

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670871

研究課題名(和文) Scleraxisの発現を指標とした歯根膜のメカニカルストレス応答の分子機構

研究課題名(英文) Scleraxis-mediated regulation of mechanical responses in the periodontal ligament

研究代表者

宿南 知佐 (Shukunami, Chisa)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：60303905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：実験的歯牙移動モデルを用いて、骨形成が促進される牽引側で、スクレラキシスとオステリクスの発現が上昇することが明らかになった。スクレラキシスの発現はTGF-betaシグナリングの活性化を介して、オステリクスの発現はBMPシグナリングの活性化を介して上昇する。スクレラキシスを過剰発現する歯根膜細胞では、骨分化誘導による石灰化が著明に抑制された。逆に、骨分化誘導条件下でスクレラキシスをノックダウンすると、骨形成のマーカーであるオステオカルシンの発現が促進された。従って、スクレラキシスは牽引側において、骨形成を促進するオステリクスと拮抗して、歯根膜の石灰化を抑制していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：During experimental tooth movement, Scleraxis (Scx) and Osterix (Osx) were upregulated on the tension side of the periodontal ligament (PDL). Scx and Osx were upregulated via activation of TGF-beta and BMP signaling, respectively. Overexpression of Scx resulted in significant inhibition of mineralization in cultured PDL cells under the osteoinductive conditions. Conversely, knockdown of Scx significantly upregulated the expression of Osteocalcin, a marker for bone formation in osteoinduced PDL cells. Thus, Scx and Osx antagonistically regulate tensile-force responsive remodeling of the PDL and alveolar bone.

研究分野：機能系基礎歯科学

キーワード：歯学 メカニカルストレス 歯根膜 Scleraxis トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯のセメント質と歯槽骨間に介在し2つの硬組織を連結する線維性結合組織である(図1)。本研究に先立って、研究代表者らは、歯根膜で basic helix-loop-helix 型の転写因子である *Scleraxis* (*Scx*) が発現し、その発現は、歯根形成に伴って誘導されることを見出した。また、生理的な状態で伸展している細胞や矯正力による力学的負荷に応答して牽引側で *Scx* の発現が上昇し、圧迫側でその発現が低下することも見出した。これらの結果は、*Scx* が伸長性のメカニカルストレス応答性の遺伝子であることを示している。*Scx* はメカニカルストレスによる負荷のかかる典型的な組織である腱・靭帯やその付着部の近傍の軟骨に発現し、これらの組織の細胞の分化成熟を制御していることが報告されている。歯根膜では、歯の萌出、咬合、及び矯正的な歯の移動などに伴うメカニカルストレスによって、様々な生体反応が引き起こされる。しかしながら、歯根膜細胞のメカノセンサーによって受容された機械的刺激がシグナル伝達系を活性化し、メカニカルストレス応答性遺伝子の発現を誘導する過程については未だ不明な点が多い。そこで、メカニカルストレスに応答する *Scx* の機能とその制御機構を明らかにすることにより、歯根膜のみならず生体において普遍的に機能しているメカニカルストレス制御機構の一端を解明することに寄与すると期待して本研究を提案するに至った。

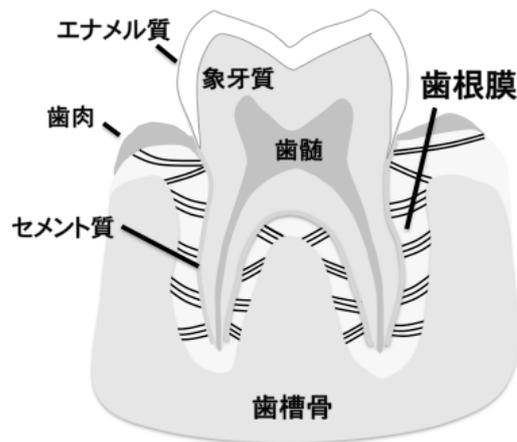


図1 歯の構造

歯の歯根部のセメント質は線維性の歯根膜によって歯槽骨に連結されている。歯冠部の象牙質はエナメル質に覆われている。

2. 研究の目的

歯の萌出、咬合、及び矯正的な歯の移動などに伴うメカニカルストレスが歯根膜に負荷されることによって、様々な生体反応が誘導される。本研究では、歯根膜細胞で張力に

応答する転写因子である *Scleraxis* (*Scx*) の発現制御機構を解析する。個体レベルでは、歯根膜細胞を GFP によって可視化できる *ScxGFP* トランスジェニックマウスの歯に矯正的力学負荷を与えて、非脱灰凍結切片の二重免疫染色によってメカニカルストレス応答性のシグナル伝達の活性化を解析する。また、*Scx* の組織特異的発現を制御する 10.8 kb の領域に存在するメカニカルストレス応答性シス領域を検索する。同定したメカニカルストレス応答性シス領域は、トランスジェニックマウスで個体レベルでの転写活性を検討する。さらに、*Scx* がメカニカルストレスに応答する歯根膜で果たす役割についても検討する。

3. 研究の方法

① 動物実験

歯根膜細胞の分離は、ウイスターラットを用いた。矯正的歯牙実験には、C57BL/6、研究代表者の研究室で樹立した *ScxGFP* トランスジェニックマウスを用いた。本研究で行われた全ての動物実験は、2013年まで研究代表者が所属していた京都大学内規に基づき、動物実験計画書を京都大学動物実験委員会に申請し、部局長による承認済みである。

② トランスジェニックマウスを用いた転写制御領域の解析

*hsp68* のミニマルプロモーターと *LacZ* レポーターの上流にマウス *Scx* 遺伝子の組織特異的転写を制御する 10.8 kb の領域を分割して挿入し、ベクターを構築した。次に、ベクターから制限酵素消化によって切り出したトランスジーンをマウス胚に注入した。胎生 13.5 日のトランスジェニックマウス胚の X-gal 染色によって、エンハンサー活性を解析した

③ Waldo 法による矯正的歯牙実験モデル

9 週齢の *ScxGFP* トランスジェニックマウスを用いて麻酔下にて実験をおこなった。図2に示すように、歯科矯正で用いられるエラスティックバンドを、1954年にWaldoらによって報告された方法に従って、上顎左側の第一臼歯と第二臼歯の間に挿入して、経時的にサンプリングを行った。無処置の上顎右側をコントロールとした。



図2 Waldo 法による歯の移動

- ④ **川本法による非脱灰切片の作製**  
 麻醉下にて 20%スクロースを含む 4%パラ  
 フォルムアルデヒド/PBS を灌流したマウ  
 スから組織を回収し、3 時間固定した。  
 固定した組織を、川本法の専用凍結包埋  
 剤 (SCEM) にて凍結包埋した。包埋したブ  
 ロックは、タングステンプレートで 4  $\mu$ m  
 の厚さで薄切し、非脱灰凍結切片を粘着  
 フィルムに貼り付けることによって試料  
 を作製した。
- ⑤ **免疫染色**  
 0.25 M の EDTA によって 1 時間脱灰した  
 切片を 3.2% のスキムミルクでブロッキ  
 ング後、一次抗体 (抗 GFP 抗体、抗 Ocn 抗  
 体、抗 Osx 抗体、抗  $\alpha$ SMA 抗体、抗ペリオ  
 スチン抗体、抗 CD31 抗体、抗 pSmad1/5  
 抗体、抗 pSmad3 抗体) を添加して 16 時間  
 インキュベートした。洗浄後、Alexa  
 Fluor 488 あるいは 594 を結合させた二  
 次抗体とインキュベートした。核は、DNA  
 結合性の蛍光色素であるジアミジノフェ  
 ニルインドールによって染色した。
- ⑥ **ヘマトキシリン・エオジン染色**  
 ギルのヘマトキシリンと 0.25% のエオジ  
 ンをもちいてヘマトキシリン・エオジン  
 染色を行った。
- ⑦ **アルカリフォスファターゼ染色**  
 基質である 2% NBT/BCIP を pH9.5 のトリ  
 スバッファー にて希釈し、37 $^{\circ}$ C で 5 分  
 間、非脱灰凍結切片をインキュベートし  
 た。
- ⑧ **アリザリンレッド染色**  
 歯根膜細胞は 95%メタノールで 20 分間固  
 定して、pH6.4 の 1%アリザリンレッド溶  
 液で染色した。
- ⑨ **歯根膜細胞の培養**  
 歯根膜細胞は、4 週齢のウイスターラッ  
 トから分離した。上顎と下顎の第 1~第  
 3 臼歯を抜歯後、PBS で洗浄し、歯根部  
 から歯根膜を剥がし、35-mm の培養皿に  
 貼り付けた。培養皿上の歯根膜は、  
 MF-start を添加して培養し、コンフルエ  
 ントに達したら、継代して 10% ウシ胎仔  
 血清を含む  $\alpha$ MEM にて培養した。
- ⑩ **デュアルルシフェラーゼレポーター  
 アッセイ**  
 培養歯根膜細胞に、ホタルルシフェラー  
 ゼレポーターと内部コントロールとして  
 ウミシイタケルシフェラーゼレポーター  
 である pGL4.74[hRluc/TK] をトランスフ  
 ェクションし、24~48 時間後にサンプル  
 を回収した。転写因子の転写活性化能の  
 解析では、これらのレポーターベクター  
 と発現ベクターを共発現させてサンプル

を回収した。ルシフェラーゼの活性は、  
 ルミノメーターを用いて測定した。

- ⑪ **骨分化誘導**  
 歯根膜細胞を、1  $\mu$ M デキサメサゾン、10  
 mM b-グリセロリン酸、50  $\mu$ g/ml アスコ  
 ルビン酸、200 ng/ml のリコンビナント  
 BMP6 と 10% ウシ胎仔血清を含む  $\alpha$ MEM に  
 て 3 日間培養した。さらに、リコンビナ  
 ント BMP6 のみを含まない培養液にて培  
 養し、骨分化を誘導した。
- ⑫ **RT-PCR とリアルタイム PCR**  
 歯根膜細胞から抽出した 200 ng のトー  
 タル RNA を鋳型にして、逆転写酵素を用い  
 て cDNA を合成して、RT-PCR とリアルタ  
 イム PCR に用いた。RT-PCR では TaKaRa Ex  
 Taq を用いて増幅を行った。リアルタ  
 イム PCR は SYBR Premix Ex Taq II を用い  
 て行った。mRNA の発現レベルは、18S rRNA  
 に対してノーマライズを行い、2- $\Delta\Delta$ CT 法  
 によって算出した。
- ⑬ **レンチウイルスによる過剰発現**  
 マウス Scx のコーディング領域をレンチ  
 ウイルスベクターに挿入し、発現ベク  
 ターを構築した。PEG-it virus  
 precipitation solution によって濃縮し、  
 1.0 multiplicity of infection のウイ  
 ルス液を実験に用いた。
- ⑭ **siRNA によるノックダウン**  
 Scx に対する 2 種類の siRNA オリゴ  
 (siScx-1, siScx-2) を用いてノックダ  
 ウンの実験を行った。コントロール実験に  
 は、siGENOME non-targeting siRNA Pool  
 number 1 を用いた。歯根膜細胞へは、  
 DharmaFECT1 トランスフェクション試薬  
 によってこれらの siRNA オリゴを導入し  
 た。

#### 4. 研究成果

- ① **歯根膜における Scx 遺伝子のメカニ  
 カルストレス応答性転写制御領域の  
 解析**  
 Scx の組織特異的発現を制御する 10.8 kb  
 の領域を分割した 4 種類の DNA フラグメ  
 ント (1.9 kb, 3.6 kb, 4.3 kb, 5.3 kb)  
 を pGL4.23[luc2/minP] ベクターにクロ  
 ニングし、マウス歯根膜細胞株である  
 PDL-L2 を用いて転写活性を測定した。ス  
 トッレチチャンバーを用いて、12%の牽引  
 ストレス負荷 6 時間後までの時点におい  
 て検討したが、いずれの DNA 配列でも牽  
 引ストレスによる転写活性の顕著な上昇  
 は認められなかった。  
 一方、hsp68 のミニマルプロモーター  
 と LacZ レポーターの上流にマウス Scx 遺  
 伝子の組織特異的転写を制御する 10.8  
 kb の領域を分割し構築したトランスジ

ンを用いた解析では、5.3 kb の領域に 10.8 kb と同様な組織特異性を示す領域が含まれていることが明らかになっている。

## ② Waldo 法による矯正の歯牙実験モデルを用いた骨・靭帯関連分子の免疫組織学的解析

*ScxGFP*トランスジェニックマウスでの矯正の歯牙実験モデルにおいて、エラスティックバンド挿入後、1時間から48時間までの歯根膜での *Scx* の発現変化を解析した結果、牽引側では *ScxGFP* を高いレベルで発現する細胞が3時間以降で有意に増加したが、圧迫側では6時間以降で有意に減少した。エラスティックバンド挿入後48時間の牽引側では、*ScxGFP* の高発現細胞の増加と共に、骨芽細胞の分化成熟に必須の転写因子である *Osterix* (*Osx*)陽性細胞も増加していた。

## ③ Waldo 法による矯正の歯牙実験モデルを用いたシグナル伝達系活性化の解析

牽引側の歯根膜では、エラスティックバンド挿入後3時間以降で *TGF-β*シグナリング伝達分子である *pSmad3* を発現する細胞の有意な増加が観察されたが、圧迫側では3時間以降で *pSmad3* がほとんど検出されなくなり、*Scx* の発現と *TGF-β*シグナリングとの関連性が示唆された。一方、エラスティックバンド挿入後48時間の牽引側では、*BMP* シグナリング伝達分子である *pSmad1/5* を発現する細胞の有意な増加が観察され、歯根膜において張力応答性に骨形成を促進する環境が誘導されていることが明らかになった。

## ④ レンチウイルスによる過剰発現と siRNA によるノックダウンを利用した歯根膜細胞における *Scx* の役割の解析

骨分化誘導下で培養した歯根膜細胞では、*Scx*の過剰発現により石灰化が抑制され、*Osteocalcin* (*Ocn*)の発現も低下したが、*Scx* をノックダウンした場合は *Ocn* の発現が上昇した。また、*Scx* の過剰発現及びノックダウンは、骨分化誘導下の培養歯根膜細胞において *Osx* の発現レベルには有意な影響を与えなかった。

[附記] ②～④の成果をまとめて、*Development* 誌において論文発表を行った (Takimoto et al., 2015)。メカニカルストレス応答性転写制御領域については、解析を進めることによって、生体においてメカニカルストレスを制御する機構がさらに解明されることが期待される。

## 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3件)

- ① Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C. Scleraxis and Osterix Antagonistically Regulate Tensile Force-Responsive Remodeling of the Periodontal Ligament and Alveolar Bone. *Development* 142:787-96, 2015. doi: 10.1242/dev.116228. 査読有り
- ② Alberton P, Dex S, Popov C, Shukunami C, Schieker M, Docheva D. Loss of Tenomodulin Results in Reduced Self-Renewal and Augmented Senescence of Tendon Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Dev* 24:597-609, 2015. doi: 10.1089/scd.2014.0314. 査読有り
- ③ Austin B, Yoshimoto Y, Shukunami C, \*Lincoln J. Sox9- and Scleraxis-Cre Lineage Fate Mapping in Aortic and Mitral Valve Structures. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 1:163-176, 2014. doi:10.3390/jcdd1020163 査読有り

[学会発表] (計8件)

- ① 宿南知佐：腱・靭帯付着部の形成機構、第28回日本軟骨代謝学会(招待講演)、2015.3.7. 東京医科歯科大学(東京都文京区)
- ② 吉本由紀、宿南知佐：歯周靭帯形成を解析するための *in vivo* モデルの構築、第56回歯科基礎医学会学術大会総会、2014.9.27. 福岡国際会議場(福岡市)
- ③ Chisa Shukunami : Molecular mechanisms regulating tendon and ligament formation、第28回日本軟骨代謝学会(招待講演)、2014.8.23. 富士教育研究所(裾野市)
- ④ 宿南知佐：腱と骨を連結する分子機構、第32回日本骨代謝学会学術総会(招待講演)、2014.7.26. 大阪国際会議場(大阪市)
- ⑤ Yuki Sugimoto, Aki Takimoto, Yuji Hiraki, Chisa Shukunami : Establishment of an *in vivo* model for analysis of periodontal ligament formation、第47回広島大学歯学会総会、2014.6.21. 広島大学歯学部(広島市)
- ⑥ 宿南知佐：筋骨格系を連結する腱・靭帯

形成の分子機構、第28回骨代謝セミナー（招待講演）、2014.6.6. ホテル椿山荘 東京（東京都文京区）

- ⑦ 宿南知佐：腱・靭帯と硬組織の連結を制御する分子機構、第28回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）、2013.10.18. 幕張メッセ（千葉市）
- ⑧ 川津正慶、岩崎将也、清流正弘、池田悦子、滝本晶、宿南知佐、山本照子：歯根膜細胞における進展刺激に応答した Scleraxis 発現調節メカニズムの解析、第72回日本矯正歯科学会大会、2013.10.9. キッセイ文化ホール・松本市総合体育館（松本市）

〔その他〕

ホームページ等

研究代表者の研究室のホームページ

[http://www.hiroshima-u.ac.jp/dent/kenkyuusitu/p\\_npehnp.html](http://www.hiroshima-u.ac.jp/dent/kenkyuusitu/p_npehnp.html)

研究分担者の研究室のホームページ

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te01/index-j.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宿南 知佐 (SHUKUNAMI CHISA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：60303905

### (2) 研究分担者

山本 照子 (YAMAMOTO TERUKO)

東北大学・歯学研究科（研究院）・教授

研究者番号：0012750

滝本 晶 (TAKIMOTO AKI)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定助教

研究者番号：00378902

### (3) 研究協力者

吉本 由紀 (YOSHIMOTO YUKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：40735304