

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20606

研究課題名(和文) 歯根膜線維のリモデリング制御技術開発を基盤とした革新的短期間矯正治療法樹立の試み

研究課題名(英文) Development of the novel accelerated orthodontic therapy by controlling the orthodontic force-induced remodeling of fibrous tissue in the periodontal ligament

研究代表者

木村 仁迪(KIMURA, HITOMICHI)

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号：80733873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000 円

研究成果の概要(和文)：「三次元培養歯根膜由来EPCを利用した歯根膜線維産生法の確立とその歯科矯正治療への応用」を実現するため、三次元培養歯根膜由来血管内皮前駆細胞(EPC)の牽引ならびに機械的刺激に伴い発現が変化し、線維産生能力を変化させるキー遺伝子の同定を試みた。三次元培養法として、歯根膜由来EPCにより細胞塊を形成し、細胞塊のcollagenゲルへの移植、包埋を行いI型collagenゲルに牽引刺激を作用させる方法を検討した。歯根膜由来EPCのI型collagenゲル内での細胞塊形成とその三次元培養系への機械的刺激作用モデルは完成したが、ゲルからの細胞成分抽出が困難なため抽出方法の最適化を検討中である。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the novel accelerated orthodontic therapy by controlling the orthodontic force-induced remodeling of fibrous tissue in the periodontal ligament (PDL), we tried to identify key genes which control the ability of PDL-derived endothelial progenitor cells (EPCs) to synthesize fibrous tissue in response to the mechanical stress: we constructed spheroidal aggregation with the PDL-derived EPCs, which was subsequently embedded in type I collagen gel. Then, the mechanical force was loaded to the PDL-derived EPCs in type I collagen gel. However, we unexpectedly found that it was very difficult to extract the protein and mRNA from the PDL-derived EPCs in type I collagen gel. Therefore, we are trying to establish suitable experimental method for effective extraction of protein and mRNA from these cells in the type I collagen gel.

研究分野：矯正歯科

キーワード：歯根膜由来血管内皮前駆細胞 牽引

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療時の効率的な歯の移動のためには、牽引側歯周組織における骨形成と圧迫側歯周組織における骨吸収がバランス良く起こることに加え、歯根膜組織のリモデリングが適切に起こることが必要である。近年、歯根膜組織中に間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) が存在し、この細胞が骨やセメント質などの硬組織や靱帯組織ならびに神経組織形成能力に加え、脂肪組織や軟骨組織形成能力を持つことが報告された (Seo *et al.*, *Lancet*, 2004; Xu *et al.*, *Stem Cells Dev*, 2009; Tomokiyo *et al.*, *J Cell Physiol*, 2011)。一般的には、この MSC は骨髓組織内で増殖し、血流を介して全身の損傷組織やリモデリングが盛んな組織にホーミングした後、増殖・分化して新たな組織を形成するために働く (Ren *et al.*, *Stem Cells Transl Med*, 2012)。歯の移動において必要とされる効率的な歯周組織リモデリングのためにも、牽引側ならびに圧迫側歯周組織の効率的な間葉系幹細胞などの組織形成性細胞供給が重要なポイントになる。これまでに我々の研究グループは、歯根膜より血管内皮前駆細胞 endothelial progenitor cell (EPC) 様の血管形成能力を有する未分化間葉系細胞 SCDC2 を得て報告した (Okubo *et al.*, *J Vasc Res*, 2010)。加えて、この歯根膜由来 EPC 様細胞が血管内皮細胞 endothelial cell (EC) 分化に加え、血管構造を安定化させる働きを有する平滑筋細胞 smooth muscle cell (SMC) に分化する細胞内シグナル伝達機構を明らかにしている (Takahashi *et al.*, *Int J Mol Med*, 2012; Yoshida *et al.*, *Int J Biol Sci*, 2012)。またこの歯根膜由来 EPC 様細胞に対する牽引応力や圧迫応力が、如何なる分子メカニズム (細胞内シグナル伝達経路とそのターゲット遺伝子) を介してこの細胞の線維産生能力に影響するかについて、本研究申請者らは、二次元培養における歯根膜由来 EPC への牽引刺激を与える実験系での報告を行っている。また上皮成長因子である EGF を作用させるとこの細胞の増殖活性や遊走能に影響することを併せて報告している (Kimura *et al.*, *Cell Physiol Biochem*, 2013)

2. 研究の目的

歯科矯正治療時の歯の移動の際には、歯周組織のダイナミックなリモデリングが起

きている。そのリモデリング速度を律する働きのある歯根膜由来 EPC の線維産生能力を制御するメカニズムを解明する。特に、二次元培養での牽引刺激が線維形成性細胞の分化に影響を与えるが、より生理的条件下に近い三次元培養下での牽引刺激が歯根膜由来 EPC の線維形成性細胞の分化にどのように影響するかを調査する。また牽引刺激、圧迫刺激それぞれ別々の分子メカニズムにより、歯周組織での線維産生の誘導が起ることが予測されるので、持続的な牽引応力の刺激がある場合と持続的な圧迫刺激のある場合に分けて調査を進める。そこで、1) 我々が見いだした歯根膜由来 EPC 様細胞 SCDC2 に三次元培養下で持続的な機械的応力 (牽引刺激と圧迫刺激) を加えた際に、筋線維芽細胞マーカーである α -SMA マーカー遺伝子の発現を制御するために働く細胞内シグナル伝達経路ならびにそのターゲット遺伝子を捉える。2) その牽引刺激と圧迫刺激それぞれのターゲット遺伝子の強発現系あるいはノックダウン系ベクターを作製し、マウスを利用した矯正力による歯の移動モデルにおいて歯根膜組織に *in vivo* 遺伝子導入をすることにより、牽引側と圧迫側それぞれの歯根膜組織に線維形成が誘導されることを確認する。3) 加えて、このような遺伝子操作により、マウスの矯正治療による歯の移動に要する時間が短縮されることを確認する。1) ~ 3) により、歯科矯正力作用時の歯根膜周囲の線維産生を自在に制御可能とし、歯周組織のリモデリングの回転速度を早めることより、歯の移動時間の大幅な短縮化を実現する革新的技術を確立する。

3. 研究の方法

歯根膜由来 EPC の三次元培養法の確立と応力に応答する線維産生制御遺伝子の同定
1) 歯根膜由来血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた三次元培養法の確立と牽引刺激に応答する線維産生制御遺伝子の同定:

二次元での歯根膜由来 EPC の牽引刺激を与える細胞培養系は、I 型コラーゲン塗布磁気マイクロビーズを用いた方法 (Chan *et al.*, *J Biol Chem*, 2010) を用いている。この方法を用いて実験を開始しており、牽引刺激がコラーゲンから細胞接着分子インテグリンを介して、細胞骨格系に予測通り (ストレスファイバーの形成促進) に働く

ことを確認している。三次元培養法として、歯根膜由来 EPC により Spheroid(細胞塊)を形成し、形成した Spheroid(細胞塊)の collagen ゲルへの移築、包埋を行う。また collagen ゲルに磁気マイクロビーズを作用させ、牽引刺激を作用させる。この実験系を用いて、歯根膜由来 EPC の牽引刺激時に線維産生細胞マーカーの発現と共に変化する線維産生遺伝子を DNA アレイやプライマーアレイを利用してピックアップする。また圧迫刺激も同様の実験系を用いて調査する。

でピックアップした遺伝子が、EPC の線維産生制御遺伝子であるかどうかを牽引刺激下培養法を用いて評価する。モデル遺伝子の強発現ベクターや siRNA あるいは shRNA 発現ベクターを構築し、EPC に導入後、牽引刺激後に誘導される線維構成細胞 (EC や SMC) の分化マーカーの発現にどのように影響するかを確認し、線維産生制御キー遺伝子を *in vitro* レベルで特定する。

で用いた三次元培養法では細胞表面のインテグリンにビーズが直接接触しないことも考えられ、効率的な刺激が加わらないことも考えられる。ビーズのコラーゲンゲルへの攪拌方法を検討するとともに、右図のように、チャンバーへコラーゲンゲルと共に細胞を播種し、ゲルごと伸展させる方法も併せて検討する。線維産生制御遺伝子の発現変動が歯の移動に及ぼす影響の検証を行う。

2) *in vivo* 遺伝子導入による線維産生制御遺伝子の発現制御：

前年度に同定された制御遺伝子の強発現ベクターならびに発現抑制 (shRNA) ベクターを作製し、マウス歯根膜にエレクトロポレーション法で導入する。トランスフェクション試薬の細胞毒性や *in vivo* における影響を考慮し、プラスミドベクターの導入はエレクトロポレーションを第一選択肢とする。*In vivo* エレクトロポレーターは研究室の現有機器を使用し、電極のみを新規購入する。この方法でうまくいかない場合には脂質ベースのトランスフェクション試薬を検討する。本研究では *in vivo* への適応を考慮し、ウィルスベクターは使用しない。

組織切片作製後、*in situ* ハイブリダイゼーション法で線維形成制御遺伝子の mRNA 発現を、特異的抗体を用いた免疫染

色でタンパク質発現の増減を確認する。

3) 線維産生制御遺伝子の発現差異が矯正力に与える影響の評価：

線維産生制御遺伝子の強発現ベクターならびに shRNA ベクターが導入されたマウスに、Waldo 法 (Waldo, *J Dent Res*, 1953) にてそれぞれ擬似矯正を施す。

連続組織切片を作製後、H-E 染色で線維産生誘導能を形態学的に評価する。標本において圧迫側における骨吸収、牽引側における骨添加について評価する。さらにレーザーマイクロダイセクションで切り出して RNA を抽出し、リアルタイム PCR で血管内皮、骨芽細胞、破骨細胞のマーカー遺伝子の mRNA 発現量を解析する。

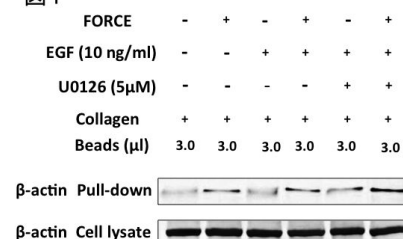
マイクロフォーカス CT で歯周組織の撮影を行い、線維産生制御遺伝子の発現差異による歯の移動距離への影響を比較、検討する。レーザーマイクロダイセクション、ならびにマイクロフォーカス CT は現有の学内共同利用機器を使用する。

4. 研究成果

1) 二次元における歯根膜由来 EPC への牽引刺激を与える細胞培養系

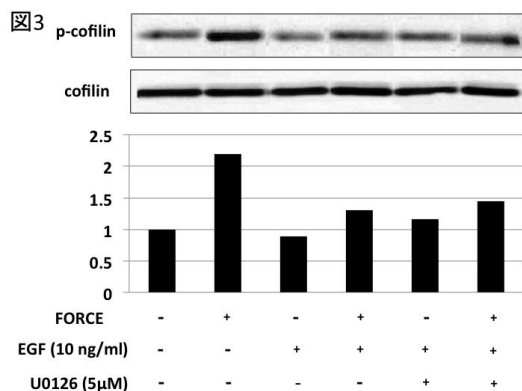
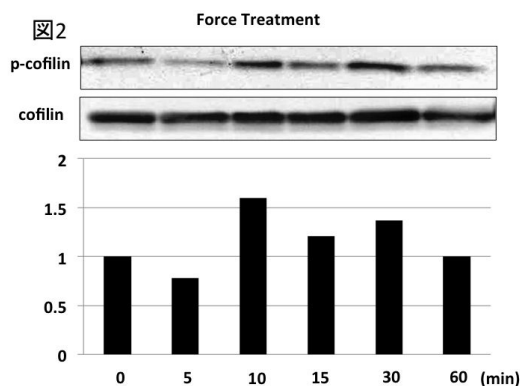
歯根膜由来 EPC への牽引刺激はコラーゲンやインテグリンを介して細胞骨格系に働いて、ストレスファイバーの形成を促進させるとともに筋線維芽細胞マーカーの発現を誘導するが、EGF がこの筋線維芽細胞マーカーの発現誘導を ERK 依存的に抑制することは以前に報告した通りである。

図 1



今回我々は、図 1 のように EGF が F-actin の形成に関与しないことを明確にした。また図 2、図 3 より、牽引力による cofilin のリン酸化 (不活性化) 誘導が EGF で抑制されることを明確にした。

以上のことより、EGF は cofilin の活性を変化させるにも関わらず、F-actin の形



成を抑制しないことから、EGF は cofilin 以外のアクチン重合に関わる分子には影響しないことがより明確とされた。これらの結果から、EGF はアクチン重合には大きな影響を与えないので転写因子 MRTF の核内移行を抑制するようには働かず、その他の分子メカニズム（核内での筋線維芽細胞分化マーカー遺伝子の転写活性そのものを ERK 依存的に抑制するなど）により、歯根膜由来 EPC の筋線維芽細胞分化を抑制することが示唆された。

2) 三次元培養法における牽引刺激

EPC の三次元培養下で確認される牽引刺激あるいは圧迫刺激に伴う線維産生能を調節するキー遺伝子を同定するため、歯根膜由来 EPC により Spheroid(細胞塊)を形成し、これを collagen ゲルへ移植・包埋した後、collagen ゲルに圧迫・牽引刺激を作用させる方法を検討した。

これまでに、EPC による Spheroid(細胞塊)形成を確認しており、また、その細胞塊を Type コラーゲンゲルへと移植し、三次元培養が適切に実施できることを確認している。しかし、ゲルに包埋された状態からの RNA やタンパク質の抽出効率が予測に反して低いことが原因し、これまでに二次元培養にて判明した牽引力によるこの細胞の線維産生能力の向上効果は、残念ながら

三次元培養ではまだ確認できていない。

以上のごとく、現在までに遺伝子レベルでの解析のための三次元培養技術を利用する研究基盤は整えられているが、サンプルの抽出方法を適正化する必要があり、今後も継続してこのサンプル調製方法について工夫を重ねて行く予定である。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

Seiji Yokota, Naoyuki Chosa, Seiko Kyakumoto, Hitomichi Kimura, Miho Ibi, Masaharu Kamo, Kazuro Satoh, and Aira Ishisaki

ROCK/actin/MRTF signaling promotes the brogenic phenotype of broblast-like synoviocytes derived from the temporomandibular joint.

International Journal of Molecular Medicine 39: 799-808, 2017

査読有り

佐藤和朗、山田裕之、桑島幸紀、木村仁迪、本多孝之、柏克彦、小林誠一郎、三浦廣行

Antley-Bixler syndrome 患者に対する第一期矯正治療の評価

東北矯正歯科学会雑誌 24.1 23-32,2016

[学会発表] (計 8 件)

横田 聖司、帖佐 直幸、衣斐 美歩、菊池 恵美子、木村仁迪、客本 齊子、加茂 政晴、佐藤 和朗、石崎 明
顎関節滑膜細胞による顎関節組織の線維化を促進する細胞内シグナル伝達機構について

第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016.11.30-12.2

横田聖司、帖佐直幸、菊池恵美子、木村仁迪、石崎 明、三浦廣行、佐藤和朗
顎関節炎症に伴う顎関節組織の変化を細胞・分子レベルで明らかにする研究

第 75 回日本矯正歯科学会大会 徳島 2016.11.7-11.9

桑島幸紀、山田裕之、木村仁迪、

菊池 宗法、西島嗣生、木澤哲也、三浦廣行、
櫻井 滋、佐藤和朗
閉塞性睡眠時無呼吸(OSA)患者における口
腔内装置の効果
日本睡眠学会第 41 回定期学術大会 東京
2016.7.7-7.8

木村仁迪、桑島幸紀、山田裕之、
菊池宗法、三浦廣行、佐藤和朗
骨格性下顎前突症患者の外科的矯正治療前
後における咽頭形態と睡眠呼吸機能の変化
第 26 回日本顎変形症学会総会・学術大会
東京 一橋 2016.6.24-6.25

木村仁迪、帖佐直幸、客本斉子、大久保
直登、加茂政晴、佐藤和朗、石崎 明
成長因子が歯周靱帯由来血管内皮前駆細胞
(EPC) の分化に与える影響について
第 88 回日本生化学会大会 神戸
2015.12.1-12.4

木村仁迪、桑島幸紀、山田裕之、
三浦廣行、佐藤和朗
骨格性下顎前突症患者と骨格性上顎前突症
患者の外科的矯正治療前後における咽頭形
態の変化
第 74 回日本矯正歯科学会大会 福岡
2015.11.18-11.20

木村仁迪、桑島幸紀、山田裕之、
菊池宗法、富岡宗弘、西島嗣生、高橋 進、
細川敬輔、木澤哲也、美藤文貴、櫻井 滋、
佐藤和朗、三浦廣行
閉塞性睡眠時無呼吸症候群患者における口
腔内装置の効果に影響する因子の検討
日本睡眠学会第 40 回定期学術大会 宇都
宮 2015.7.2-7.3

桑島幸紀、富岡宗弘、木村仁迪、山
田裕之、佐藤和朗、三浦廣行
骨格性上顎前突症患者における上下顎移動術
前後の上気道形態と睡眠呼吸機能の変化
第 25 回日本顎変形症学会総会・学術大会
神田 2015.6.4-6.5

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 仁迪 (Kimura Hitomichi)
岩手医科大学・歯学部・研究員
研究者番号：80733873

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()