

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593087

研究課題名(和文) 歯根膜細胞と腱細胞の相同性からみた歯周組織再生の可能性

研究課題名(英文) Histomorphometric assay of developing rat alveolar bone proper: Distribution of osteoclasts

研究代表者

河野 承子 (Kawano, Shoko)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10397127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜細胞と腱細胞の相同性に着目して歯周組織再生の可能性を探る目的で、骨組織形態計測法を歯槽骨の発生に応用し歯槽骨表面の解析を行った。ラットでは歯槽骨の発生は幼弱歯槽骨(線維骨)に直接歯根膜線維が埋入されるのではなく、15日齢頃、歯根膜線維と歯槽骨との連結の前に歯胚歯槽窩の上部に破骨細胞の出現が起こり、その吸収面に歯根膜線維が埋入された。この歯根膜線維面はその後、歯槽骨全体に拡大して、35日齢以降定常状態に入ることが示唆された。歯根膜線維の埋入には、破骨細胞の出現が必須である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previous study reported that the connection between periodontal ligament (PDL) and alveolar bone proper began on postnatal day 15 (P15), and the extension of fibrous bone surface (FBS) paused from P21 to P27, while the osteoclast surface continued to increase. The number of positive cells was counted and their distribution two-dimensionally plotted on serial sections. The superposition of the plotted images showed that osteoclasts first occurred on the upper part of the alveolar bone surface (ABS) on P15 and the distribution moved to the lower part by P18, extending over the entire ABS with the number of osteoclasts peaking on P27. They then localized in the center part to the cervical area of the ABS. After P50, the entire ABS was sparsely populated with osteoclasts. These results together with our previous findings suggest that the occurrence of osteoclasts prior to the formation of FBS was an essential developmental event for connecting PDL to the alveolar bone proper.

研究分野：小児歯科学分野

キーワード：歯根膜 免疫組織化学 組織形態計測 発生 組織学 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、様々なラット歯周組織の傷害・再生モデルを用いてその再生過程を組織形態学的に解析し、歯根膜の特殊性に水チャンネル陽性細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また、歯槽骨および無細胞セメント質形成、および無細胞セメント質再生時に重要な役割を果たしていること、さらにはそれらの細胞は靭帯・腱組織に共通する性質を持つことが明らかになりつつある。歯根膜中の靭帯線維の骨への埋入を解析するなかで、腱線維硬組織埋入部に破骨細胞が線維埋入に先だって出現することが示唆された。本研究は歯根膜組織の靭帯・腱組織との類似性に着目して、歯槽骨の発生(歯根膜線維の埋入)における破骨細胞の出現、局在を客観的データによって明らかにしようとするものである。

歯周組織の再生には骨移植や組織再生誘導法(GTR)、成長因子、エナメルタンパク等を用いた治療が行われている。しかしながら、これらによって再生された歯根膜は無細胞セメント質の形成が無いなど、正常な歯根膜再生誘導とは言い難い。また、これらの方法は歯周組織を歯槽骨(骨芽細胞)、セメント質(セメント芽細胞)、歯根膜線維(線維芽細胞)の複合体として、個々の組織を形成する細胞のみを考慮して行われているに過ぎず、未知の細胞成分を含む歯周組織の発生・構造の特殊性を考慮したものとはいえない。

歯は、歯根セメント質と歯槽骨が歯周靭帯によって柔軟かつ強靭に結ばれることによって機能を発揮するが、この複合組織が形成される発生メカニズムと、機能的な歯牙-歯根膜-歯槽骨複合体の再建については成功しているとはいえない。

我々は、ラット歯牙発生に関わる遺伝子・タンパク質をスクリーニングの過程で、歯周組織形成に関わる細胞群が水チャンネルを特異的に発現していることを発見した。さらに、組織発生学的解析により、水チャンネル陽性細胞がセメント質への歯根膜線維の埋入、および固有歯槽骨へのシャーピー線維埋入に直接関与している可能性を示し、本細胞が歯牙-歯周靭帯-固有歯槽骨複合体を形成する主要な細胞であることを報告してきた。また、臨床研究では、様々な実験モデル(咬合性外傷モデル、歯の矯正移動モデル、実験的アンキロシス)を用いて、ラット臼歯における水チャンネル陽性細胞の動態の解析を行ってきた。その結果、咬合性外傷モデルからは咬合性外傷後3日後に水チャンネル陽性細胞が歯根膜全体に現れ、硝子様変性部の形成の後、被包化が起こり、14日後に無細胞セメント質、および、歯根膜線維の再生が起こることを明らかにした。また、矯正移動モデルでは、これまでにほとんど報告のない牽引側(歯槽骨添加側)の解析を行い、カルセイン生体染色、および骨芽細胞分化マーカーOsxの発現、線

維芽細胞マーカーとしてS100A4およびコラーゲンの形成マーカーprolyl4-hydroxylase-beta(P4HB)の発現解析により、密生結合組織中の歯根膜埋入およびその石灰化という固有歯槽骨(束状骨)の特殊性から、その形成機構は一般的な骨形成とは異なり、水チャンネル陽性歯根膜細胞が固有歯槽骨の形成に直接関与し、歯槽骨に埋入される歯根膜線維形成の後、骨芽細胞に分化する可能性があることを報告した。また、咬合性外傷モデルでは、臼歯脱臼の後、3日目に歯根表面の水チャンネル陽性細胞は消失し、その後歯根吸収が開始されることが明らかになりつつある。

運動器における靭帯・靭帯組織は歯牙・歯周組織と同様に、筋と骨・軟骨が靭帯によって強靭に結ばれることで機能を発揮する。これは、組織学的にも構造的にも密性線維性結合組織によって筋を骨に係留し動力を伝達する点で歯根膜によく似ている。さらに、筋・靭帯組織では水チャンネル陽性細胞は歯根膜と同様に、軟骨、靭帯、骨、筋境界部に存在し、組織学的には同様の形態を持つことを確認し、本細胞は、骨芽細胞でも線維芽細胞でもないことが示唆されている。

我々は、これまでの解析から歯根膜水チャンネル陽性細胞は歯小嚢にすでに一定の割合で存在する腱細胞の一亜型であると考えた。また、この細胞が歯根膜線維の歯槽骨の埋入に重要な役割を果たしていると考え、本細胞の歯槽骨発生における細胞動態を解析し、これらの細胞の出現に先だって破骨細胞が出現することを観察した。本研究は破骨細胞の出現について組織形態学的な客観的データによる固有歯槽骨の発生における破骨細胞の出現・局在パターンを解析するものである。

2. 研究の目的

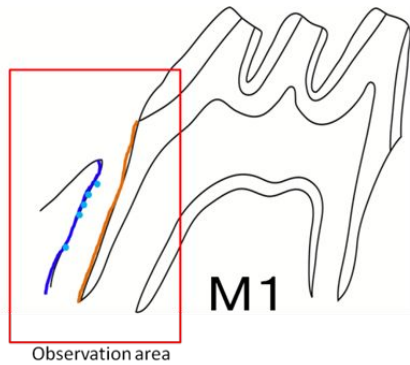
我々は、組織形態計測学的手法を用いて歯槽骨-歯根膜連結部の発生の解析を行い客観的標準データの蓄積を行ってきた。それにより、歯槽骨発生に伴う固有歯槽骨-歯根膜境界面の歯根膜線維の歯槽骨への埋入は生後15日齢から始まり35日齢で定常状態に入ること、また、歯槽骨線維面の増大は一樣ではなく21日齢から27日齢の間に停滞し、その間、破骨細胞面が増加することが明らかになった。

本研究では、固有歯槽骨の発生に伴って一過性に増加する破骨細胞に着目し、その出現、及びその局在について組織形態計測学的に解析し、歯槽骨の発生における破骨細胞の細胞動態を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1) ウイスター系ラットを用い、生後12、15、18、21、24、27、30、35、40、50、55、60日齢(n=5)で屠殺した。脱灰連続切片を作製し、50 μ m毎に5枚抽出し、カテプシンK免疫染色を施し、破骨細胞数をカウントし

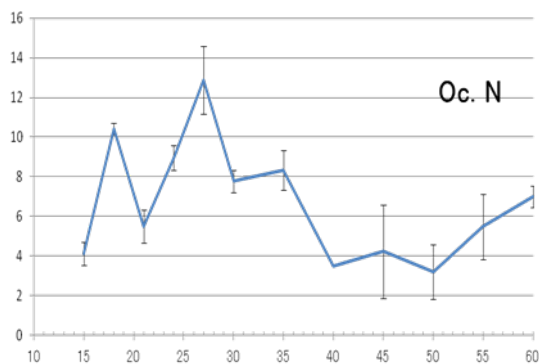
た。また、歯槽骨解析用ソフトウェアを用いて歯槽骨面と歯根面を基準面として二次元的にカテプシン K 陽性細胞の局在をプロットした。また、各グループから一個体を抽出し、カテプシン K 陽性細胞のプロット像を重ね合わせその局在傾向を解析した。



(2) 脱灰作業が歯根膜-歯槽骨界面組織構造に与える影響を評価するために、非脱灰ピラネバ染色プラスチック研磨切片を作製した。非脱灰切片用動物は歯槽骨石灰化時期の特定のために、カルセイン生体骨染色を行い研磨切片作成後、蛍光顕微鏡、歯槽骨骨線維と歯根膜線維の連続性の解析のため偏光顕微鏡下で観察した。観察部位は上顎第一大臼歯近心根近心面歯槽骨とした。

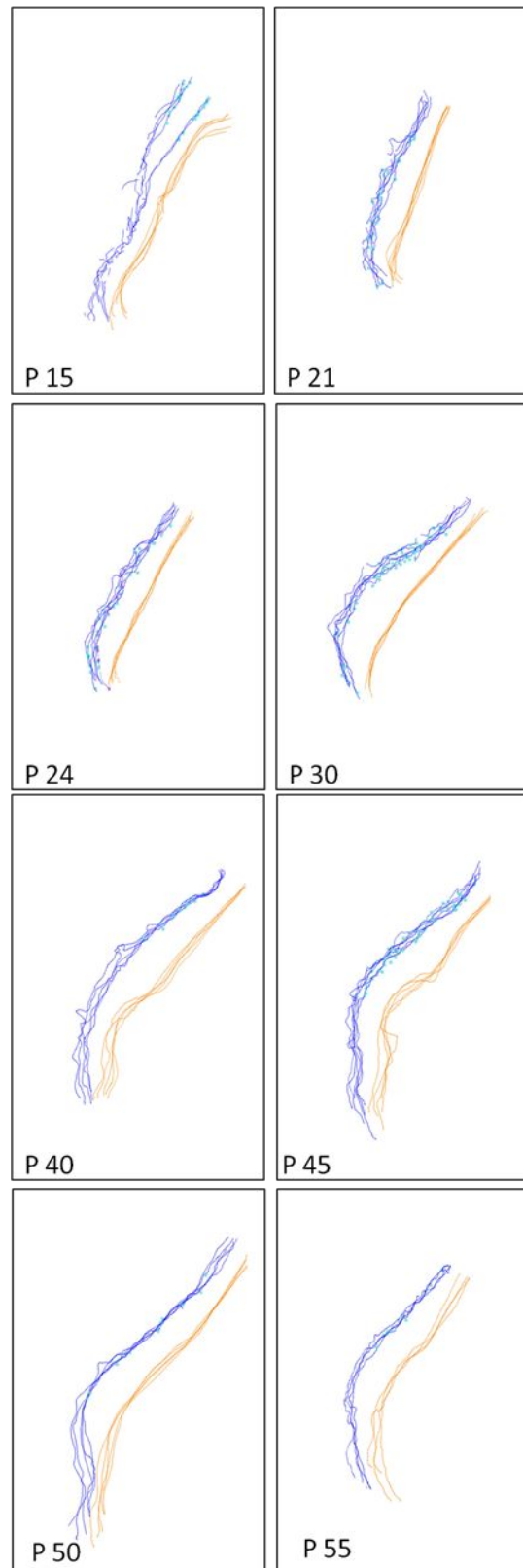
4. 研究成果

(1) 破骨細胞数



破骨細胞は生後 15 日齢から出現し 27 日齢で最大値を示した。その後、緩やかに減少し 50 日齢から再び上昇した。

(2) 歯槽骨の発生に伴う破骨細胞の局在
固有歯槽骨の発生における破骨細胞の出現と局在。破骨細胞は 15 日齢から歯槽骨壁の上部に出現した。その後、歯の萌出、歯根形成に伴って歯槽骨壁下方に移動した後、歯槽骨壁の全体に広がり、破骨細胞数は 27 日齢でピークに達した。



歯槽骨発生における破骨細胞の局在

30 日齢では歯槽骨中央部に多く出現し、その後、減少した。40 日齢では歯頸部付近に限局し、その後、歯根有細胞セメント質の形成と共に有細胞セメント質の反対側に出現した。本研究により歯槽骨発生における破骨細胞の出現パターンが客観的に明らかになった。

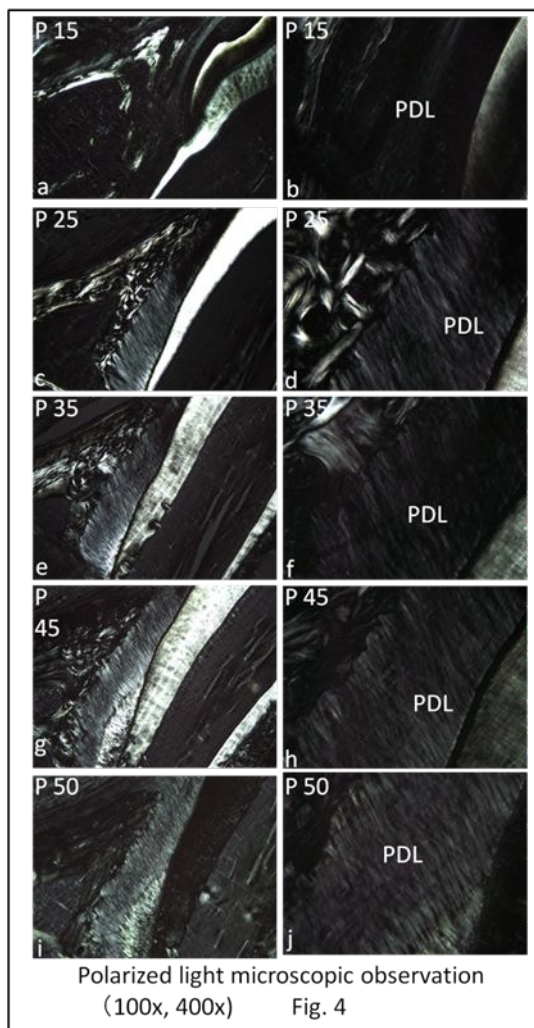
た。これまでの所見より、歯根膜線維面の形成に先立つ破骨細胞の出現は、発生的に歯根膜線維の埋入に必須の事象である可能性が示唆された。

(3) 非脱灰プラスチック切片偏光顕微鏡観察による歯根膜線維と歯槽骨の連続性の解析

偏光顕微鏡観察(右図)では、歯根膜線維の埋入は15日齢から始まり歯槽骨下部へと広がっていった。歯根膜線維の歯槽骨への埋入は日齢とともに密度が増加した。歯槽骨壁-歯根膜境界面の拡大像(右図、右列)では、歯根膜線維と歯槽骨線維に連続性は観察されなかった。また、歯槽骨発生時に破骨細胞に吸収された歯槽骨表面に直接歯根膜線維が連結しているような像を示していた。

これまでの結果と、本研究の結果から、歯周組織に存在する水チャネルを発現する細胞は異種組織に介在するこれまで報告のない特徴を備え、実験的歯根膜傷害モデルの解析から、水チャネルが歯牙-歯周靭帯-固有歯槽骨複合体の再生に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、本細胞は運動器における腱・靭帯組織における腱-骨境界部にも局在することが免疫組織化学的に明らかになった。

歯根膜においては、本細胞のシャープリー線維のセメント質・歯根膜へのシャープリー線維の埋入能力こそが歯周組織再生の要であり、また、これまで描写的に述べられるのみであった、歯槽骨の発生における破骨細部の出現が客観的に明らかになった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Hayashi-Sakai S, Numa-Kinjoh N, Sakamoto M, Sakai J, Matsuyama J, Mitomi T, Sano-Asahito T, Kinoshita-Kawano S:
Non-destructive evaluation of size and mineral density in exfoliated teeth with hypophosphatasia: a case report, J Clin Pediatr Dent(査読有), 40 ,(5 or 6), 2016

Matsuyama J, Kinoshita-Kawano S, Hayashi-Sakai S, Mitomi T, Sano-Asahito T: Severe impaction of the primary mandibular second molar accompanied by displacement of the permanent second premolar. Case Rep Dent , (査読有) Vol 2015 DOI : 10 . 1155/2015/582462

Mitomi T, Kawano Y, Kinoshita-Kawano S:
Effect of the antineoplastic agent

busulfan on rat molar root development.
Arch. Oral Biol,(査読有)
2014,59(1)pp47-59,
DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.09.009

Matsuyama J, Tanaka R, Iizawa F, Sano,T, Kinoshita-Kawano S, Hayashi-SakaiS, Mitomi T:
Clinical and radiographic findings and usefulness of computed tomographic assessment in two children with regional odontodysplasia. Case Rep Dent, (査読有) 2014,
DOI : 10.1155 /2014/764393

村山直子, 松山順子, 三富智恵, 坂井幸子, 河野承子, 佐野富子:一口量の違いが嚥下直前の食塊粒子 分布に及ぼす影響、日咀歯誌、(査読有) 24(1)、2014, pp.12-19

〔学会発表〕(計 3 件)

河野承子, 坂井幸子, 佐野富子, 三富智恵, 松山順子: 幼児期に化学療法を受けた心身障がい児の口腔管理 - 前歯部の完全脱臼を繰り返した症例. 第 31 回日本障害者歯科学会, 仙台国際センター(宮城県・仙台), 2014.11.15-16

三富智恵, 河野芳朗, 河野承子, 松山順子, 坂井幸子, 佐野富子: アルキル化抗腫瘍薬によるラット歯根形成障害 根尖部における経日的変化. 第 52 回日本小児歯科学会大会, きゅりあん(東京・品川), 2014.5.16-17

松山順子, 佐野富子, 坂井幸子, 三富智恵, 河野承子, 田中礼: Regional Odontodysplasia の臨床的ならびにエックス線学的所見. 第 52 回日本小児歯科学会大会, きゅりあん(東京・品川), 2014.5.16-17

〔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 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 承子(KAWANO, Shoko)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 1 0 3 9 7 1 2 7

(2)研究分担者

河野 芳朗(KAWANO, Yoshiro)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号: 6 0 3 0 3 1 2 9

三富 智恵(MITOMI, Tomoe)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 0 0 3 1 3 5 2 8

前田 健康(MAEDA, Takeyasu)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 4 0 1 8 3 9 4 1