遺伝子に着目し、*Hoxc4*、*Hoxc5*、*Hoxc6* の局在について検

討する。

(2) マウス下顎骨器官培養実験

- ①ヘパラーゼリコンビナントタンパク質の発現と精製：大腸菌によるリコンビナントヘパラーゼタンパク質の発現系と精製方法を確立する。
- ②歯根形成期下顎臼歯部の器官培養：2週齢マウス下顎骨による器官培養系を確立し、ヘパラーゼ添加による歯周組織形成への影響を組織学的に検討する。

(3) ビーズ埋入モデルマウスの作製と検討

- ①歯周組織への埋入モデル：ヘパラーゼを結合させたビーズをマウス下顎第一臼歯歯根部に埋入後、経時的に試料を採取し、組織学的検討を行う。
- ②歯髄への埋入モデル：実験的に露髄させたマウス第一臼歯歯髄にビーズを埋入後、修復象牙質の形成過程について免疫組織化学的に検討する。

(4) 総括および成果発表

4. 研究成果

(1) 歯周組織形成過程の免疫組織化学的検討

- ①セメント芽細胞分化：骨芽細胞分化因子 Runx2, osterix およびこれらにより転写調節される骨基質タンパク質 osteopontin のセメント芽細胞分化過程における局在を検索した。歯小囊細胞、前セメント芽細胞には Runx2 が、セメント芽細胞には Runx2 と osterix 両局在とさらに osteopontin 局在が観察され、Runx2 と osterix の両因子がセメント芽細胞分化に重要であり、セメント芽細胞は osteopontin をセメント質基質として産生することを明らかにした（図 1）。

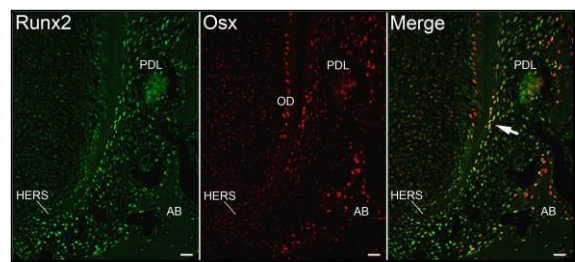
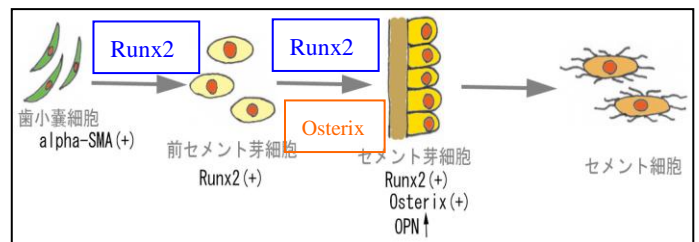


図 1



これらより、セメント芽細胞の分化マーカーとして、Runx2、osterix、

図 2

osteopontin が有用であることを示唆した (図 2)。

②口蓋骨形成とヘパラーゼ：口蓋骨形成過程における osterix、osteopontin、ヘパラン硫酸およびヘパラーゼの局在について検討した。口蓋突起癒合後に口蓋骨形成予定域に細胞の集積を認め、骨形成は生後 0 日に観察された。骨表層の骨芽細胞に osterix が、骨梁表層に osteopontin が観察された。形成された骨基質の一部にヘパラン硫酸が局在し (図 3)、ヘパラーゼは骨表層の骨芽細

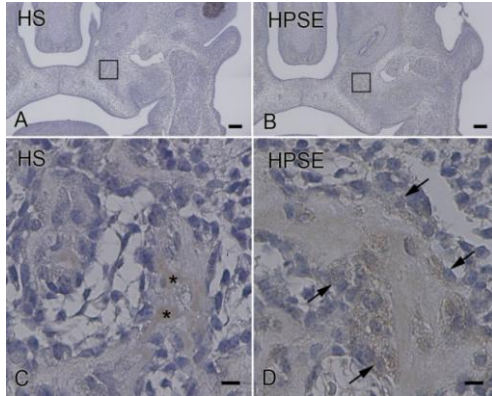


図 3

胞に局在した (図 4)。これらより、骨基質中に存在するヘパラン硫酸および骨芽細胞が産生したヘパラーゼは骨形成に関与することが示唆された。

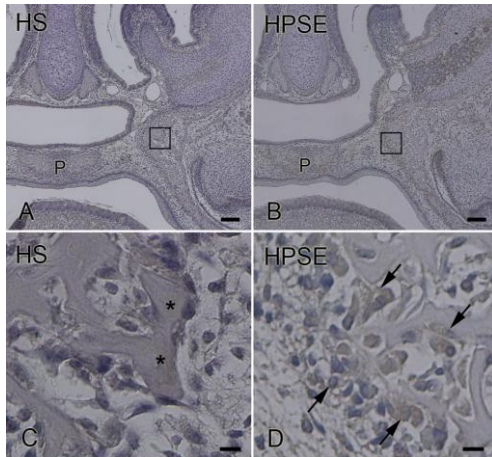


図 4

③口腔粘膜形成とヘパラーゼ：口蓋形成期にはヘパラーゼは口蓋上皮細胞に局在し、特に口蓋突起癒合期上皮索へのヘパラーゼ局在と、同時期の上皮索基底膜パルカンの消失が観察された (図 5、6)。さらに口腔粘膜基底層細胞へのヘパラーゼの強局在が認められ、これらの結果より、口腔粘膜の形成・再生・代謝・維持にヘパラーゼが関与することが示唆され

た。

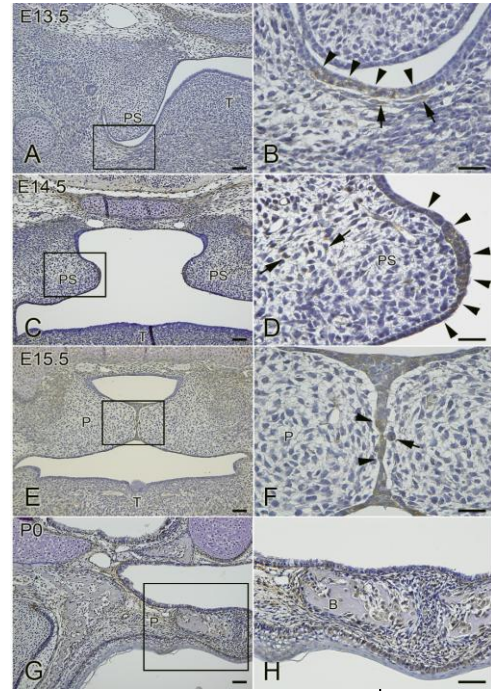


図 5

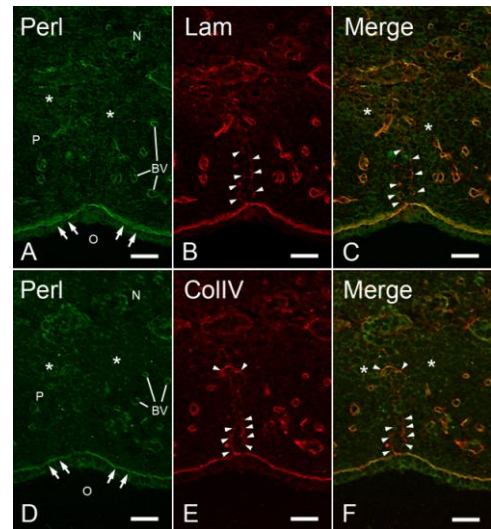


図 6

④Hoxc4、Hoxc5、Hoxc6 局在：口蓋形成初期には Hoxc5 は口蓋突起間葉系細胞に、口蓋突起水平位時には口蓋突起上皮細胞および口蓋突起基部に集積する間葉系細胞 (骨芽細胞) に観察された。これらは PCNA の局在性と類似していたことから Hoxc5 は口蓋突起の増殖と分化、口蓋突起の水平方向への伸長に関与する可能性が示唆された。口蓋突起癒合期には上皮索、上皮島、上皮トライアングルに局在が認められ、癒合部上皮組織の消失への関与が推察された。生後 0 日での局在性より口腔粘膜上皮、鼻腔粘膜上皮の最終分化を調節することが示唆された (図 7)。

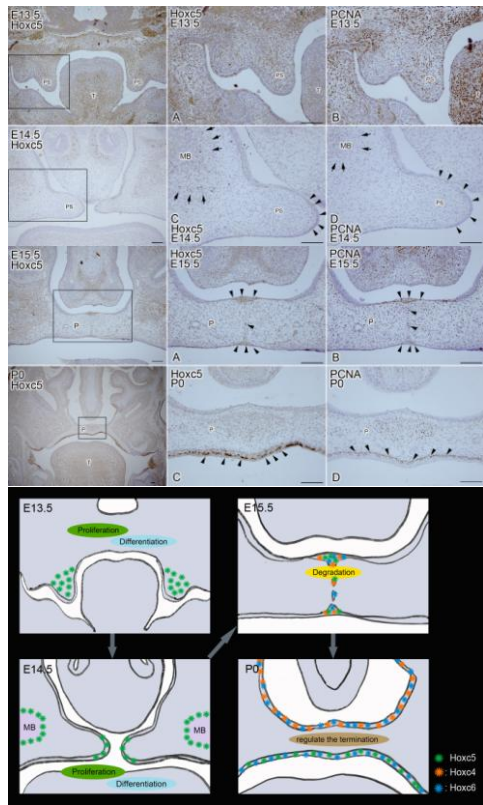


図 7

(2) マウス下顎骨器官培養実験

- ①ヘパラーゼリコンビナントタンパク質の大腸菌による発現系構築は糖鎖付加が不可能であることから困難と判断し、市販のリコンビナントヘパラーゼを用いることとした。
- ②ヘパラーゼ添加培養実験では培養120時間までの試料を採取し、組織学的観察を行った。培養歯根部 Hertwig 上皮鞘周囲に PCNA 陽性細胞が観察され、上皮鞘周囲の間葉系細胞の増殖が示唆されたが、ヘパラーゼの影響観察には長時間の培養が必要と考えられた。

(3) ビーズ埋入モデルマウスの解析

- ①apical space へのビーズ埋入後30日目までの組織学的観察を行った。ビーズは歯根膜様線維性結合組織内に観察され、特に、7日目にはビーズ周囲の細胞が PCNA 局在を示し、さらにビーズ表層の一部に硬組織様基質が観察された。これらのことより、ヘパラーゼによりビーズ周囲の間葉系細胞の増殖が惹起され、象牙質、セメント質、歯槽骨といった歯・歯周組織を構成する硬組織形成細胞へと分化した可能性が示唆され、これにはビーズから放散されたヘパラーゼの関与が推察された (図8)。
- ②歯・歯周組織再生、特に象牙質修復において apical space に存在する間葉由来幹細胞が関与することを明らかにした。

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3件)

- ① Harichane, Y., Hirata, A., Dimitrova-Nakov, S., Granja, I., Goldberg, M., Kellermann, O. and Poliard, A. Pulpal progenitors and dentin repair. *Advances in Dental Research*, 査読有, 23, 2011, 307-312
DOI: 10.1177/0022034511405322
- ② Hirata, A., Tsuji, T., Imura, H., Yamada, T., Ueno, T., Mishima, K., Natsume, N., Sugahara, T., Koga, Y., Takano, K. and Nakamura, H. Localization of the HOXC homeobox gene family during palate formation in mice. *Selected papers from the XX Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 査読無, 2010, 415-420
- ③ Hirata, A., Sugahara, T. and Nakamura, H. Localization of Runx2, osterix and

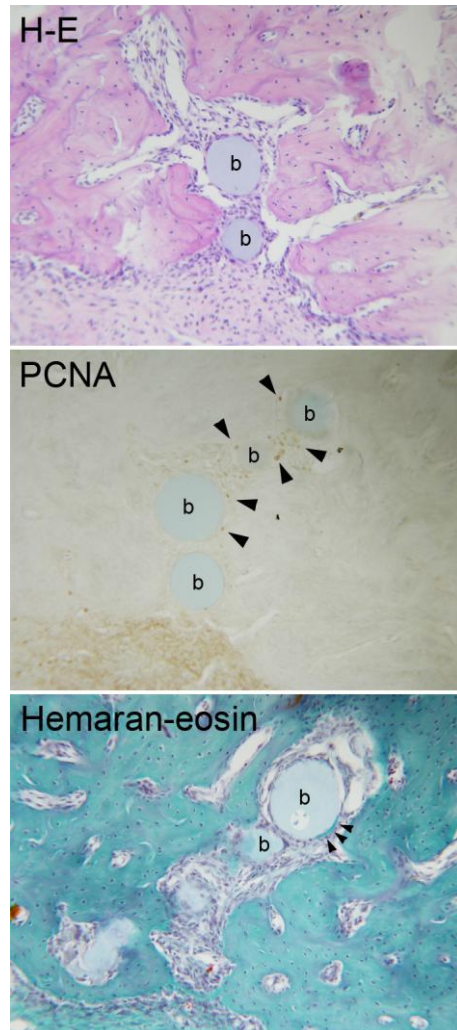


図 8

osteopontin in tooth root formation in rat molars. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 査読有, 57, 2009, 397-403
DOI: [10.1369/jhc.2008.952192](https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952192)

[学会発表] (計6件)

- ① 平田あずみ、井村英人、南 克浩、夏目長門、菅原利夫、Homeobox family *HOX* 遺伝子は口蓋形成に関与する、第56回日本口腔外科学会総会、平成23年10月21日、大阪
- ② 平田あずみ、井村英人、山田朋弘、植野高章、三島克章、南 克浩、夏目長門、菅原利夫、Homeobox family *HOXC* 遺伝子は口蓋形成に関与する、第55回日本口腔外科学会総会、平成22年10月16日、千葉
- ③ Hirata, A., Tsuji, T., Imura, H., Yamada, T., Ueno, T., Mishima, K., Natsume, N., Sugahara, T., Koga, Y., Takano, K. and Nakamura, H. Localization of the *HOXC* homeobox gene family during palate formation in mice. XX Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 17 September 2010, Bruges, Belgium
- ④ 平田あずみ、山田朋弘、植野高章、井村英人、香川智正、山近英樹、松村達志、森谷徳文、三島克章、菅原利夫、口蓋の骨形成過程におけるヘパラン硫酸とヘパラーゼの役割、第54回日本口腔外科学会総会、平成21年10月10日、札幌
- ⑤ 平田あずみ、植野高章、松村達志、森谷徳文、菅原利夫、中村浩彰、口蓋の骨形成過程におけるヘパラン硫酸とヘパラーゼの役割、第51回歯科基礎医学会学術大会、平成21年9月10日、新潟
- ⑥ Hirata, A., Tsuji, T., Ueno, T., Yamada, T., Imura, H., Kagawa, T., Matsumura, T., Moritani, N., Mishima, K., Sugahara, T. and Nakamura, H. Localization of heparanase during palatal bone formation in palatogenesis in mice, 36th European Symposium on Calcified Tissues, 24 May 2009, Vienna, Austria

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 あずみ (HIRATA AZUMI)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教
研究者番号：40263587

(2) 研究分担者

植野 高章 (UENO TAKAAKI)

大阪医科大学・口腔外科学教室・教授

研究者番号：60252996

辻 岳人 (TSUJI TAKEHITO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：90314682

松村 達志 (MATSUMURA TATSUSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70432648

(3) 連携研究者

菅原 利夫 (SUGAHARA TOSHIO)

愛知学院大学・歯学部・客員教授

研究者番号：10116048

(4) 海外共同研究者

Michel Goldberg (MICHEL GOLDBERG)

INSERM Université Paris Descartes ·
Professeur émérite

Anne Poliard (ANNE POLIARD)

Université Paris Descartes Faculté de
Chirurgie Dentaire · Professeur