

Title	歯根膜細胞の分化制御におけるセメント芽細胞との相互作用の意義
Author(s)	下村, 純平
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/82167">https://doi.org/10.18910/82167</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 下 村 純 平 )	
論文題名	歯根膜細胞の分化制御におけるセメント芽細胞との相互作用の意義
論文内容の要旨	
<p><b>【研究目的】</b></p> <p>歯根膜はセメント質と固有歯槽骨との間隙に位置する幅0.1～0.4mmの結合組織で、歯を顎骨に固定しその機能を支持する一方で、軟組織としての性質を維持しながら咬合力に起因するメカニカルストレスを緩衝するという役割を担う。歯根膜は、主成分であるコラーゲン線維に加え、血管、神経の他、線維芽細胞、セメント芽細胞および骨芽細胞の前駆細胞、さらには未分化間葉系幹細胞などの細胞成分によって構成され、歯周組織の恒常性維持のみならず、歯周組織再生過程において極めて重要な役割を果たす。</p> <p>一方、歯周病によって失われた歯周組織の再生を目的として、Guided tissue regeneration法、エナメルマトリクスタンパクや塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) の局所投与が歯周組織再生療法として開発され、臨床において一定の成果を挙げている。歯周組織の再生過程では、歯根膜に内在する組織幹細胞が増殖・遊走したのちセメント芽細胞や骨芽細胞に分化することで、同組織の再生が達成される。一方、歯周組織の再生過程を組織学的に解析した非臨床研究の結果から、上記のいずれの歯周組織再生療法においても、セメント質の再生は既存セメント質から連続的に生じることが明らかになっている。このことはセメント質表層に存在するセメント芽細胞が、隣接する歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化に対し何らかの役割を担っていることを示唆しているものの、セメント芽細胞と歯根膜細胞の細胞間相互作用が歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化に及ぼす影響については十分な情報がない。細胞間相互作用は、ホルモン、成長因子などの液性因子を介したparacrineシグナルと、細胞の隣接が必要となるjuxtacrineシグナルに大別され、paracrineシグナル制御は、免疫疾患や悪性腫瘍における分子標的薬の開発に応用されているだけでなく、同シグナル活性化の歯科分野における代表例としてFGF-2による歯周組織再生療法が挙げられる。一方で、juxtacrineシグナルは一部分子標的薬の対象として研究が進められていることに加え、細胞移植治療への応用が期待されている。</p> <p>現在臨床応用されている歯周組織再生療法は、歯周組織に内在する未分化間葉系幹細胞の増殖促進やスペースメイキングが主な作用機序であるが、セメント芽細胞の効率的な分化誘導が可能になれば、その有効性を著しく高めることが期待できる。そこで、本研究では、歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化過程においてセメント芽細胞が果たす役割を明らかにすることを目的とし、<i>in vitro</i>共培養実験系を用いて両細胞間の細胞間相互作用について解析するとともに、その分子機序について検討を加えた。</p> <p><b>【材料および方法】</b></p> <p>ヒト歯根膜細胞 (HPDL) は Lonza 社より購入し、不死化ヒトセメント芽細胞 (HCEM) は広島大学の高田隆先生 (現名誉教授) より供与されたものを実験に供した。レンチウイルスを用いて HPDL に GFP 遺伝子を導入後、ピューロマイシン含有培養培地での選択培養により EGFP 強発現 HPDL (GFP-HPDL) を樹立した。GFP-HPDL と HCEM の細胞懸濁液を 1:1 の比率で混合し、同一の培養皿に培養した (直接的共培養)。12 時間あるいは 24 時間の培養後、trypsin-EDTA を用いて細胞を回収し、セルソーターを用いて GFP-HPDL のみを分取した。分取直後に RNA を回収し、セメント芽細胞関連遺伝子の発現を Real-time PCR 法にて解析した。一方で、分取後に再度培養皿に播種し、石灰化誘導培地 (10 mM βグリセロリン酸、50 μg/ml アスコルビン酸含有) にて培養し、3 日後の遺伝子発現を解析するとともに、18 日後、30 日後の石灰化ノジュールの形成をアリザリンレッド染色にて検出することで硬組織形成細胞への分化能を評価した。</p> <p>直接的共培養後に認められた HPDL における遺伝子発現変化が、HCEM 由来の液性因子によるものか否かについて検討するために、HCEM 由来培養上清を 50% の割合で添加した培地にて HPDL を 24 時間培養し、HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現を Real-time PCR 法にて解析した。さらにトランスウェルを使用して HPDL と HCEM を非接触環境で共培養 (間接的共培養) することで HCEM 由来液性因子が HPDL に及ぼす影響</p>	

について解析した。間接的共培養では、トランスウェル内に HCEM を、トランスウェル下部のプレート底面には HPDL を播種し、24 時間培養した後の HPDL における遺伝子発現を解析した。

HCEM と HPDL の直接的な細胞間相互作用がいかなる分子機序によって成り立っているのかを明らかにするために、両細胞の直接的共培養により発現が顕著に上昇した *IBSP* の発現を指標として検討を行うこととした。歯根膜細胞がセメント芽細胞を含む硬組織形成細胞へと分化する過程をモニターするマーカーとして *IBSP* が有用であるか否かを検討するために、RNAscope® *in situ* hybridization 法によってマウス歯周組織における *Ibsp* mRNA の発現を解析した。

さらに、HPDL と HCEM の細胞間相互作用における Wnt の役割について解析することを目的とし、抗ヒト Wnt3a 抗体および細胞膜染色試薬を用いて、蛍光免疫染色法にて HCEM、HPDL の細胞膜上に発現する Wnt3a の検出を試みた。また HPDL を Recombinant Wnt3a 存在下にて 24 時間培養し、その遺伝子発現を解析した。さらに Wnt シグナル阻害剤である Dickkopf-1 (DKK-1) を含有した培地にて GFP-HPDL と HCEM を直接的共培養し、GFP-HPDL の遺伝子発現を解析した。

#### 【結果】

HCEM と 24 時間直接的共培養した GFP-HPDL において、セメント芽細胞関連遺伝子である *ALPL*、*CEMP1*、*BGLAP*、さらに *IBSP* 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。また、HCEM と直接的共培養した GFP-HPDL は、石灰化誘導培地での 3 日間の培養により、コントロールと比較して *ALPL*、*IBSP*、*CEMP1*、*BGLAP* の有意な発現上昇を認めた。さらにアリザリンレッド染色の結果、HCEM と直接的共培養した GFP-HPDL ではコントロールと比較し培養 18 日目と 30 日目において石灰化ノジュール形成の亢進を認めた。一方で HCEM 由来培養上清の添加やトランスウェルを使用した間接的共培養は、HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現に有意な影響を及ぼさなかった。

RNAscope® *in situ* hybridization 法によってマウス歯周組織における *Ibsp* mRNA の発現を解析した結果、歯根膜に特異的に発現が認められる *Plap-1* とは異なり、*Ibsp* mRNA は歯根表面のセメント芽細胞と歯槽骨表面の骨芽細胞に発現が認められた。

骨芽細胞において *juxtacrine* による分化促進作用が報告された Wnt シグナルに着目し、HPDL と HCEM の直接的共培養による HPDL のセメント芽細胞への分化誘導における役割について検討を加えた。蛍光免疫染色の結果、HCEM の細胞膜上に Wnt3a の発現が検出された一方で、HPDL の細胞膜上には Wnt3a は検出されなかった。HPDL を Recombinant Wnt3a にて刺激することにより、Wnt 関連遺伝子である *AXIN2*、*LEF1* および *IBSP* の発現が濃度依存的に上昇することが明らかとなった。Wnt3a 刺激にて上昇した Wnt 関連遺伝子および *IBSP* の発現は、DKK-1 の存在下で有意に抑制された。

HCEM と直接的共培養した GFP-HPDL において *AXIN2*、*LEF1* の発現上昇が認められた。直接的共培養における DKK-1 の添加は、GFP-HPDL に誘導される *AXIN2*、*LEF1* 並びに *IBSP* 遺伝子の発現を抑制した。

#### 【結論および考察】

本研究ではセメント芽細胞との細胞間相互作用、特に直接的な細胞間接着による *juxtacrine* 作用により歯根膜細胞がセメント芽細胞へ分化誘導される可能性をはじめて明らかにした。また、その分子機序として Canonical Wnt シグナルが関与していることが示唆された。

歯周病により歯周組織が破壊されると、歯根膜に内在する組織幹細胞は既存のセメント質に遊走し、表層のセメント芽細胞と接着することで自らをセメント芽細胞へと分化誘導し、セメント質の形成に寄与しているのではないかと考える。このことは、既存セメント質上に存在するセメント芽細胞がセメント質の再生において重要であることを示唆するものである。歯根膜細胞とセメント芽細胞の細胞間相互作用のさらなる解析を通じて、セメント質再生の分子メカニズムを解明することは、新たな歯周組織再生療法の開発につながるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 下 村 純 平 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	豊澤 悟
	副 査	准教授	伊藤 祥作
	副 査	講師	佐々木 淳一
<b>論文審査の結果の要旨</b>			
<p>本研究は、歯根膜細胞がセメント芽細胞へと分化する過程におけるセメント芽細胞の役割を解明するために、<i>in vitro</i> 共培養実験系を用いて両細胞間の細胞間相互作用について解析すると共に、その分子機序について検討を加えたものである。</p> <p>その結果、セメント芽細胞との細胞間相互作用、特に直接的な細胞間接着による <i>juxtacrine</i> 作用により歯根膜細胞がセメント芽細胞へ分化誘導されることが明らかとなった。また、その分子機序として <b>Canonical Wnt</b> シグナルが関与していることが示唆された。</p> <p>以上の研究結果は、歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化制御機構の一端を明らかにすると共に、セメント質再生の分子メカニズムを解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。</p>			