

## 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24年4月1日～平成25年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

本研究では *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 *ScxGFPTg* を用いて生理的な歯周組織での解析を行った。本年度は、主に *Scx* と *Osterix (Osx)* の発現局在に着目し、これらの転写因子が生理的なメカニカルストレスの影響下でどのような発現パターンを示すのかについて詳細に解析した。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、*ScxGFPTg* 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。*ScxGFPTg* 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。野生型マウスで *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。骨芽細胞、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が、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。*ScxGFPTg* の歯根膜における GFP の発現は、全ての週齢の臼歯において、根尖部付近では低く、歯頸部付近では高い傾向が認められた。GFP と *Osx* の蛍光二重免疫染色の結果、歯根膜の一部では、*Osx* は *Scx* と相補的な発現パターンを示すことが明らかとなった。すなわち、個々の歯根膜細胞において、根尖部では GFP が低く *Osx* が高い発現を認めたが、歯頸部では GFP が高く *Osx* が低い発現様式となっていた。詳細な解析の結果、*ScxGFPTg* の歯根膜における GFP の発現レベルは、細長く伸展した形態の細胞で高く、圧縮された形態の細胞では低いことが明らかとなった。

次に矯正的な歯の移動モデルである Waldo 法を使って、歯根膜に牽引と圧迫のメカニカルストレスを加えることにより、歯周組織での *Scx* の発現を解析した。この方法では、マウスの上顎左側の第一臼歯と第二臼歯の間に elastic band を挿入し、歯根膜に牽引領域および圧迫領域を生じた。その結果、歯根膜の圧迫側よりも、牽引側で高い GFP の発現が見られた。特に Waldo 法を開始して 48 時間後、水平断切片において、第一臼歯の口蓋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 を高いレベルで発現する細胞が増加したのに対し、圧迫側では時間の経過とともに歯根膜細胞の圧縮が見られ、GFP の発現は低下した。従って、*Scx* の発現は、牽引力による歯根膜細胞の伸展により上昇することが明らかとなった。また、牽引側の歯根膜では、TGF- $\beta$  系列のシグナル分子である *Smad3* のリン酸化が *Scx* の発現上昇に先立って認められた。さらに歯根膜細胞だけでなく骨芽細胞層やセメント芽細胞層においても *Smad3* のリン酸化が認められた。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。

歯根膜細胞における *Scx* の発現と、メカニカルストレスの関連性を詳しく調べるために培養歯根膜細胞を使って、まず歯根膜細胞における *Scx* の発現を調べた。歯根膜細胞は、抜去歯に付いてくる歯根膜組織から、アウトグロースさせることで採取することができる。この細胞における *Scx* の発現をノーザンブロット法により解析すると、腱細胞と同等のレベルで *Scx* を発現していることが明らかとなった。

さらに、*Scx* の発現と TGF- $\beta$  シグナリングの関係を解析するために、培養歯根膜細胞に TGF- $\beta$  2 を添加して *Scx* の発現を解析した。これまでの実験結果から、ラットの腱細胞では TGF- $\beta$  2 の添加により *Scx* の発現レベルが上昇することが明らかとなっている。培養歯根膜細胞においても TGF- $\beta$  2、BMP4、FGF2 を添加し検討した結果、TGF- $\beta$  2 で最も *Scx* の発現レベルの上昇が認められた。さらに Western blot

により解析したところ、TGF- $\beta$  添加に伴い Smad3 のリン酸化が認められた。従って、歯根膜細胞では TGF- $\beta$  に反応して *Scx* の発現レベルが上昇することが明らかとなった。

次に、ストレッチチャンバーを使用し、動物実験モデルにおける牽引力と TGF- $\beta$  シグナリングとの関係や、メカニカルストレスがどのようにして *Scx* の発現レベルに影響を与えるのかについて解析した。培養歯根膜細胞に伸展刺激を与えたところ 1 時間で TGF- $\beta$  シグナリング分子である Smad3 リン酸化の上昇が認められた。また伸展刺激を与えるとともに、TGF- $\beta$  の阻害剤として TGF- $\beta$  soluble receptor を培地に添加すると、TGF- $\beta$  シグナリングの活性化が抑制された。このことからメカニカルストレスによる TGF- $\beta$  シグナリングの活性化にはレセプターを介した細胞外の TGF- $\beta$  が関与していることが明らかとなった。現在は、伸展力を負荷することで *Scx* の遺伝子発現および歯根膜で認められるその他の遺伝子(*Colla2*, *Periostin*, *ALP*, *Osx*, *Runx2*, *Twist*) の発現レベルの変化について Real time PCR 法によって解析中である。

さらに *in vitro* 歯根膜細胞における *Scx* と *Osx* の発現を解析した。その結果、*in vitro* においても、*Scx* の発現が低くなる培養条件では *Osx* の発現が高くなることがノーザンブロット解析により明らかとなった。従ってこの 2 つの転写因子が、歯根膜細胞の分化状態の決定に関与している可能性があり、歯根膜細胞は幹細胞ニッチとして多分化能の制御に関与していると考えられる。

## 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  
学会発表

### 1) 第30回日本骨代謝学会学術集会

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

宿南知佐、川津正慶、清流正弘、山本照子、開祐司

### 2) 第13回運動器科学研究会

日時：2012年9月14日（金）～15日（土）

演題：歯根膜における Scleraxis の発現と矯正的歯の移動による変化の解析

発表者：川津 正慶

### 3) 第71回日本矯正歯科学会

日時：2012年9月26日（水）～28日（金）

演題：矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜における Scleraxis の機能解析

Functional analysis of Scleraxis in the periodontal ligament during experimental tooth movement.

発表者：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  
学術大会優秀発表賞受賞

4) 第9回 Skeletal Research Meeting

日時：2012年11月10日（土）

演題：歯根膜におけるScleraxisの発現と矯正的歯の移動による変化の解析

発表者：川津 正慶

発表論文

1) 歯根膜における Scleraxis の発現と矯正的歯の移動による変化の解析

川津 正慶

2013年東北大学歯学博士論文。計39ページ。

論文投稿予定

Aki Takimoto, Masayoshi Kawatsu, Yuki Sugimoto, Masahiro Seiryu, Etsuko Ikeda, Teruko Takano-Yamamoto, Ung-il Chung, Yuji Hiraki, and Chisa Shukunami:  
Expression of Scleraxis in the periodontal ligament is upregulated by tensile mechanical force. (manuscript in preparation)