

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659977

研究課題名(和文) 歯周組織の細胞周期アトラスの作製

研究課題名(英文) Cell cycle atlas of periodontium

研究代表者

山本 直史 (Yamamoto, Tadashi)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50432662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞の細胞周期の進行をリアルタイムで識別できるトランスジェニックマウス(Fucciマウス)は、歯周組織での時空的な細胞周期の動態を解析するための重要なツールであり、特に未分化な細胞と歯肉上皮の細胞周期の可視化に有用である。これを応用したFucciマウスの歯周病モデルの分子イメージング結果から、歯周組織の炎症期に活性化好中球が産生する一連の活性酵素が、歯周組織構成細胞の細胞周期をG1期で停止させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fucci transgenic mice constitutively expressing cell-cycle probes are important tools to analyze the spatiotemporal transition of the cell-cycles in periodontium, especially, are useful to visualize the cell-cycles of undifferentiated mesenchymal cells and gingival epithelial cells. The molecular imaging employing Fucci technology demonstrated that a series of active enzymes produced by neutrophil during periodontal inflammation would induce G1-arrest of the cell-cycle of periodontal cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：細胞周期 細胞増殖・分化 歯周組織

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖・分化は生命の基本的な要素であり、細胞分化の開始には G1 期での増殖停止が必須であるが、増殖停止と分化進行の制御機構には未だ不明な点が多い。さらに、多分化能を持つ幹細胞の細胞周期制御の研究は遅れており、その分子基盤は明らかではない。

一方、歯周組織では、上皮-間葉形質転換 (EMT) を含む様々な細胞周期制御が厳密にコントロールされることによって、組織の発生・恒常性・再生が起きると考えられるが、それら一連の過程での細胞動態は明らかでなく、とりわけ、歯根膜や骨組織中の幹細胞の細胞周期制御機構は全く不明である。

すなわち、組織の発生や分化を理解するためには細胞周期の制御機構を調べる必要があると考え、歯周組織での時空間的な細胞周期の動態を解析するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、生細胞の細胞周期の進行をリアルタイムで識別できるトランスジェニックマウス (Fucci マウス: 理化学研究所より提供; Sakaue-Sawano et al, *Cell* 132, 487-498 (2008), Niwa et al, *Gene* 108, 193-200 (1991)) を用いて、歯周組織中の細胞周期の制御機構に着目して、細胞の増殖・分化動態を包括的に観察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1)歯の発生(2)歯周組織の恒常性維持(3)感染・骨吸収モデルの組織炎症・創傷治癒における細胞周期の進行・停止の局在を解析し、その時空間的な特徴から細胞周期の制御機構の分子基盤を得る。

### ①Fucci マウスラインの確立

Fucci-G1 (mKO2 (monomeric Kusabira-Orange2)-Cdt1), および Fucci-S/G2/M (mAG (monomeric Azami Green)-Geminin) マウスを交配し、ダブルトランスジェニックマウス (Fucci マウス) の系統を確立する。

### ②歯の発生期における細胞周期の解析

胎齢 12~14 日 (embryonic day: E12~E14) の歯胚を含む頭蓋部の組織切片を通常法に従って作製し、歯胚構成細胞の細胞周期を、上述の蛍光標識を指標として蛍光顕微鏡下で解析する。なお、緑色標識が微弱であったため、mKO2 抗体を用いた蛍光免疫染色を併用

して解析を行った。

### ③細胞遊走アッセイと細胞周期解析

3~4 週齢の Fucci マウスの歯肉上皮から既報に従って (Shimoe et al, *J Periodontal Res.* 2014) 歯肉上皮細胞を分離・培養し、スクラッチアッセイにおける Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) の細胞周期への影響を調べる。

### ④骨髄幹細胞の細胞周期解析

12 週齢の Fucci マウス大腿骨から、既報に従って (Akiyama et al, *Cell Stem Cell.* 2012) 間葉系幹細胞を分離・培養し、細胞周期の分布を解析する。

### ⑤歯周組織の細胞周期解析

12 週齢の Fucci マウスから、歯周組織切片を作製し、歯周組織構成細胞の細胞周期の分布を解析する。

### ⑥歯周炎モデルマウスの作製

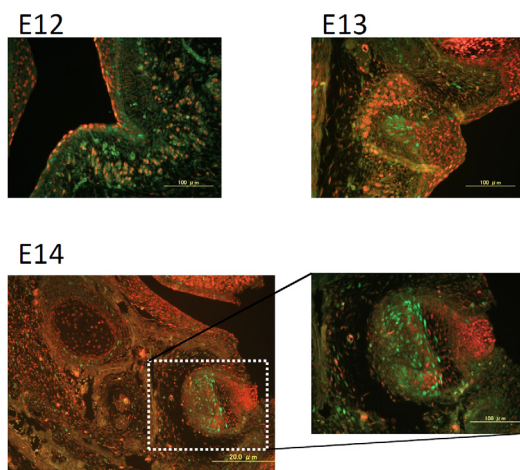
12 週齢 Fucci マウスの *Porphyromonas gingivalis* 感染モデルを作製する (2014 学会発表)。14 日後に歯周組織切片を作製し、感染による慢性炎症によって惹起された細胞周期変化を解析する。

### ⑦分子イメージング解析

上記感染モデルに XenoLight Redirect Inflammation Probe を腹腔内投与し、IVIS<sup>®</sup>Spectrum (ともに Xenogen 社製) にて炎症部位のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の発光と mKO2 の蛍光との in vivo イメージング解析を行う。

## 4. 研究成果

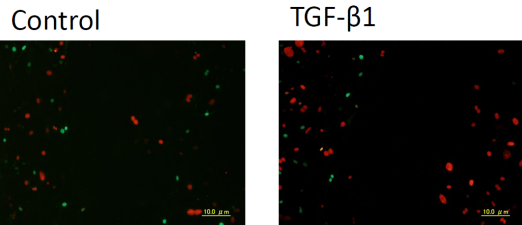
### (1) 歯胚構成細胞の細胞周期



E12~E14 の蕾状期から帽状期における歯胚構成細胞の細胞周期分布を解析した結果、

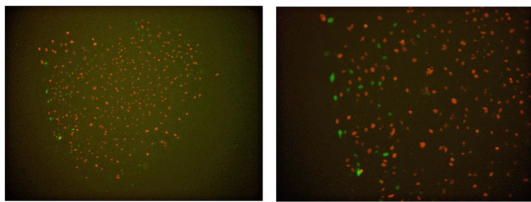
歯肉上皮、蕾状期後半の歯乳頭には赤色標識の G1 期細胞が集積し、エナメル結節およびエナメル器には緑色標識の S/G2/M 期細胞が集積した。これらの結果は、エナメル結節がシグナルセンターとして歯胚構成細胞の増殖を制御することを裏付けるものである。

## (2) TGF-β1 の細胞周期への影響



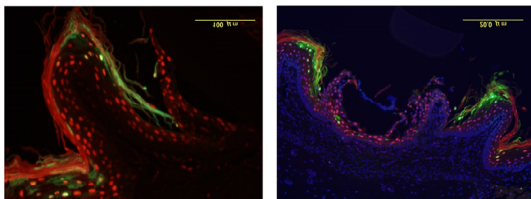
スクラッチアッセイにおける細胞遊走を解析した結果、TGF-β1 刺激（右図）によって、赤色標識の G1 期細胞の遊走がコントロール（左図）よりも促進される傾向があった。すなわち、TGF-β1 による歯肉上皮細胞に対する強力な増殖抑制作用によって、細胞周期の進行が抑制されたと考えられる。

## (3) 間葉系幹細胞の細胞周期パターン



大腿骨から分離した間葉系幹細胞のコロニーの細胞周期を調べると、コロニー中央部（左図；弱拡大）には赤色標識の G1 期細胞が集積し、辺縁部（右図；強拡大）には緑色標識の S/G2/M 期細胞が集積した。すなわち、間葉系幹細胞のコロニー辺縁部において、mAG-Geminin は高い未分化増殖能を有する細胞群のマーカースとなり得ると考えられる。

## (4) 歯周組織構成細胞の細胞周期



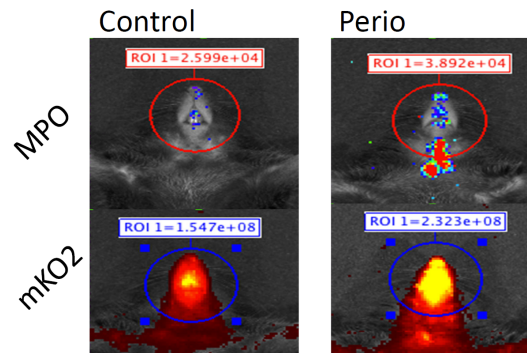
歯周組織切片を作製し、歯周組織構成細胞の細胞周期の分布を解析した結果、歯肉上皮の基底細胞層では、緑色標識された S/G2/M 期の細胞が散在し、接合上皮部で顕著であっ

た。さらに、表層への分化に伴い赤色標識された細胞分裂後の G1 期細胞が多く分布することが明らかになった（左図）。一方、歯根膜組織や骨組織においては、赤色および緑色標識が殆ど確認できなかった（右図）。

以上の結果から、Fucci マウスは、未分化な細胞と歯肉上皮の細胞周期の可視化に有用であることが示唆されたものの、分化した間葉系組織においては細胞周期マーカーの発現が極端に少ないことが分かった。

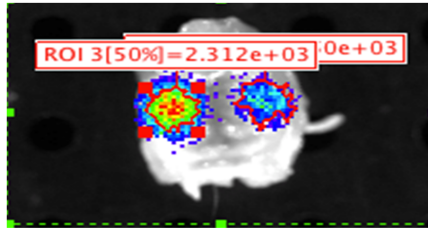
そこで、Fucci マウスよりさらに高感度・広範囲の検出系を備えた Fucci2 マウス（R26p-mCherry-hCdt1/ mVenus-hGem；Abe et al, *Development* 2013）を理化学研究所から入手して、歯周組織構成細胞の細胞周期の分布を解析したところ、Fucci マウスと同様に分化した間葉系組織において有意なマーカー発現は無かった。また、これらの結果は、パラフィン包埋切片および凍結切片何れにおいても同様であった。以上の結果から、Fucci マウスは、未分化細胞を含む発生期、および歯肉上皮などの角化層・顆粒層の細胞周期解析に有用であることが示唆された。

## (5) 歯周炎モデルマウスの分子イメージング解析

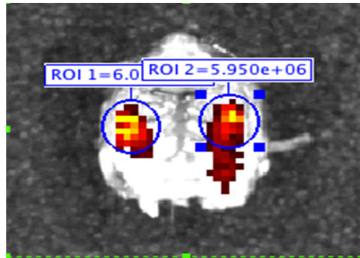


Fucci マウスを用いて Pg 感染歯周病モデル（Perio）を作製し、MPO 活性（上段）、および mKO2-Cdt1 発現（G1 期細胞；下段）について、分子イメージングによって定量解析を行った。その結果、コントロールに比較して、Perio モデルにおいて、MPO 活性が高値を示した。すなわち、Pg 感染によって歯周組織に慢性炎症が惹起され、好中球の遊走・集積と共に MPO 活性が上昇していることを示している。さらに、Perio モデルにおいて、G1 期細胞の集積を示す mKO2-Cdt1 の高発現を認めた。

MPO



mKO2



また、分子イメージングによって、歯周局所のMPO活性やmKO2-Cdt1発現を定量することも明らかになった。すなわち、Perioモデルの上顎骨を摘出し、IVIS<sup>®</sup>Spectrumでイメージング解析を行った。

その結果、顎骨に歯周炎症を起こすために結紮した絹糸の周囲に限局したMPO活性(上図)やmKO2-Cdt1発現(下図)が明らかになった。コントロール側(無処置)に比較して、結紮側の歯冠周囲に限局した炎症強度と炎症範囲が定量できた。

以上の結果から、歯周組織の炎症期に活性化好中球が産生する一連の活性酵素が、歯周組織構成細胞の細胞周期をG1期で停止させる可能性が示唆された。

## 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1件)

① Shimoe M, Yamamoto T, Shiomi N, Tomikawa K, Hongo S, Yamashiro K, Yamaguchi T, Maeda H, Takashiba S. Overexpression of Smad2 Inhibits Proliferation of Gingival Epithelial Cells. *J Periodontal Res*, 49(3):290-8, 2014, DOI I: 10.1111/jre.12106, 査読有

[学会発表] (計1件)

① 井手口英隆, 山城圭介, 山本直史, 本郷昌, 下江正幸, 高知信介, 青柳浩明, 吉原

千暁, 河村麻里, 前田博史, 高柴正悟. グリチルリチン酸 経口投与による *in vivo* 歯周組織治癒効果. 第57回日本歯周病学会春季学術大会, 2014/5/23, 岐阜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 直史 (YAMAMOTO TADASHI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号: 50432662

### (2) 研究分担者

高柴 正悟 (TAKASHIBA SHOGO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 50226768

畑中 加珠 (HATANAKA KAZU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 50362992

山城 圭介 (YAMASHIRO KEISUKE)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 30581087

山口 知子 (YAMAGUCHI TOMOKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 90580267  
(H23→H24)