

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11342

研究課題名(和文) 歯の移動を促進する骨代謝活性化制御の新戦略：ナノ粒子を利用したDDSアプローチ

研究課題名(英文) A new strategy of bone metabolism activation to promote tooth movement:
Nanoparticle-based DDS approach

研究代表者

石田 雄之 (Ishida, Yuji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00516297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：矯正歯の移動動物モデルを用いて、SDF-1がどのような役割を果たしているか調査した結果、歯の移動時に圧迫側歯根膜にSDF-1発現が認められた。また、SDF-1/CXCR4シグナル阻害剤であるAMD3100を全身投与することで、歯の移動が継続的に抑制されるが抑制効果が経過時間依存的に減少したこと、歯の移動に関わるSDF-1、Cathepsin K、Runx2発現が減少することを明らかとした。この効果は局所投与した際も認められた。以上の結果から、矯正歯の移動時にSDF-1/CXCR4シグナルがその初期段階において大きな役割を果たしていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、これまで知られていなかった矯正力による歯の移動時の歯槽骨代謝において、ケモカインであるSDF-1が歯の移動の初期段階において発現されること、また骨折治癒などにおける関与が注目されるSDF-1/CXCR4シグナルの新たな役割が明らかとなり、SDF-1/CXCR4シグナル制御による歯槽骨代謝活性化制御法を進展させ、安全かつ効率的な歯の移動を促進する新規治療法開発の基盤研究となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role SDF-1 during orthodontic tooth movement using animal model. SDF-1 expression was recognized in the compression side of periodontal ligament during orthodontic tooth movement. In addition, continuous systemic administration of AMD 3100, which is an SDF-1 / CXCR4 signal inhibitor, results in continuous suppression of tooth movement, but the suppression effect is dependent on elapsed time, and it became clear that SDF-1, Cathepsin K, Runx2 expression decreases under administration of AMD 3100 during orthodontic tooth movement. This effect was also observed when administered locally. From the above results, it was revealed that SDF-1 / CXCR4 signal plays a major role in its early stage during corrective tooth movement.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：SDF-1 矯正歯科 歯の移動 AMD3100

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療では、歯に加えた矯正力が歯根膜を介して歯槽骨に伝わり誘発される骨代謝メカニズムを利用し、歯の移動を行う。そのため、埋伏歯など移動量が大きい部位については治療期間が長くかかってしまうことが少なくない。これまで治療期間の短縮を目的とし、歯を迅速に移動させる様々な技術・装置・補助療法が開発されてきた^{1,2}が、いまだ長期に安定した効率的な移動法は国内外を問わず確立されていない。

間質細胞由来因子 1 (Stromal cell-derived factor 1:SDF-1)はGタンパク質共役型受容体である CXCR4 のリガンドであり、SDF-1/CXCR4 シグナルが組織発生、骨髄造血、免疫制御、血管新生だけでなく、生理的骨代謝や骨折治癒に深く関わることが分かってきた^{3,4}。SDF-1 は炎症性骨破壊部位での発現が認められ、間葉系幹細胞の走化性を引き出し、血管新生を促すこと・破骨細胞発生を抑制することで、創傷治癒を促進する。そのため、SDF-1 は骨折の早期治癒を目的とした薬剤標的因子として近年研究が広く展開されている。しかし、歯槽骨代謝における SDF-1 の役割についての研究報告は殆ど見られない。

このような背景のもと応募者は、骨折治癒に対し促進的に働く SDF-1 に着目し、『SDF-1 を介した新たな歯槽骨代謝制御メカニズムの解明、および SDF-1 に対する核酸医薬を利用した歯の移動を促進する新規治療戦略の開発』を研究の全体構想として掲げ、本研究を構想した。歯の移動を促進させる方法の一つに、歯槽骨皮質骨切除術(コルチコトミー)がある。1959 年に Kole により提唱され、近年術式が改良されたことで、歯の移動を加速させる処置として多数臨床報告がなされてきた。一方、動物実験によりコルチコトミーによる歯の移動加速メカニズムに術後の限局的な歯槽骨代謝賦活化が関与していることが分かった⁸。そのような骨代謝賦活化は、骨折を起こした局部付近にも認められ、SDF-1 が G タンパク質共役型受容体である CXCR4 を介し、血管新生や代謝活性化を誘導することにより骨折後の創傷治癒を促進することが分かってきた⁹。

そこで応募者は、コルチコトミーにより誘導される歯槽骨代謝賦活化を SDF-1 発現レベルの調整により制御することが、矯正的歯の移動を促進する新規治療戦略として最適であると考えた。以上が本研究の着想に至った経緯である。

本研究では、SDF-1 遺伝子の翻訳レベルでの厳密な制御を行うため、RNA 発現抑制操作技法 (RNAi 法) と、近年薬剤キャリア粒子として注目の集まる生体吸収性を持ち核酸医薬を徐放する PLGA ナノ粒子を組み合わせることで、高い標的特異性と限定した効果持続時間により副作用の少ない新規治療法の開発につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、『mRNA 干渉により遺伝子発現を制御する siRNA 技術を用いて、近年骨折治療薬の標的リガンドとして広く研究が展開される間質細胞由来因子 1 (SDF-1)が、歯槽骨代謝賦活化モデルの歯の移動へ与える影響を、ナノ粒子を利用した DDS アプローチにより明らかにする』ものである。

本研究の具体的な目的は、ラットの歯槽骨代謝賦活化モデルの開発、歯槽骨代謝賦活化動物モデルを用いて、歯の移動時における SDF-1 の歯槽骨内発現動態の調査、siRNA の歯槽骨導入における薬剤キャリアとして、乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子の有用性の検討、ナノ粒子に封入した SDF-1 の siRNA を用いて、歯槽骨代謝賦活化における SDF-1 を介した新たな制御機構の解明および歯の移動を促進する新規治療法の探求、の 4 点である。

3. 研究の方法

(1) 歯槽骨代謝賦活化モデルの作製

ラットの歯槽骨代謝賦活化モデル作製のため、歯周組織に対し侵襲性の少ないコルチコトミー法の開発および処置後の骨代謝活性賦活化による歯の移動促進効果の検証を行う。

頬粘膜からのアプローチによるコルチコトミー法の確立

歯の移動様式の詳細な評価を行うため、侵襲を可及的に抑えたモデルを作製する必要がある。Iwasaki K は頬粘膜からラット下顎歯槽骨の骨欠損モデルの作製に成功した⁵。そこで、本研究において、先行研究の手法を参考に、頬粘膜からのアプローチにより、上顎歯槽骨の皮質骨除去を行い、生体 μ CT を用い手術様式について形態的評価を行い、術式を確立する。上顎の皮質骨除去が困難であった場合は、Iwasaki の報告通り、下顎のモデルへと変更も視野に入れている。

コルチコトミー処置後における、歯槽骨代謝活性賦活化の調査

コルチコトミー処置後の歯槽骨代謝活性の変化について、骨代謝に係る因子 (M-SCF、RANKL、OPG、OPN、BSP、OCN) をターゲットに免疫組織学的解析および生化学的解析を行う。

歯槽骨代謝賦活化モデルにおける歯の移動促進効果の評価

で確立した歯槽骨代謝賦活化モデルを用いて、実験的歯の移動実験を行う。歯の移動促進効果は、 μ CT を用いた形態学的解析により評価する。

歯槽骨代謝賦活化モデルの作製において、手技・技術的な問題が発生した場合、上顎 M1 を抜歯し M2 を近心移動させるモデルへと実験系を変更し、SDF-1 の歯槽骨代謝への関与について検討を行う。

(2) 歯槽骨代謝賦活化メカニズムと SDF-1/CXCR4 シグナルの関連についての検討
歯槽骨代謝賦活化モデルを用いて、歯槽骨代謝賦活化メカニズムにおける SDF-1/CXCR4 シグナルの関与について、免疫組織学的観察およびリアルタイム RT-PCR を用いて検証する。歯槽骨代謝賦活化メカニズムと SDF-1 との関連が認められなかった場合は、血管新生や免疫細胞の走化性に深く関与する SDF-1 の受容体である CXCR4 の関与についての検討へと調査法を切り替える。

(3) siRNA 歯槽骨導入における PLGA ナノ粒子の核酸医薬キャリアとしての有用性検討
本研究では、SDF-1 の siRNA 作製と PLGA ナノ粒子の歯槽骨に対する核酸医薬キャリアとしての有用性を生化学的解析により検証する。

SDF-1 遺伝子の siRNA の作製

SDF-1 の発現抑制を行うための siRNA を設計する。siRNA の設計に当たっては、データベースから sdf-1 遺伝子に特異的な配列を標的配列として決定し、BLAST によるホモロジーサーチを行い、他遺伝子と相同性の無いことを確認したうえで作製する予定である。発現抑制効果については、invitro の培養細胞系を用いて、生化学的解析によりノックダウン効果を検証する。

siRNA の封入した PLGA ナノ粒子の開発

PLGA はナノ粒子化する際に核酸医薬などの封入が可能であるため、将来 DDS 製剤としての期待が集まっている。ここで設計した siRNA を PLGA ナノ粒子に封入し、と同様の解析系を用いて siRNA 導入効率を評価し、PLGA 自体の分子量や成分組成を変えることで、その最適条件を探索する。

PLGA ナノ粒子を応用した歯槽骨への siRNA 導入モデルの確立

歯槽骨賦活化モデルにて作製した PLGA ナノ粒子を作用させ、遺伝子導入効果の検証を免疫組織化学的手法およびリアルタイム RT-PCR を用いて行う。

PLGA ナノ粒子を用いた siRNA 導入について期待する効果が得られない場合、SDF-1 中和抗体や SDF-1 受容体 CXCR4 の競合的アンタゴニスト(AMD-3100)による SDF-1/CXCR4 シグナルの抑制モデルへ切替える。

(4) SDF-1 の siRNA を用いた歯槽骨代謝の制御機構の解明

歯の移動時における SDF-1 を介した歯槽骨代謝の新たな制御機構を探求し、歯の移動を促進させる新規治療法の開発を目指す。

SDF-1 遺伝子抑制が歯槽骨代謝賦活化及び歯の移動に与える影響の検討

(3) にて開発した SDF-1 ナノ粒子を用いて、SDF-1 遺伝子抑制が歯槽骨代謝賦活化および歯の移動に与える影響について、組織学的手法を用いて検証する。そのメカニズムについてより詳細な検討を加えるため、レーザーマイクロディセクションを用い歯根膜、固有歯槽骨、骨膜、骨髄各々の組織における骨代謝に係る因子の発現動態の変化を、生化学的手法により詳細な調査を行う。

歯の移動に伴う歯周組織変化に SDF-1 遺伝子抑制が与える影響の調査

歯槽骨代謝賦活化モデルを用いて、SDF-1 遺伝子抑制が実験的歯の移動に伴う歯周組織の変化に与える影響について、 μ CT および組織学的手法を用いて、歯槽骨の形態変化(骨量や骨梁構造など)および歯肉の炎症性変化の解析を指標に、検証を行う。

SDF-1 遺伝子抑制を利用した歯の移動を促進する新規治療法の探求

及び の解析を通じて、歯周組織賦活化モデルに対し SDF-1 の発現抑制を行うことで、歯の移動、炎症、歯周組織の変化、代謝賦活化時間について検討を行い、PLGA ナノ粒子の最適条件を探索することで、SDF-1 を介した歯の移動を促進させる新規治療法の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) 矯正歯の移動時に圧迫側歯根膜内の SDF1 発現が上昇することを明らかにした。具体的には、矯正歯の移動モデルラットを用いて、SDF-1 の歯根膜内発現量について調査した。結果、矯正力負荷時において、圧迫側歯根膜に特異的に SDF-1 発現が認められることを国内外で初めて明らかとした。

(2) SDF-1/CXCR4 シグナル阻害剤である AMD3100 は矯正歯の移動を阻害することを明らかにした。具体的には、SDF-1/CXCR4 シグナルを競合的に阻害する AMD3100 を用いて、矯正歯の移動量や移動様式、歯槽骨に対する影響、SDF-1 の歯根膜内発現量について調査した。結果として、矯正移動直前に AMD3100 を単回投与することにより、歯の初期移動が著しく抑制されるが、2日以降の歯の移動には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(3) AMD3100 の継続投与により SDF-1/CXCR4 シグナルを阻害することで、長期間にわたって矯正歯の移動を抑制することを明らかとした。具体的には、AMD3100 は非常に代謝の早い薬剤であるため、SDF-1/CXCR4 シグナルがどのように矯正力による歯の移動に影響しているのか調査するため、AMD3100 の投与方法を振り、どのタイミングでどのフェーズに関与しているのか調査を行うため、AMD3100 を継続的に全身投与した際の、矯正歯の移動量や移動様式、歯槽骨に対する影響、SDF-1 の歯根膜内発現量について調査した。結果として、AMD3100 の継続的全身投与によって、歯の移動が継続的に抑制されるが抑制効果が経過時間依存的に減少することが明らかとなった。また、歯根膜圧迫側に認められる SDF-1 発現が低下するほか、Cathepsin

K、Runx2の発現が減少することも分かった。一方で、歯槽骨骨解析により、継続投与により骨梁数の減少、骨梁幅の増加、骨梁間隙の増加、骨梁間距離の増加が認められ、AMD3100の投与により歯槽骨代謝に影響を及ぼすことが明らかとなった。

(4) AMD3100は局所投与を行っても矯正歯の移動を阻害すること、全身投与時に認められる歯槽骨海綿骨における骨梁数の低下などの影響が、局所投与だと認められないことを明らかとした。具体的には、AMD3100の局所投与した群では、全身投与した群と比較し、前投与量は1/20と低用量であったが、同等の歯の移動に対する抑制効果およびがあった。骨解析結果からは、局所投与では全身投与では認められた歯槽骨海綿骨パラメーター(Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp、Tb.Spac)に影響は認められなかった。RNA解析では、AMD3100の継続的な局所投与により、全身投与と同様に、歯根膜内圧迫側でSDF-1、CathepsinKおよびRunx2の発現が減少する事を明らかにした。

以上の結果から、矯正歯の移動時にSDF-1/CXCR4シグナルがその初期段階において大きな役割を果たしていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hatano K, Ishida Y, Yamaguchi H, Hosomichi J, Suzuki JI, Usami-Fujita R, Shimizu Y, Shibutani N, Kaneko S, Ono T, The chemokine receptor type 4 antagonist, AMD3100, interrupts experimental tooth movement in rats, Archives Oral Biology, 査読有, 86, 2018, p35-39, 10.1016/j.archoralbio.2017.11.003

〔学会発表〕(計 2 件)

Narubhorn Ongprakobkul, Effects of AMD3100 on orthodontic tooth movement after local/systemic administration, IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, 2019
畑野香澄, SDF-1/CXCR4シグナル阻害はラット臼歯の矯正移動を遅延する、日本矯正歯科学会大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 淳一
ローマ字氏名：SUZUKI Junichi
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：特任准教授

研究者番号 (8桁): 91313858

研究分担者氏名: 細道 純
ローマ字氏名: HOSOMICHI Jun
所属研究機関名: 東京医科歯科大学
部局名: 咬合機能矯正学分野
職名: 講師
研究者番号 (8桁): 00420258

研究分担者氏名: 岩崎 剣吾
ローマ字氏名: IWASAKI Kengo
所属研究機関名: 東京医科歯科大学
部局名: 医歯学総合研究科
職名: 寄付講座講師
研究者番号 (8桁): 40401351

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 山口博之
ローマ字氏名: YAMAGUCHI Hiroyuki

研究協力者氏名: 畑野香澄
ローマ字氏名: HATANO Kasumi

研究協力者氏名: 李凱
ローマ字氏名: LI Kai

研究協力者氏名: Narubhorn Ongprakobkul
ローマ字氏名: NARUBHORN Ongprakobkul

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。