

## Mini Review

# 歯根膜組織の特性と歯周組織の再生

春日井昇平

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科摂食機能制御学

### *Characteristics of periodontal ligament and regeneration of periodontal tissue*

Periodontal ligament (PDL) is a thin non-mineralized connective tissue between two mineralized tissues: alveolar bone and cementum. PDL keeps its function under enormous mechanical stress. In this article, I will introduce our studies characterizing the uniqueness of PDL and then discuss regeneration of periodontal tissue. S100A4 is a small Ca binding protein and we found high expression level of S100A4 in PDL. Histologically S100A4 localized on extracellular matrix and analysis of culture medium of PDL fibroblasts revealed secretion of S100A4 and recombinant S100A4 protein inhibited mineralization of osteoblastic culture. MC3T3-E1 cells (mouse osteoblastic cell line) expressed S100A4 at very low level and inhibition of S100A4 with a retroviral vector containing S100A4 antisense enhanced the mineralization of MC3T3-E1 cell culture. Finally, when PDL cells were exposed under mechanical stress in culture, expression level of S100A4 increased. These results indicate that S100A4 acts as a mineralization inhibitor in PDL and also bone; and that this protein plays a role in keeping its function under enormous mechanical stress. Although PDL is a non-mineralized tissue, it contains progenitors of osteoblasts and cementoblasts. Indeed, PDL is prerequisite for periodontal tissue regeneration. Application of guided tissue regeneration (GTR) and/or enamel matrix derivative (EMDOGAIN) promote periodontal tissue regeneration. Treatment with a dental implant, which is inserted to edentulous bone, is clinically acceptable; however, a dental implant with PDL like a natural tooth would be more ideal.

Rec. 9/12/2002, Acc. 10/30/2002, pp34-38

Shohei Kasugai

Masticatory Function Control, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

**Key words** periodontal ligament, mineralization, regeneration, cementum, bone

## 歯根膜組織とは何か

歯はエナメル質, 象牙質, セメント質の3種類の硬組織と, 歯髄と呼ばれる結合組織からできている(図1). 歯は歯槽骨に直接結合しているのではなく, 厚さ約200µmの歯根膜組織と呼ばれるコラーゲン線維に富む結合組織によって歯槽骨内に固定されている. したがって, 歯に加わった咬合力は骨に直接伝わらずに, 歯根膜組織により緩衝されて骨に伝わる. さらに, 歯根膜組織には知覚神経の終末が分布しており, 歯に加わった力を識別している.

このように歯根膜組織は歯が正常に機能する上で, 文字通り「縁の下力持ち」としての役割を果たしている. 俗に歯槽膿漏と言われる歯周炎においては, 歯周組織の炎症により歯周組織の破壊が起きる. 歯周炎が進行すると歯の動揺が起き, 治療をせずに放置すると歯は脱落す

る. 歯周炎により破壊された歯周組織を再生させる場合は, 歯根膜組織を含めた歯周組織全体を再生させる必要がある. 歯根膜組織の特性について解明することは, 歯周組織の再生を考える上でも有用であると我々は考えている.

歯根膜組織は歯根のセメント質と歯槽骨という2つの石灰化組織の間に存在する幅の狭い非石灰化の結合組織であり, 生理的状态においては石灰化しない. このことから歯根膜組織には石灰化を抑制する何らかの機構があることが推測されている. 骨芽細胞を培養すると石灰化組織を形成するが, 歯根膜細胞(歯根膜に存在する線維芽細胞)を培養し, その培養上清を骨芽細胞の培養系に添加すると石灰化の抑制が起きることが知られている. このことは, 歯根膜細胞が石灰化の抑制因子を産生していることを示唆している.

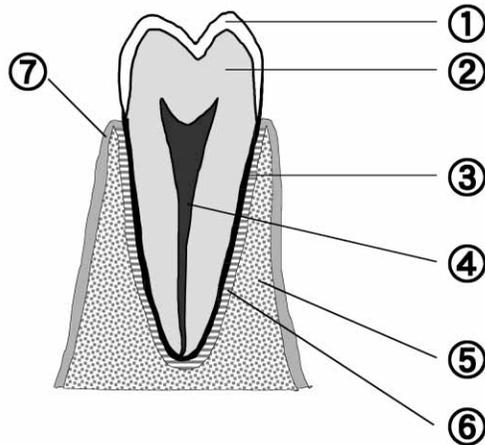


図1 歯根膜，歯の模式図

歯は、エナメル質（ ）象牙質（ ）セメント質（ ）の3種類の石灰化組織（硬組織）と、俗に「神経」と呼ばれている歯髄（ ）から成る。歯の歯根表面のセメント質（ ）と歯槽骨（ ）の間には線維性の結合組織である歯根膜組織（ ）が存在する。歯根膜組織の靭帯様の線維をシャープリー線維といい、この線維の両端はそれぞれセメント質と歯槽骨に埋め込まれており、シャープリー線維によって歯は歯槽骨内に保持されている。歯周組織とは歯の周囲組織のことであり、セメント質（ ）歯根膜組織（ ）歯槽骨（ ）歯肉（ ）から構成される。

一方、ヒトの場合咀嚼回数は個人差が大きく、また摂取する食物の内容によっても異なるが、一日当たり数千回の咀嚼を行っている。咀嚼によるメカニカルストレスに常時曝された状況下で、歯根膜組織はその生理的機能を維持している。そのためには、何らかの特殊なメカニズムが歯根膜細胞に存在するものと考えられる。

本稿では、歯根膜組織の特性について我々が行ってきた研究を含めて紹介するとともに、今後の歯根膜組織の研究、歯周組織再生に関する研究の方向性についても述べてみたい。

## 歯根膜組織と S100A4カルシウム結合タンパク

S100Aカルシウム結合タンパクと総称される分子量の小さい酸性タンパクが存在する。17種類のS100Aカルシウム結合タンパクが存在するが、これらは共通して分子中にカルシウムイオンに親和性の高い部位を持ち、そこにカルシウムイオンが結合すると3次構造が変わり様々な機能を発現する<sup>1)</sup>。S100Aカルシウムタンパクの一つであるS100A4カルシウム結合タンパク（以下S100A4）は細胞骨

格と相互作用し、細胞運動に関与している。転移能の高い腫瘍細胞はS100A4の発現が高く、S100A4の発現を抑制すると転移能が減少することが報告されている<sup>2)</sup>。一般的にS100A4は細胞内に存在するが、乳腺において細胞外に存在すること、平滑筋細胞がS100A4を分泌することが報告されている。したがって、S100A4は細胞外においても何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。S100A4は線維芽細胞で発現が高い遺伝子の一つであり、上皮細胞に強制発現させると線維芽細胞の形態に変化すること、興味深いことに、歯の発生段階において将来歯根膜になる間葉組織にS100A4の発現が高いことが報告されている<sup>3)</sup>。

我々はウシ歯根膜組織のcDNAライブラリーを作製し、S100A4のcDNAをクローニングし、口腔組織におけるS100A4の遺伝子発現レベルを調べた<sup>4)</sup>。歯根膜組織におけるS100A4の発現レベルは高かったが、未萌出の歯の歯根膜に比較して萌出した歯の歯根膜組織においてS100A4の発現レベルは著しく高かった。萌出歯と未萌出歯でS100A4の発現レベルが異なる理由としては、歯根膜組織の発達段階における差異である可能性が考えられる。さらに、未萌出歯の歯根膜組織に比較して萌出歯の歯根膜組織にはより大きいメカニカルストレスが負荷されていることから、メカニカルストレスによりS100A4の発現が増加する可能性も考えられる。

## メカニカルストレスによるS100A4発現の上昇

メカニカルストレスが歯根膜細胞のS100A4発現に及ぼす作用について、フレクサーセルという装置を用いて実験を行った<sup>5)</sup>。フレクサーセルにおいて、培養容器のシリコン製の底面をコンピュータ制御により吸引し、培養容器の底面を伸展させることにより細胞にメカニカルストレスを負荷することができる。この装置を使用して、牛の歯根膜細胞に約18%の反復伸長負荷（1時間に240回）を2時間あるいは24時間負荷し、S100A4、 $\alpha$ -actin、 $\alpha$ -tubulinの遺伝子発現を解析した。これら3つの遺伝子の発現は、メカニカルストレスを負荷して2時間後および24時間後いずれにおいても上昇していた。S100A4タンパクはカルシウムと結合し、細胞骨格系タンパクと相互作用し機能を調整している可能性が指摘されている。メカニカルストレスにตอบสนองして歯根膜細胞において発現が増加するS100A4も、細胞骨格系タンパクと相互作用し細胞機能を調整している可能性が考えられる。メカニカルストレスにตอบสนองして歯根膜細胞においてS100A4の発現が上昇することは、メカニカルストレスに曝されている環境下で、歯根膜組織がその機能を維持するために役立っているかもしれない。

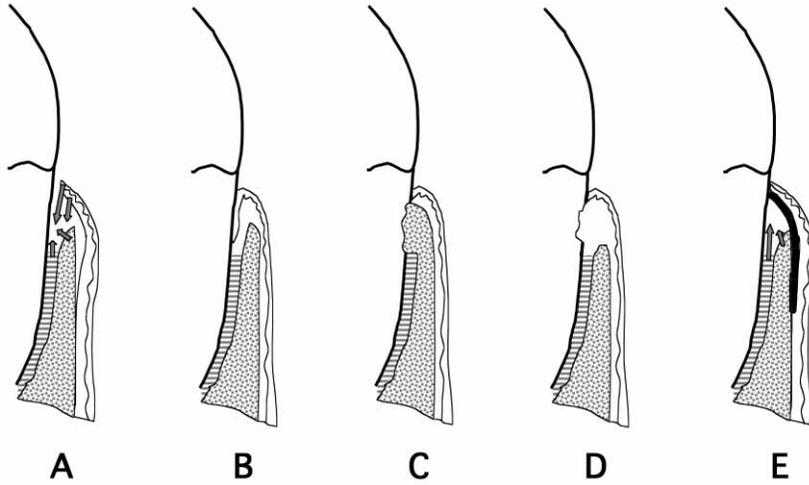


図2 GTRの模式図

歯肉を剥離し、病変のある部位を削除し、歯根表面を清掃した後に、歯肉弁を歯根表面に戻すと、歯根膜組織、歯槽骨、歯肉結合組織、歯肉上皮の4つの組織が、歯根表面の空隙に移動を開始する。歯根膜結合組織の移動速度が遅いため、歯肉上皮の歯根面への伸展増殖(B)、骨性癒着(C)、歯根面の吸収(D)が多くなる。GTRにおいては、(E)に示すように膜を挿入することにより、歯肉結合組織と歯肉上皮の移動をブロックし、歯根膜組織と歯槽骨に再生のスペースを付与することが可能となる。その結果、歯根面にセメント質を再生させ歯根膜線維を根面に強固に付着させることができる。

### S100A4の石灰化抑制作用

平滑筋細胞においては、S100A4は細胞内に存在するだけでなく、細胞外にも分泌される。歯根膜組織においても、歯根膜細胞がS100A4を細胞外に分泌し、そのS100A4が何らかの生理的機能を果たしている可能性が考えられた。そこで、我々はS100A4の歯根膜組織における遺伝子発現とそのタンパクの局在、さらに培養歯根膜細胞がS100A4を分泌するかについて検討を行った<sup>6)</sup>。また、S100A4タンパクの石灰化抑制作用についても検討した。

ラットの歯周組織における in situ hybridization の結果、歯根膜細胞のS100A4の遺伝子発現レベルが高いことが確認された。ウシ歯根膜の凍結切片を作製し抗S100A4抗体を用いて蛍光抗体法を行ったところ、S100A4は歯根膜細胞内だけでなく歯根膜線維に沿って存在していた。ウシの歯根膜細胞を培養した培地を生化学的に分析したところ、S100A4が培地中に存在していた。一方、ラット骨髓細胞培養系においては骨様の石灰化組織が形成されるが、この系にリコンビナントS100A4タンパクを添加すると石灰化組織の形成が抑制された。

以上の結果は、歯根膜細胞がS100A4を分泌し、S100A4が石灰化抑制因子として作用する可能性を示している。歯根膜組織における石灰化抑制因子の候補としてプロスタグランジンやプロテオグリカンが挙げられているが、S100A4も石灰化抑制因子として機能している可能性が考えられる。

ところで、歯根膜細胞に比較して骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞においてはS100A4の発現レベルは低い。

MC3T3-E1細胞におけるS100A4の発現を、アンチセンスを組み込んだレトロウイルスを用いてブロックすると、石灰化組織の形成時期が早まり、また形成された石灰化組織の量も多かった。また、ラットの胎生期における頭蓋骨の形成過程の初期では、S100A4の遺伝子発現が観察されるが、頭蓋骨の石灰化が開始する時期からはS100A4の発現が消失することも我々は観察している。したがって、S100A4は骨組織においても石灰化抑制因子として機能している可能性が高い<sup>7)</sup>。

### 歯周組織の再生には歯根膜細胞が必要

歯周炎によって破壊された歯周組織(歯の周囲組織:歯根膜、歯槽骨、歯肉)を再生させる場合には、歯槽骨を再生させるだけでなく、歯根面にセメント質を再生させ、歯根面へ歯根膜線維を強固に付着させる必要がある。前述のように、歯根膜細胞は石灰化の抑制因子を産生する一方で、歯根膜細胞を培養すると培養容器の底面の一部に結節様の石灰化組織を形成する。現在のところ、セメント質に特異的なマーカーが同定されていないため、培養歯根膜細胞が形成する石灰化組織が、骨であるかセメント質であるかは明らかではない。歯根膜組織中にはセメント芽細胞あるいは骨芽細胞の前駆細胞が存在しており、どちらか片方あるいは両方の前駆細胞が培養環境下で石灰化組織を形成するものと考えられる。

ところで、臨床において、外傷により脱落した歯を再植することがあるが、再植時にその歯の歯根膜組織が生存していた場合には再植後の結果が良いと言われている。

Melcherらのグループはイヌを用いて以下の実験を行った<sup>8)</sup>。歯を抜き、根面から歯根膜組織を剥離し、歯根膜細胞を培養した。その歯の歯冠部は切断除去し、歯根を根管充填(歯根内部の歯髄が存在していた空隙を人工材料で埋めること)した。歯根膜細胞を培養して、増やした歯根膜細胞を根管充填した歯根の表面に付着させた。顎骨に穴を開け、そこに歯根膜細胞を付着させた歯根あるいは歯根膜細胞を付着させない歯根を埋入した。その結果、歯根膜細胞を付着させた歯根の場合は、歯根周囲の一部にはセメント質と歯根膜様組織が形成された。しかし、歯根膜細胞を付着させない歯根の場合は、歯根周囲の一部が吸収し顎骨と骨性癒着しており、歯根の周囲にセメント質と歯根膜様組織は観察されなかった。

1982年にNymanは、人工膜を使用して、歯根膜組織と歯槽骨に再生のスペースを付与し歯周組織を再生させるGTR法(Guided Tissue Regeneration)を発表した(図2)<sup>9)</sup>。GTR法が行われる以前においては歯周炎を外科的に治療したとしても、歯肉上皮の歯根面への伸展増殖、骨性癒着、歯根面の吸収が起き問題であった。GTR法を行うことにより、歯根膜組織と歯槽骨に再生のためのスペースを与え、歯根面にセメント質を再生させ歯根膜線維を根面に強固に付着させることができる。この場合、歯根膜由来の細胞がセメント質と歯根膜線維の再生に関与していると考えられている。これらの事実から、歯根膜組織の再生には歯根膜細胞が必須であることは明らかである。

## 今後の課題

我々の得た結果は、S100A4タンパクが歯根膜組織の機能を維持する上で重要な働きをしていることを示唆しているが、S100A4によって歯根膜組織の特性のすべてを説明できるわけではない。TGF-スーパーファミリーの中のGDF5, 6, 7のリコンビナントタンパクが異所性に鍵あるいは靱帯様の結合組織を誘導することが報告されている<sup>10)</sup>。歯根膜においてこれらの遺伝子が発現していることも、歯根膜組織の特性の維持に関与していると考えられる<sup>11)</sup>。これからも、歯根膜細胞の機能を特徴付ける特異的なマーカーを明らかにしていく必要がある。歯根膜組織に関する研究において、歯根膜細胞と呼称される細胞集団のheterogeneityが明確にされていない点は大きな問題である。そこで、歯根膜組織由来の株細胞の樹立と、その細胞を用いた研究が望まれる。一方、生化学的な解析を行うための十分な試料が得にくいことも理由であるが、骨や象牙質に比べてセメント質に関する研究は遅れている。セメント芽細胞に特異的な分化マーカーが求められており、分子生物学的手法を用いてセメント芽細胞に特異的に発現している遺伝

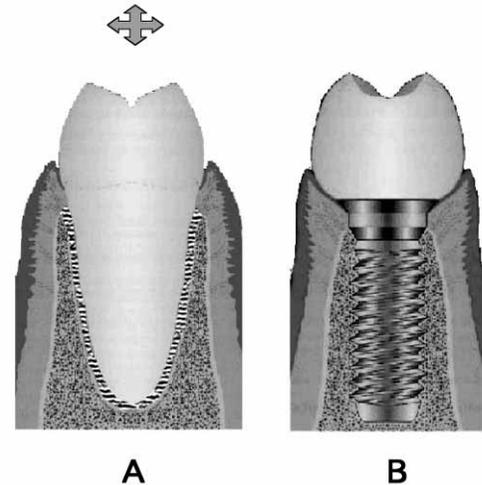


図3 天然歯と歯科インプラントの模式図

天然歯(A)においては歯根膜組織があるため、力が加わると歯が歯槽骨内で動くことが可能であるが、顎骨と密接に接している歯科インプラント(B)にはそのような可動性がない。

子を明らかにすることも望まれる。

歯周組織再生の目的でブタのエナメル基質抽出物(EMD, 商品名エムドゲイン)が臨床的に用いられている。歯根表面に適用したEMDは、セメント質、歯根膜組織、歯槽骨の再生を促進する<sup>12)</sup>。EMDの主成分はアメロジェニンであるが、その有効成分は明らかでない。ラットアメロジェニン遺伝子のスプライシング産物が、筋肉中の未分化な細胞を軟骨細胞に分化させること、また皮下に移植すると硬組織を誘導することが報告されている<sup>13)</sup>。アメロジェニン(あるいはアメロジェニン様タンパク)は何らかの分化促進作用を示すようである。一方で、EMD中にはTGF-やBMPが混入しており、これらが有効成分である可能性も報告されている<sup>14)</sup>。EMDが臨床的に有効であることは確かであるが、やはりその有効成分を解明する必要がある。

歯を失った場合の機能の回復法として、入れ歯(義歯)による治療ではなく、顎骨にネジあるいはシリンダー状の形態をした歯科インプラント(人工歯根)を埋め込み、その上に歯と同様の構造物を固定する治療法がある。歯科インプラント治療により天然歯とほぼ同様に咬むことも可能となり、この治療を受けた患者さんの満足度も高い。現在歯科インプラントの材料としては、金属のチタンあるいはチタン表面にハイドロキシアパタイトをコーティングしたものが使用されている。歯科インプラントを顎骨に埋入すると、これら2つの材料はいずれも骨に対する親和性が高いため、歯科インプラント表面と骨の間には隙間がない状態となり、歯科インプラントは顎骨内にしっかりと固定され

る。現在のような歯科インプラントが登場してから既に30年以上経過し、治療後の長期経過も良好であることが報告され、現在では歯科インプラント治療は確立された治療法となっている。

しかし、天然歯にかかる咬合力は歯根膜組織により緩衝され骨に伝達される。一方、歯科インプラントの周囲には歯根膜組織がないため、歯科インプラントにかかると咬合力は直接骨に伝達される(図3)。また、天然歯の歯根膜組織には圧受容器が分布しており歯に加わった力を感知できるが、骨に直接に接している歯科インプラントにはそのような感知機構が存在しない。したがって、天然歯と同様に歯根膜組織のある歯科インプラントの開発が望まれる。歯を再生させることは歯科医の夢であり、歯の再生プロジェクトが名古屋大学医学部の上田教授を中心に最近開始された。しかし、図1に示したような三次元構造の歯全体を再生させることはかなり困難であると予想される。一方、歯根膜細胞が存在すれば歯周組織の再生は現在でも可能であるので、天然歯と同様に歯根膜組織のある歯科インプラントを開発することは決して夢ではないと考えられる。細胞培養によって増やした歯根膜細胞を歯科インプラントの周囲に付着させ、その歯科インプラントを顎骨に埋入することにより、歯根膜組織のある歯科インプラントは可能になるかもしれない。あるいは、遺伝子導入法を用いて歯科インプラント周囲の細胞にS100A4を発現させることにより、歯科インプラント周囲に歯根膜組織を誘導できる可能性も考えられる。

## 文 献

- 1) Schafer BW, Heizmann CW: The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 21(4): 134-140, 1996.
- 2) Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S: Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene*, 14(3): 331-337, 1997.
- 3) Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG: Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*, 130(2): 393-405, 1995.
- 4) Duarte WR, Kasugai S, Iimura T, Oida S, Takenaga K, Ohya K, Ishikawa I: cDNA cloning of S100 calcium-binding proteins from bovine periodontal ligament and their expression in oral tissues. *J Dent Res*, 77(9): 1694-1699, 1998.
- 5) Duarte WR, Mikuni-Takagaki Y, Kawase T, Iimura T, Oida S, Ohya K, Takenaga K, Ishikawa I, Kasugai S: Effects of mechanical stress on the mRNA expression of S100A4 and cytoskeletal components by periodontal ligament cells. *J Med Dent Sci*, 46(3): 117-122, 1999.
- 6) Duarte WR, Iimura T, Takenaga K, Ohya K, Ishikawa I, Kasugai S: Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. *Biochem Biophys Res Commun*, 255(2): 416-420, 1999.
- 7) Duarte WR, Shibata T, Takenaga K, Takahashi E, Kubota K, Ohya K, Ishikawa I, Yamauchi M, Kasugai S: S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J Bone Mineral Res*, in press
- 8) Boyko GA, Melcher AH, Brunette DM: Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. *J Periodontol Res*, 16(1): 73-88, 1981.
- 9) Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J: The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*, 9(3): 257-265, 1982.
- 10) Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney JM, Rosen V: Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest*, 100(2): 321-330, 1997.
- 11) Morotome Y, Goseki-Sone M, Ishikawa I, Oida S: Gene expression of growth and differentiation factors-5, -6, and -7 in developing bovine tooth at the root forming stage. *Biochem Biophys Res Commun*, 244(1): 85-90, 1998.
- 12) Hammarstrom L: Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24: 658-668, 1997.
- 13) Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, Wang XS, Brownell AG, Jengh SM, Healy KE: Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem*, 275(52): 41263-41272, 2000.
- 14) Iwata T, Morotome Y, Tanabe T, Fukae M, Ishikawa I, Oida S: Noggin blocks osteoinductive activity of porcine enamel extracts. *J Dent Res*, 81(6): 387-391, 2002.