

## 共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：東北大学・大学院歯学研究科

職名：教授

氏名：山本 照子

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

### 記

1. 研究課題：

矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析

2. 再生医科学研究所共同研究者：

開 祐司、宿南知佐、滝本 晶

3. 研究期間： 短期研究課題・■長期研究課題

(平成23年4月1日～平成24年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

これまでに、正常マウスを用いて、正確で再現性に優れたマウスの歯の移動モデルを確立している。この実験モデルは、6週齢マウスを用いて、NiTiワイヤーにより作成した装置を上顎切歯に装着し、初期荷重10gにて第一臼歯の舌側方向への移動を行なうもので、歯根膜、歯槽骨の改造現象を分子・組織形態学的に解析することが出来る。同時に、本年は以下のように、*Scleraxis* (*Scx*)発現領域でGFPが検出されるレポーターマウスである *ScxEGFP Tg* を用いて生理的な歯周組織での解析を行った。すなわち、*ScxEGFP Tg* を用いて、2、4、6、8、及び12週齢の歯周組織における *Scx* と *Osteopontin*、*MMP13* の局在を蛍光免疫染色によって解析した。また、近接切片を用いて、TRAP染色による破骨細胞の局在解析とトルイジンブルー染色及びHE染色による組織染色を行った。更に、*Sox9Cre* の knock-in マウスとレポーターマウスである *Ai14* マウスを交配して *Sox9Cre;Ai14* を作成し、歯と歯周組織における *Sox9* 陽性細胞の系譜を解析した。非脱灰凍結切片は、粘着フィルムを用いた川本法によって作製した。石灰化組織中の蛋白質の抗原部位は、切片を0.25 M EDTA/PBSに浸漬し、1時間の脱灰処理を行って露出させた。

蛍光免疫染色による解析の結果、*ScxGFP Tg* の臼歯とその周辺組織では、歯の萌出前である2週齢において、歯根膜線維芽細胞の一部でGFPの発現が検出された。一方、*Sox9Cre;Ai14* では、2週齢において、歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞、エナメル芽細胞、及び歯髓細胞で蛍光蛋白が検出されたことから、*Sox9* 発現細胞は、歯や歯周組織を構成するほぼ全ての細胞に分化していることが明らかとなった。*ScxGFP Tg* では、歯の萌出に伴ってGFPの発現が上昇し、4、6、8、及び12週齢では、大部分の歯根膜線維芽細胞及び象牙芽細胞において、明瞭なGFPの発現が検出された。象牙芽細胞におけるGFPの発現は、歯冠部では低く、歯根部では高い傾向が認められた。

4週齢のICRマウスで *in situ hybridization* によって *Scx* の発現を解析した場合も、同様の結果が得られた。セメント細胞及び歯槽骨中の骨細胞においては、低いレベルの GFP の発現が検出された。一方、骨芽細胞や *Tnmd* を発現するセメント芽細胞では、GFP の発現はほとんど検出されなかった。MMP13 の局在及び TRAP 陽性の破骨細胞は、共に、各歯根の遠心側の歯槽骨表面に多い傾向が認められ、生理的な歯の移動や挺出による歯根膜の変化が反映されていると考えられた。第一臼歯の近心側歯根では、近心側の歯槽骨表面に MMP13 の局在及び TRAP 陽性の破骨細胞が多かった。*ScxGFP* Tg の歯根膜では、今回解析した全ての週齢の臼歯において、根尖部付近における GFP の発現レベルが低い傾向が認められた。第一臼歯の最も近心の歯根の歯根膜では、4、6、及び8週齢において、GFP の発現が低い傾向が認められたが、12週齢になると、比較的高いレベルで GFP が発現していた。この部位は、臼歯の最も近心側であるため、生理的な力学負荷のかかり方が不安定であると考えられる。第二臼歯の歯根膜では、TRAP 陽性の破骨細胞や MMP13 が局在する歯槽骨表面に結合した領域において、GFP の高い発現が検出された。すなわち、生理的な状態においては、*Scx* の発現は、吸収面の歯根膜で高い傾向が認められた。従って、歯に矯正力のような力学的負荷を加えた場合、歯根膜における *Scx* の発現レベルは、破骨細胞の出現によって歯槽骨の吸収が起こる圧迫側で高く、骨形成が起こる牽引側で低くなることが予想された。

次に Nickel Titanium (NiTi) ワイヤを用いた矯正学的な歯の移動実験と elastic ゴムを用いた Waldo 法における、歯周組織での *Scx* 局在を蛍光免疫染色によって解析した。ともに歯根膜の圧迫側よりも、主に牽引側で強い GFP の発現が見られた。特に Waldo 法を行って 24h 後、矢状断切片において、第一臼歯の遠心根で顕著な差が見られた。牽引側では歯根膜細胞の伸展が見られ GFP の強い発現が見られたのに対し、圧迫側では歯根膜細胞の圧縮が見られた。

更にストレス直後 (0min, 15min, 1h, 3h) からの圧迫側と牽引側における GFP の発現レベルを経時的に比較検討したところ、3h 以降でその差が明らかとなった。すなわち、メカニカルストレス下においては、装置を付けていない生理的な状態とは異なり、骨添加の起こる牽引側で *Scx* の高い発現が見られた。また TGF- $\beta$  系列のシグナル分子である Smad2/3 分子のリン酸化が *Scx* の発現上昇に先立って認められた。従って、*Scx* はメカニカルストレスに応答性の遺伝子で、生理的及び矯正的な歯の移動において歯周組織のリモデリングに関与していると考えられる。

現在、*In vitro* において、*Scx* の TGF- $\beta$  依存性を解析するためにラットの抜去歯より分離・培養した歯根膜細胞に TGF- $\beta$  2 を添加し、*Scx* の発現量を Northern blot などを用いて解析中である。また、*Scx* の遺伝子座に *Cre-recombinase* を knock-in した *ScxCre KI* マウスを作製し、歯や歯周組織の発生、成長過程における *Scx* 陽性細胞の系譜を追跡する実験も進めている。

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト (掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可)、学会発表等

### 1) 第30回日本骨代謝学会学術集会 (発表予定)

日時: 2012年7月19日 (木) ~21日 (土)

演題：歯根膜におけるScleraxisの発現とその制御

Regulation of Scleraxis expression in the periodontal ligament

発表者：滝本 晶 他

2) 第13回運動器科学研究会（発表予定）

日時：2012年9月14日（金）～15日（土）

演題：矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析（仮）

発表者：川津 正慶 他