

平成30年6月19日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293407

研究課題名(和文) 歯根膜の血行性幹細胞供給とその分化過程を追跡するイメージングシステムの開発

研究課題名(英文) Investigation of Bone Marrow-derived Stem Cells in Periodontal Ligament

研究代表者

加来 賢 (KAKU, Masaru)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30547542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜は歯と骨を結合する組織であり、その恒常性を担うのは豊富な組織幹細胞の存在である。歯根膜の細胞は発生学的には主として神経堤に由来することが知られているが、その他の起源については明らかでない。本研究では骨髄に由来し、血行性に供給される幹細胞の存在を明らかにするために、蛍光色素によって標識された骨髄間質細胞を免疫不全ラットの大腿骨に移植したところ、移植4週後の歯根膜組織において骨髄由来細胞が観察された。さらに歯の再植により、骨髄由来細胞は増加した。本研究により歯根膜の組織幹細胞は発生期から維持されているものだけではなく、必要に応じて骨髄から供給される血行性幹細胞が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The periodontal ligament (PDL) plays important roles in tooth function. The PDL harbors a remarkable reserve of multipotent stem cells, which maintain various types of cells. However, the sources of these stem cells, other than their developmental origin, are not well understood. In the present study, to elucidate the recruitment of bone marrow (BM)-derived stem cells in the PDL, green fluorescent protein (GFP)-expressing BM-derived cells were transplanted into the femoral BM of immunodeficient rats. Four weeks after cell transplantation, GFP-positive cells were detected in the PDL. To evaluate the functional significance of these BM-derived cells to the PDL, tooth replantation was performed. Seven days after tooth replantation, the number of GFP-positive cells significantly increased in PDL. These results indicate that the stem cells and their progeny in PDL are not only derived from their developmental origin but are also supplied from the BM via the blood as the need arises.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯根膜 血行性幹細胞 神経堤 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯と歯槽骨の間に介在する線維性の結合組織であり、咬合力の感知、緩圧機構を有するだけでなく、歯の矯正移動に見られるように力に鋭敏に反応する。歯根膜組織の特徴としてその極めて早い代謝回転が挙げられるが、これを可能としているのは歯根膜細胞の極めて活発な増殖能と、広範な多分化能を有する幹細胞の存在であると考えられている。歯根膜は発生学的には一部の上皮由来細胞を含むものの、主として神経堤由来の細胞によって構成されていることが知られているが、その数は加齢とともに減少してゆく(Kaku. Arch Oral Biol. 2012)。この事実は歯根膜がリモデリングの過程において、発生由来とは異なる細胞群の供給を受けている可能性を示唆している。

近年の研究から、血行性に循環している骨髄由来間葉系幹細胞である“circulating MSC”の存在や(Tintut. Circulation. 2003)、血管内皮細胞に由来する幹細胞である pericyte の存在(da Silva et al, 2006)が明らかとなりつつある。とくに歯根膜においては間葉系幹細胞が血管近傍に多く観察されることから(Seo. Lancet. 2004, Kaku. Arch Oral Biol. 2012)、これまでに同定された歯根膜中の幹細胞の一部は血行性に供給された幹細胞である可能性が強く推察される。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光タンパクである Green Fluorescence Protein (GFP)によって標識された骨髄間質細胞を免疫不全ラットの大腿骨骨髄に移植し、一定時間経過後および意図的再植後の歯根膜組織における GFP 陽性細胞を検出することにより、歯根膜組織における血行性細胞の存在と、遠隔細胞の遊走に関わる SDF-1/CXCR4 axis による制御機構を明らかにすることを目的とする

3. 研究の方法

歯根膜組織における骨髄由来間葉系幹細胞の存在と組織維持への寄与を明らかにするために、4週齢の(SD-Tg (CAG-EGFP)ラットの大腿骨骨髄から GFP で標識された骨髄間質細胞(BMSC: Bone marrow stromal cell)を調整し、4週齢の免疫不全ラット(F344/NJcl-rnu)の両側大腿骨骨髄に移植した。移植4週後にラットを屠殺し、歯周組織を含む上顎骨を採取した。

また GFP 陽性細胞の移植4週後に両側の上顎第1臼歯を抜歯、即時再植し、1,3,7,14日後に屠殺、組織標本および全血の採取を行った。

採取した組織からは脱灰パラフィン包埋組織標本を作製し、GFP および幹細胞マーカー(CD29, SSEA4, aSMA)を免疫組織学的手法にて検出した。

全血からは density-gradient cell separation tube (BD Vacutainer CPT Cell Preparation Tube with Sodium Citrate; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を用いて単核細胞と血清の調整を行った。分離した単核細胞は 10 cm 培養皿で alpha-MEM (10% FBS, 1% antibiotics)中にて 2

週間培養し、Colony Forming Assay (CFU)を行った。また血清中の SDF-1 の濃度を mouse CXCL12/SDF-1 alpha Quantikine ELISA Kit (MCX120; R&D Systems, Minneapolis, MN)にて行った。

7週齢雄性 C57BL/6 マウス骨髄から BMSC と歯根膜細胞を採取した。歯根膜細胞は、抜歯した上下顎臼歯から Liberase DL (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)にて細胞を遊離させ、遠心分離(1,000 rpm, 5 min)にて回収、alpha-MEM (10% FBS, 1% antibiotics)中にて維持した。Transwell チャンバー(8-μm-pore PET membrane, Coring, Tewksbury, MA)上に BMSC を播種し、下部チャンバーには歯根膜細胞培養上清を添加した。一部の BMSC は播種前に CXCR4 阻害剤である AMD3100 (1.0 μg/ml, Calbiochem, San Diego, CA)にて処理し、チャンバー下部へと遊走した細胞を固定、DAPI にて核染色を行い、遊走細胞数の計測を行った。

4. 研究成果

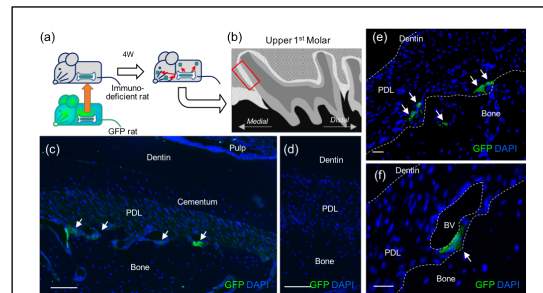


Fig.1 歯根膜組織における大腿骨由来細胞の存在。(a)GFP ラットの骨髄間質細胞を免疫不全ラットの骨髄に移植し 4 週間後の歯根膜組織における GFP 陽性細胞の解析を行う。(b)観察領域は上顎第 1 臼歯近心根近心歯根膜とした。(c)GFP 陽性細胞移植 4 週間後には歯根膜の骨表面に多数の GFP 陽性細胞が観察された。(d)非移植群では GFP 陽性細胞は観察されない。(e, f)GFP 陽性細胞は骨表面と血管近傍に多く観察された。Bar: 100 μm (c, d), Bar: 20 μm (e, f).

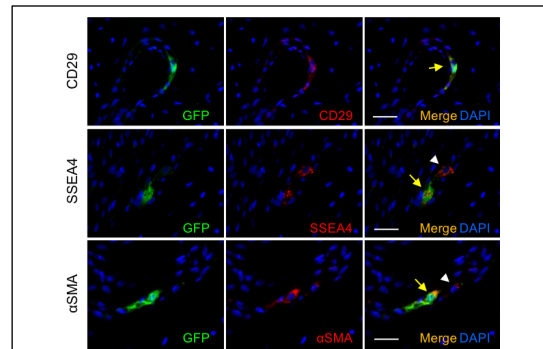
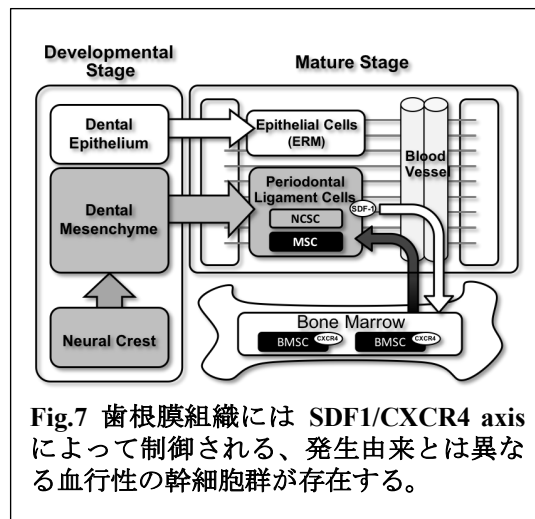
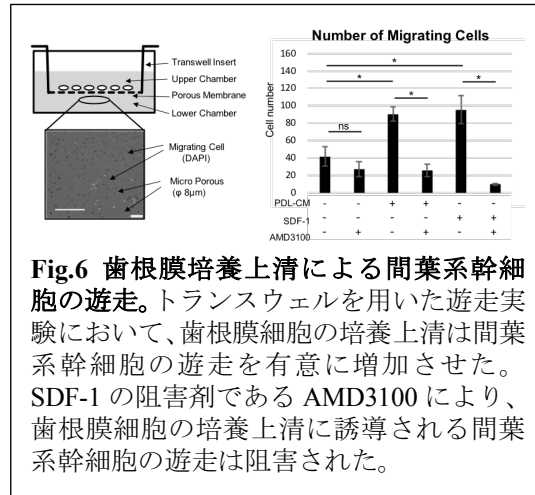
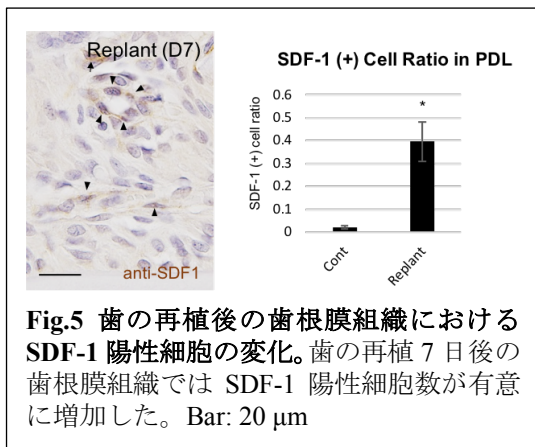
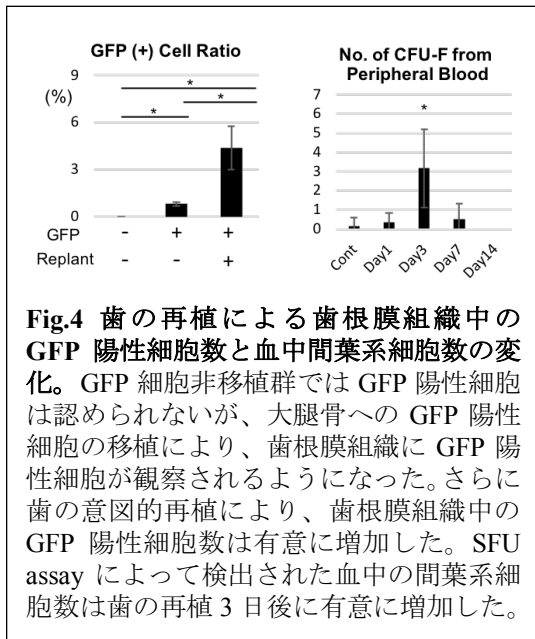
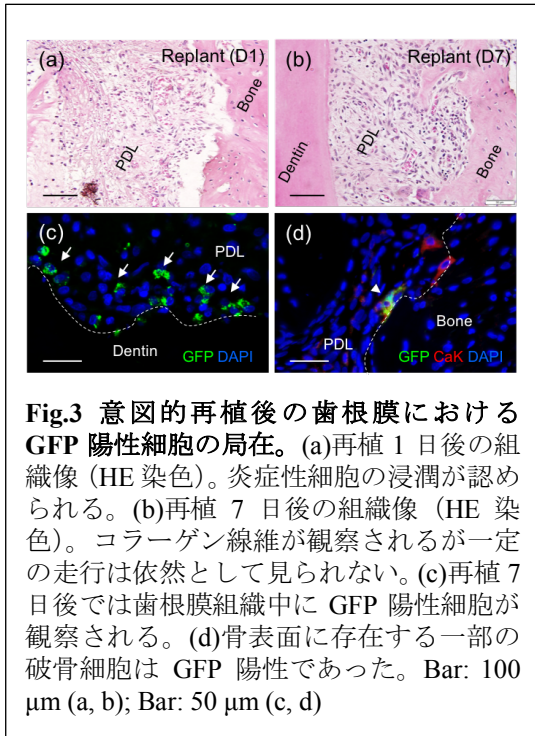


Fig.2 歯根膜中の骨髄由来細胞における幹細胞マーカーの発現。歯根膜組織中の GFP 陽性/骨髄由来細胞は CD29, SSEA4, aSMA 等の幹細胞マーカーについても陽性であった。Bar: 50 μm



以上の結果より、歯根膜には発生由来とは異なる、血行性に供給される骨髄由来の幹細胞群が存在すること、またその誘導は SDF-1/CXCR4 axis によって制御されていることが示唆された(Fig.7)。

本研究成果は歯根膜の維持に重要な新たな幹細胞の供給メカニズムを明らかにする基礎的側面だけでなく、有効な歯周組織再生医療を提供できる可能性を有している。歯周組織の大規模な再生には依然として人工材料や自己組織の移植が行われている。また自己組織由来の幹細胞を体外にて培養し、患部へ戻す方法も試みられている。本研究で明らかにした、血行性の幹細胞供給を人為的に制御することが可能となれば、大規模な外科的手術や、リスクの高い体外での細胞培養を行わずに、幹細胞を患部へ集積することが可能となる。したがって、歯根膜組織における骨髄由来細胞の血行性誘導機構のより詳細な解析とその制御方法の開発は、新たなコンセプトに基づいた歯周組織再生療法を実現する可能性を有している。

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 16 件)

1. Kuroshima S, Kaku M, Ishimoto T, Sasaki M, Nakano T, Sawase T. A paradigm shift for bone quality in dentistry: A literature review. *J Prosthodont Res.* 2017 Oct;61(4):353-362. (査読有)
2. Tabeta K, Du X, Arimatsu K, Yokoji M, Takahashi N, Amizuka N, Hasegawa T, Crozat K, Maekawa T, Miyauchi S, Matsuda Y, Ida T, Kaku M, Hoebe K, Ohno K, Yoshie H, Yamazaki K, Moresco EMY, Beutler B. An ENU-induced splice site mutation of mouse Col1a1 causing recessive osteogenesis imperfecta and revealing a novel splicing rescue. *Sci Rep.* 2017 Sep 15;7(1):11717. (査読有)
3. Kaku M, Kitami M, Rosales Rocabado JM, Ida T, Akiba Y, Uoshima K. Recruitment of bone marrow-derived cells to the periodontal ligament via the stromal cell-derived factor-1/C-X-C chemokine receptor type 4 axis. *J Periodontal Res.* 2017 Aug;52(4):686-694. (査読有)
4. Kaku M, Komatsu Y. Functional Diversity of Ciliary Proteins in Bone Development and Disease. *Curr Osteoporos Rep.* 2017 Apr;15(2):96-102. (査読有)
5. Kuroshima S, Kaku M, Matsuura T, Atsuta I, Ayukawa Y, Sawase T. Medication-related osteonecrosis of the jaw; what should we do as prosthodontists? *J Prosthodont Res.* 2016 Oct;60(4):229-230. (査読有)
6. Kaku M, Rosales Rocabado JM, Kitami M, Ida T, Akiba Y, Yamauchi M, Uoshima K. Mechanical Loading Stimulates Expression of Collagen Cross-Linking Associated Enzymes in Periodontal Ligament. *J Cell Physiol.* 2016 Apr;231(4):926-33. (査読有)
7. Noda K, Kitami M, Kitami K, Kaku M, Komatsu Y. Canonical and noncanonical intraflagellar transport regulates craniofacial skeletal development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 May 10;113(19):E2589-97. (査読有)
8. Kaku M. Prosthodontics: A multidisciplinary field in dentistry. *J Prosthodont Res.* 2016 Jul;60(3):143-4. (査読有)
9. Kitami M, Kaku M, Rocabado JM, Ida T, Akiba N, Uoshima K. Prolonged Survival of Transplanted Osteoblastic Cells Does Not Directly Accelerate the Healing of Calvarial Bone Defects. *J Cell Physiol.* 2016 Sep;231(9):1974-82. (査読有)
10. Ohyama Y, Lin JH, Govitvattana N, Lin IP, Venkitapathi S, Alamoudi A, Husein D, An C, Hotta H, Kaku M, Mochida Y. FAM20A binds to and regulates FAM20C localization. *Sci Rep.* 2016 Jun 13;6:27784. (査読有)
11. Takano R, Nagasawa M, Kitami M, Rosales Rocabado JM, Kaku M, Stegaroiu R, Uoshima K. Correlation Between Stress Distributions and Biological Reactions in Bone Surrounding Implants That Support Cantilevers in Supraocclusal Contact in Rats. *Implant Dent.* 2016 Apr;25(2):204-13. (査読有)
12. Sato R, Fukuoka H, Yokohama-Tamaki T, Kaku M, Shibata S. Immunohistochemical localization of tenascin-C in rat periodontal ligament with reference to alveolar bone remodeling. *Anat Sci Int.* 2016 Mar;91(2):196-206. (査読有)
13. Kaku M, Akiba Y, Akiyama K, Akita D, Nishimura M. Cell-based bone regeneration for alveolar ridge augmentation--cell source, endogenous cell recruitment and immunomodulatory function. *J Prosthodont Res.* 2015 Apr;59(2):96-112. (査読有)
14. Akiba Y, Tomizuka K, Kaku M, Kawasaki M, Nagasawa M, Takano R, Uoshima K. Analysis of Patients Visiting Niigata University Medical and Dental Hospital with Chief Complaints of Metal Allergy and/or Focal Infection in the Previous 8 Years. *The Indonesian J Dent Res.* 2015 Jan;1(2):109-15. (査読有)
15. Kaku M, Yamauchi M. Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. *J Prosthodont Res.* 2014 Oct;58(4):193-207. (査読有)
16. Rosales-Rocabado JM, Kaku M, Kitami M, Akiba Y, Uoshima K. Osteoblastic differentiation and mineralization ability of periosteum-derived cells compared with bone marrow and calvaria-derived cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Apr;72(4):694.e1-9. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

1. Ida T, Kaku M, Kitami M, JM Rosales, Uoshima K: Effect of Matrix Collagen Crosslinks on Osteoblast and Osteoclast activities. The 9th Scientific Meeting of the AAO, Sapporo, July 4, 2014.
2. 北見公平, 加来 賢, 魚島勝美, 齋藤功: 矯正歯の移動における歯根膜中のコラーゲン修飾酵素の発現. 第73回大会日本矯正歯科学会大会, 幕張, 2014年10月21日
3. 井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, 魚島勝美: コラーゲン・クロスリンクの変化が骨芽細胞、破骨細胞に及ぼす影響. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡, 2014年9月26日
4. 加来 賢, 北見恩美, JM Rosales, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美: 歯根膜には大腿

- 骨髄由来細胞が存在する。第123回日本補綴歯科学会，仙台，2014年5月24日
5. 秋葉陽介，江口香織，秋葉奈美，北見恩美，Rocabado JMR，加来 賢，魚島勝美：多機能性エピジェネティクス化合物による骨増成法への多面的アプローチ。第123回日本補綴歯科学会学術大会，仙台，2014年5月24日
 6. 井田貴子，加来 賢，北見恩美，JM Rosales，加来咲子，魚島勝美：コラーゲン・クロスリンクが骨芽細胞分化、破骨細胞分化に及ぼす影響。第123回日本補綴歯科学会，仙台，2014年5月24日
 7. 加来 賢：幹細胞を用いた組織再生法の新機軸ー内在性幹細胞の動員ーイブニングセッション。第123回日本補綴歯科学会学術大会，仙台，2014年5月24日
 8. Ida T, Kaku M, Kitami M, JM Rosales, Uoshima K: Effect of differentially crosslinked collagenous matrix on osteoblast and osteoclast activities. 93th General Session & Exhibition of the IADR, Boston, March 14, 2015.
 9. 井田貴子，加来 賢，北見恩美，JM Rosales Rocabado，魚島勝美：骨強度に重要なコラーゲン架橋の変化は骨代謝に影響を及ぼす，第48回新潟歯学会 総会，新潟，2015年4月18日
 10. 井田貴子，加来 賢，北見恩美，JM Rosales Rocabado，魚島勝美：コラーゲン・クロスリンクの変化は骨代謝に影響を及ぼす，第47回日本結合組織学会学術大会，東京，2015年5月15日
 11. 井田貴子，加来 賢，北見恩美，JM Rosales Rocabado，魚島勝美：コラーゲン架橋の変化は骨強度のみならず骨代謝に影響を及ぼす，第124回日本補綴歯科学会学術大会，大宮，2015年5月30日
 12. 加来 賢：硬軟組織難治性疾患に対する組織再建と研究戦略，硬軟組織の難治性疾患に対する病因解明と治療方法開発に向けての取り組み，第124回日本補綴歯科学会学術大会，大宮，2015年5月30日
 13. 加来 賢：コラーゲン生合成における翻訳修飾とその分子機構，第11回北里大学農医連携シンポジウム，食と健康のつながり ～生命を支える食のはたらき～，東京，2015年11月29日
 14. Kaku M., Mechano-regulations of Collagen Biosynthesis and Related Cell Behaviors in Periodontal Ligament. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Lombok, Indonesia, Jan 10, 2016
 15. Ida T, Kaku M, Rosales Rocabado JM, Uoshima K., Osteoblastic Differentiation of BMSCs on Different Degree of Enzymatic Collagen Crosslinks. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Lombok, Indonesia, Jan 10, 2016
 16. 加来 賢，北見恩美，JM Rosales Rocabado，井田貴子，秋葉陽介，魚島勝美：SDF-1/CXCR4 による歯根膜への骨髄由来細胞の誘導，第125回日本補綴歯科学会学術大会，金沢，2016年7月8日
 17. JM Rosales Rocabado，加来 賢，野崎浩佑，井田貴子，魚島勝美：Fracture Strength of Femoral Bone Increased by Gain of Cortical Bone Volume on Ovariectomized Rats，第125回日本補綴歯科学会学術大会，金沢，2016年7月8日
 18. JM Rosales Rocabado, Kaku M, Nozaki K, Ida T, Uoshima K: Influence of bone morphology over the bone mechanical properties of Osteoporotic rat models. 30th ASBMR 2016 Annual Meeting, Atlanta, Sep 19, 2016.
 19. 北見公平，北見恩美，加来 賢，小松義広，齋藤 功：がん抑制遺伝子BRCA1は顎顔面骨の形態形成に必須である，平成28年度新潟歯学会第2回例会，新潟，2016年11月5日
 20. Kaku M, Terajima M, Yamauchi. Komatsu Y., The Role of Ciliary Protein for Bone Homeostasis in Neural Crest Cells. Gordon Research Conference, Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration, Lucca, Italy, Feb 11-16, 2018.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
加来 賢 (KAKU Masaru)
 新潟大学大学院・医歯学系・准教授
 研究者番号：30547542
- (2)研究分担者
魚島勝美 (UOSHIMA Katsumi)
 新潟大学大学院・医歯学系・教授
 研究者番号：50213400
- 泉 健次 (IZUMI Kenji)
 新潟大学大学院・医歯学系・教授
 研究者番号：80242436