

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592302

研究課題名（和文）歯根膜維持機構の分子生物学的検討と臨床応用

研究課題名（英文）Molecular biological investigation of periodontal ligament homeostasis in Slc39a13/Zip13 mice

研究代表者

伊平 弥生（IDAIRA YAYOI）

鶴見大学・歯学部・学内講師

研究者番号：40200018

### 研究成果の概要（和文）：

歯根膜の代謝・維持ならびに歯槽骨に関わる Zip13 の役割を知ることを目的に Zip13KO マウスと WT マウスを用いて形態観察、微細構造観察、免疫組織染色を行った。また、歯根膜と同様に線維性結合組織である頭蓋冠矢状縫合、アキレス腱についても観察した。その結果、Zip13 がノックアウトされると早期にコラーゲン線維の脆弱性が生じ、加齢が進むものと思われる。これらのことから、Zip13 は歯根膜を含む線維性結合組織の代謝・維持に重要な役割を果たす遺伝子であると推測できる。

### 研究成果の概要（英文）：

The aim of our study was to investigate the role of Zip13 in the metabolism of periodontal ligament. To examine the biological role of Zip13, we performed the morphologic observation for Achilles tendon and sagittal suture at the cranium which are comprised of fibrous connective tissue as well as periodontal ligament using H&E staining, silver impregnation and transmission electron microscope (TEM) and immunostaining. Our results reveal Zip13 may play an important role to periodontal ligament homeostasis.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯根膜、象牙質、歯槽骨、線維性結合組織、歯根、Zip13, HE, TEM,

#### 1. 研究開始当初の背景

Zip13 はコラーゲンの生合成、修飾に関与し、その結果、Zip13KO マウスではコラーゲンの量的、構造的な異常が生じることが報告されている。そのため Zip13KO マウスの歯根膜線維は脆弱であるため、強いメカニカルストレスが生じたときに、歯根膜にどのような変

化が生じるのかを確認し、骨性癒着の予防や歯根膜の再生医療に役立てようと考えた。

#### 2. 研究の目的

(1) Zip13KO マウスと WT マウスの表現型の違いを知る。次いで、Zip13KO マウスの歯根膜にメカニカルストレスを加えたときに

どのような変化が起こるかを知る。

(2) Zip13KO マウスと WT マウス (野生型マウス, 対照マウス) の歯根膜ならびに歯周組織の状態を経時的に HE 観察し、変化の状態をみる。変化の多く見られた週齢で鍍銀染色、さらに微細構造を観察するために透過型電子顕微鏡観察 (以下 TEM とする) を行い、Zip13KO マウスと WT マウスの違いを観察する。対照として線維性結合組織であり、常にメカニカルストレスのかかっている歯根膜とアキレス腱のコラーゲン線維を観察し、線維性結合組織の間で違いがあるかを観察する。

(3) 線維性結合組織で歯根膜と同様に靭帯結合により骨連結を行い、常にメカニカルストレスのかかっている頭蓋冠縫合部 (矢状縫合) について、6 週齢と 12 週齢の Zip13KO マウスと WT マウスで石灰化の状態違いを観察する。

(4) WT マウスと KO マウスの各週齢について collagen1 抗体で免疫組織学的染色を行い、第一臼歯歯根膜ならびに歯槽骨における抗体の発現を観察する。

### 3. 研究の方法

(1) 歯槽骨および歯根膜の形態学的観察: Zip13KO マウスと WT マウスの離乳後、歯根膜に関わるメカニカルストレスの違いを見るために固形試料あるいは練り餌を与え、歯根ならびに歯周組織の状態を観察した。

(2) 線維性結合組織の微細構造観察: それぞれのマウスを 2,4,6,12,20 週齢で安楽死させ、下顎を摘出し、薄切切片を作製後 HE 染色を行った。6,12,20 週齢で鍍銀染色を行った。

(3) それらの週齢の歯根膜線維を TEM で観察し歯根膜が横断されている部位を選択し、image-ProPlus version6.2 ソフトを用いて歯根膜の直径、単位面積当たりのコラーゲン数を測定し、独立した T 検定を用いて差の検定をおこなった。対照として、線維性結合組織の一つであるアキレス腱を観察した。

(4) 頭蓋冠縫合部の観察: Zip13KO マウスと WT マウスを 6 週齢と 12 週齢で安楽死させ、頭部を切断し頭蓋骨を露出した。その後 7 日間アリザリン溶液に浸漬し、実体顕微鏡で縫合部の状態を観察した。

(5) 免疫組織化学的観察: WT マウスと KO マウスの各 2 週齢、4 週齢、6 週齢、12 週齢について collagen1 抗体 (abcam ab34710) で免疫組織学的染色を行い、第一臼歯歯根膜における抗体の発現を観察した。

### 4. 研究成果

(1) 餌の違いにより発育に差は見られなかったため、固形と練り餌の混合飼料を用いて飼育した。

#### (2) 歯槽骨および歯根膜の形態観察 (図 1)

WT マウスは 20 週齢まで歯槽骨、歯根膜の幅に変化は見られなかった。KO マウスは 12 週齢以降では歯槽骨上部付近が塑造になり多孔質になった。歯槽骨上部の歯根側は凹凸が著しく、その部位の歯根膜の形態は複雑であり、歯根膜の幅は広がっていた。歯根膜が消失し、骨性癒着をきたしているところはなかったが、20 週齢の KO マウスでは一部歯根膜の薄い部分が見られた。

WT マウスの歯根膜線維芽細胞の核は扁平で小さく、成熟している様相を呈していたが、6 週齢の KO マウスは核が楕円形で大きく、幼若な状態を呈していた。12 週齢と 20 週齢の KO マウスでは核が丸くて大きいものと核が扁平で小さいものが混在していた。歯根膜線維の束は WT マウスで有意に太く、密であった。

#### (3) 線維性結合組織の微細構造観察 (図 2-a, b, c, 図 3)

歯根膜と腱のコラーゲン細線維の直径は KO マウス、WT マウスともに歯根膜に比べて腱で有意に太かった。コラーゲン周期の幅を測定した結果、腱で長く、歯根膜で短かった ( $p < 0.05$ ) (図 2-a)。WT マウスと KO マウスの歯根膜の単位面積当たりのコラーゲン数、コラーゲンの直径ともに WT マウスで大きかった (6 週齢、20 週齢  $p < 0.05$ ) (図 2-b, c, 図 3)。

#### (4) 頭蓋冠縫合部の観察 (図 4)

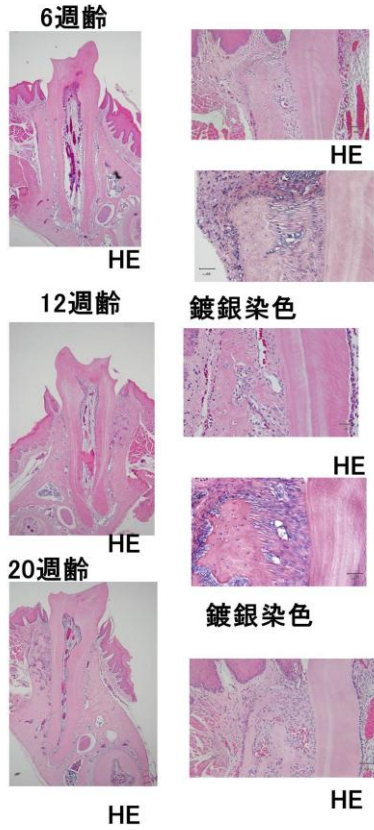
頭蓋冠の縫合部は 6 週齢の KO マウスでは石灰化 (骨性癒着) が起こり始め、12 週齢ではほぼ癒着し、コラーゲン線維からなる靭帯結合は消失していた。それに対し、6・12 週齢の WT マウスの縫合部はコラーゲン線維が存在し、アリザリンに染色されないコラーゲン線維が白く一定の幅で確認できた。

#### (5) 免疫組織化学的観察

歯根膜線維芽細胞、歯槽骨において I 型コラーゲンの発現に大きな違いはみられなかった。

KO マウスでは歯根膜線維ならびに頭蓋冠の縫合部に見られる靭帯結合のコラーゲン線維は年齢の増加に伴い脆弱性が認められた。特に本研究から、歯根膜は絶えず咀嚼圧のかかる靭帯結合であるため、腱組織および頭蓋縫合とは明らかに異なり、独特の維持代謝機構を有していた。Zip13 がノックアウトされると早期にコラーゲン線維の脆弱性が生じ、加齢が進むものと思われる。これらのことから、Zip13 は歯根膜を含む線維性結合組織の代謝・維持に重要な役割を果たす遺伝子であると推測できる。

Zip13KOマウス



Zip13WTマウス

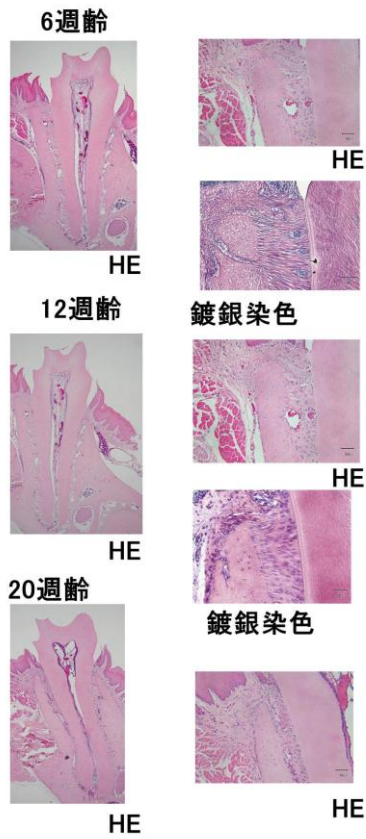


図1 歯槽骨と歯根膜の観察

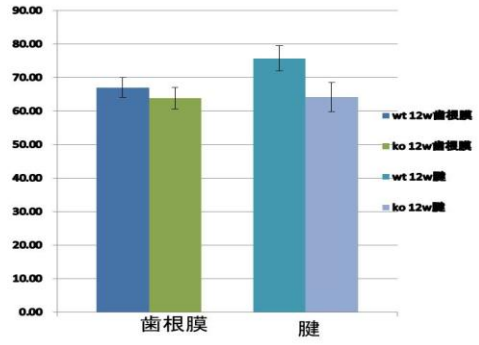


図2-a 12週齢マウスの歯根膜と腱のコラーゲンの周期幅 \*  $p < 0.05$

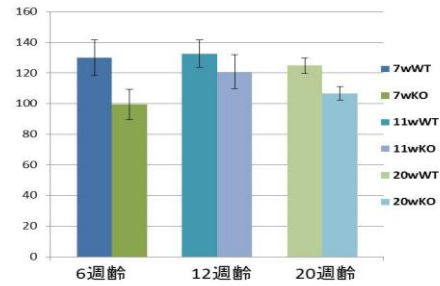


図2-b 単位面積当たりの歯根膜のコラーゲン数 \*  $p < 0.05$

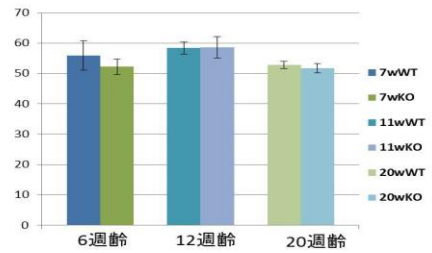


図2-c 歯根膜のコラーゲン細線維の直径 \*  $p < 0.05$

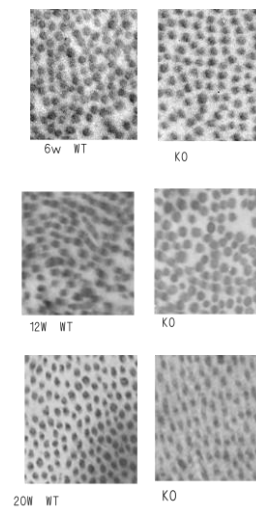


図3 コラーゲン横断像

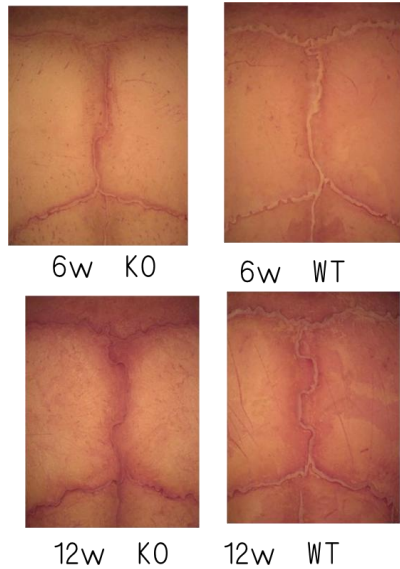


図4 頭蓋のアリザリン染色

#### 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)

[学会発表] (計2件)

- ① 伊平弥生、歯根膜線維の代謝・維持に関わる Zip13 の役割について、日本小児歯科学会, 2013年5/23~5/24、岐阜国際会議場 (岐阜)
- ② 宗正隆明、歯根象牙質の形成過程における亜鉛トランスポーターZip13 の役割について、日本小児歯科学会, 2013年5/23~5/24、岐阜国際会議場 (岐阜)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊平 弥生 (IDAIRA YAYOI)  
 鶴見大学・歯学部・学内講師  
 研究者番号：40200018

##### (2) 研究分担者

朝田芳信 (ASADA YOSHINOBU)  
 鶴見大学・歯学部・教授  
 研究者番号：20184145

##### 研究分担者

下田信治 (SHIMODA SHINJI)  
 鶴見大学・歯学部・教授  
 研究者番号：30139620