



Title	歯根膜における骨原性細胞の分化について
Author(s)	結城, 美智子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47596
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 ゆう き み ち こ
結 城 美 智 子

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 0 3 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

歯学研究科統合機能口腔科学専攻

学 位 論 文 名 歯根膜における骨原性細胞の分化について

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 豊澤 悟

(副査)

教 授 村 上 伸 也 助 教 授 中 原 寛 和 講 師 齋 藤 正 寛

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

歯根膜において、セメント質と歯槽骨をそれぞれ形成するセメント芽細胞と骨芽細胞の分化の過程は明らかにはなっていない。特にセメント芽細胞の分化については、歯小囊や歯根膜に存在する間葉系幹細胞がセメント芽細胞に分化するのか、ヘルトヴィッヒ上皮鞘（以下 HERS）が上皮・間葉の形質転換によりセメント芽細胞に分化するのか、未だ見解の一致は得られていない。また、歯根膜や歯髄の血管周囲のニッチには間葉系幹細胞が存在し、分化・成熟して硬組織を形成すると報告されているが、その分化過程の詳細は不明である。

近年、間葉系幹細胞から骨芽細胞系列細胞への分化が転写因子 Runx2 により決定されることが明らかとなり、Runx2 は分化した骨芽細胞やセメント芽細胞にも発現する事が知られている。Runx2 は骨芽細胞マーカーの中で分化段階の最も初期に発現するため、骨芽細胞やセメント芽細胞の前駆細胞である骨原性細胞のマーカーになると考えられる。そこで、Runx2 発現を指標として骨原性細胞を同定し、骨原性細胞と HERS や血管との関係を形態学的に検討する事により、歯根膜におけるセメント芽細胞や骨芽細胞の分化過程の解明を試みた。

【材料と方法】

1) 抗 Runx2 抗体による骨原性細胞の同定：胎生 18.5 日の Runx2-ノックアウトマウス (Runx2-KO) および同腹仔の野生型マウス (WT) (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・小守先生から供与) から採取した下肢を浸漬固定し、パラフィン包埋薄切切片を作製した。脱パラフィン後、抗 Runx2 抗体による免疫染色を行い、Runx2 陽性細胞の局在を検討した。また、歯根膜における Runx2 陽性細胞の局在を検討するため、生後 4 週齢と 12 週齢のラット (Wistar 系) にネンプタール麻酔下で灌流固定を施し、上顎臼歯と切歯を顎骨とともに摘出した。脱灰後、パラフィン包埋薄切切片を作製し、抗 Runx2 抗体による免疫染色を行った。さらに、歯根膜における Runx2 isoform を検討するため、生後 4 週齢のラット上顎切歯の歯根膜から total RNA を抽出し、type I および type II isoform に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。

2) セメント芽細胞の由来に関する免疫組織学的検討：生後 1-19 日齢のラットから上記と同様に歯小囊および歯根膜サンプルより連続切片を作製した。HERS の上皮系マーカーとなる cytokeratin14 (CK14) に対する抗体、セメント芽細胞を含む間葉系細胞のマーカーとなる vimentin (Vim) に対する抗体、骨原性細胞のマーカーとなる Runx2 に

に対する抗体、セメント質のマーカーとなる dentin matrix protein 1 (DMP1) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

3) 血管と骨原性細胞の分布の検討：ICR 系マウスの上顎臼歯部の歯根膜サンプルと、ヒトの歯根膜由来の炎症性疾患であるエプーリスおよび骨形成性エプーリスの病理組織サンプルから薄切切片を作製した。骨原性細胞のマーカーとなる Runx2 に対する抗体と、血管内皮細胞のマーカーとなる CD34 に対する抗体を用いた免疫染色により、両者の分布を検討した。

4) 血管系臓器における骨関連遺伝子発現の検討：骨組織を含まない血管系臓器（マウス胎仔の臍帯、心臓、肝臓と成獣の大動脈、骨髄、および胎盤）における骨関連遺伝子の発現を RT-PCR にて検討した。

【結果及び考察】

1) 抗 Runx2 抗体による骨原性細胞の同定：

WT (胎生 18.5 日) では、骨芽細胞や肥大化軟骨細胞の核に加えて、軟骨膜や骨膜内の線維芽細胞様細胞の核にも Runx2 陽性反応が認められたが、Runx2-KO では Runx2 陽性細胞は認められなかった。従って、抗 Runx2 抗体は Runx2 抗原を特異的に認識し、骨原性細胞を認識するマーカーとなることが考えられた。次に歯根膜（ラット生後 4、12 週齢）においては、骨芽細胞やセメント芽細胞に加えて、歯根膜内の多数の線維芽細胞様細胞の核に Runx2 陽性反応が認められた。さらに、歯根膜で発現する Runx2 の isoform を検討した結果、歯根膜では骨組織に特異的に発現する type II isoform が発現し、非骨組織にも発現する type I isoform の発現はほとんど認められなかった。従って、歯根膜に分布する Runx2 陽性細胞は、骨組織特異的な type II isoform を発現する骨原性細胞である事が分かった。

2) セメント芽細胞の由来に関する免疫組織学的検討：

ラット臼歯の歯根形成期における蛍光二重染色の結果、セメント芽細胞の分化過程において、CK14 で標識される HERS は、間葉系細胞マーカーである Vim と骨原性細胞マーカーである Runx2 に陽性反応を示さないため、上皮-間葉の形質転換により、HERS がセメント芽細胞に分化することは否定的であると考えた。次に、歯根形成過程における骨原性細胞の分布の検討から、HERS の断裂が始まると、HERS の歯小囊側に分布していた骨原性細胞が HERS の間隙を通過して歯根表層に移動し、それと同時にセメント質形成が認められた、従って、セメント芽細胞は歯小囊の骨原性細胞由来であると考えられた。

3) 血管と骨原性細胞の分布の検討：

歯根膜（マウス）における蛍光抗体二重染色から、一部の CD34 で標識される血管内皮細胞の周囲に Runx2 陽性細胞の分布が認められた。また、ヒトの歯根膜由来の炎症性病変であるエプーリスや骨形成性エプーリスにおける Runx2 と CD34 の蛍光二重免疫染色から、両病変には多数の骨原性細胞が含まれている事が分かり、エプーリスでも血管内皮細胞周囲に骨原性細胞が分布し、骨形成性エプーリスでは上記所見に加えて、血管内皮細胞に重なるように骨原性細胞が分布していた。このように血管内皮細胞近傍に骨原性細胞が分布することから、歯根膜以外の非骨性組織の血管周囲にも骨原性細胞が分布する可能性があるのではないかと推測した。

4) 血管系臓器における骨関連遺伝子発現の検討：

血管系臓器における骨関連遺伝子の発現を RT-PCR により検討した結果、臍動静脈を含む臍帯には骨芽細胞分化に重要な転写因子 (Runx2、osterix) と各骨基質関連蛋白質 (type I collagen、alkaline phosphatase、osteopontin、osteocalcin) 遺伝子の発現が認められた。しかし、Runx2 の免疫染色に陽性反応を示す細胞は認められないことから、臍帯には微少なレベルで骨関連遺伝子を発現する骨芽細胞系列に属する細胞が存在する可能性が推察された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜や歯小囊におけるセメント芽細胞や骨芽細胞の分化について免疫組織化学的手法を用いて検討したものである。免疫組織化学的染色により転写因子 Runx2 の核内分布を指標として、セメント芽細胞や骨芽細胞の前駆細胞である骨原性細胞を同定した結果、多数の骨原性細胞が歯根膜や歯小囊に分布していることが分かった。ま

た、セメント芽細胞の起源については、歯小嚢に分布する骨原性細胞に由来することが明らかとなった。さらに、骨原性細胞と血管内皮細胞の近接した位置関係や骨組織を含まない血管臓器が骨関連遺伝子を発現することから、血管は骨形成において栄養を供給するだけでなく、骨原性細胞の供給にも重要な働きをする可能性が考えられた。

以上の研究結果は、セメント芽細胞や骨芽細胞の分化を理解する上で重要な知見を与え、博士（歯学）を授与するに値すると認める。