

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09829

研究課題名(和文) 血行性幹細胞供給システムを利用した歯の移動制御の新戦略：核酸医薬開発に向けて

研究課題名(英文) A new strategy for controlling tooth movement using the hematogenous stem cell supply system: toward the development of nucleic acid drugs

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯の矯正移動時に歯周組織に血行性に骨髄幹細胞が供給されるメカニズムを解明し、その制御により歯の移動の薬理的制御法を模索するための研究を実施したSDF-1中和抗体投与を用いて研究を行った。その結果、歯根膜圧迫側におけるSDF-1発現上昇および破骨細胞集積が認められた。一方、SDF-1中和抗体の局所投与により、移動抑制効果および破骨細胞集積抑制効果が認められ、末梢血中のSDF-1量は変化しなかった。また、中和抗体投与中断後は速やかに歯の移動が回復された。以上より、SDF-1中和抗体の使用により、短期的で局所的な矯正歯の移動をコントロールの可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、矯正歯の移動において、歯根膜圧迫側におけるSDF-1発現が上昇すること、局所的な破骨細胞集積に局所のSDF-1が関与していること、抗SDF-1中和抗体の局所投与により歯の移動を抑制できること、中和抗体の効果が非常に短期であり投与中断により速やかに薬理効果が切れること、中和抗体の局所投与による全身性の影響が少ないことが明らかとなった。これらの知見は、SDF-1が将来的な歯の矯正移動について薬理的コントロールする治療法を開発する際のターゲット分子となる可能性が期待できる結果となり、将来の効率的で安定した矯正治療法の開発の一助になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of hematogenous stem cell supply to periodontal ligament (PDL) during orthodontic tooth movement (OTM) and to explore pharmacological control of OTM through the regulation of this mechanism, this study used a fluorescently labeled bone marrow cell transplantation model to investigate how OTM and the cell supply mechanism are interrupted by SDF-1 neutralizing antibody. Results showed increased SDF-1 expression and osteoclast accumulation in the PDL on compression side, but the transplanted fluorescent-labeled hematogenous cells were not detected. On the other hand, local administration of SDF-1 neutralizing antibody had a short-lasting inhibitory effect on OTM and osteoclast accumulation in the PDL, but no change in SDF-1 levels in the peripheral blood. Additionally, it was also found that OTM was quickly restored after administration was interrupted. These results suggest that OTM can be controlled by using SDF-1 neutralizing antibodies.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：SDF-1 ケモカイン 矯正歯の移動 中和抗体 血行性細胞集積

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療においては、歯に加えた矯正力が歯根膜を介して歯槽骨に伝わり、歯根膜の圧迫側では骨吸収を、牽引側では骨形成が、それぞれ力のかかる方向に応じて特異的に活性化することで行われることが広く知られている。しかし、その方向特異性を決定づけるメカニズムや、移動初期の骨吸収系細胞が局所に短期間に集積するメカニズムは、未だ明らかとなっていない。われわれは近年、組織再生治療薬の標的リガンドとしても広く研究が展開されるケモカインの一種である間質細胞由来因子 1 (Stromal cell-derived factor 1: SDF-1) に着目し、G タンパク質共役型受容体である CXCR4 との結合による SDF-1/CXCR4 シグナルが矯正的歯の移動に深く関わることを、世界で初めて報告した。

SDF-1/CXCR4 シグナルは、骨髄において幹細胞ニッチを形成するのに重要な役割を果たしているだけでなく、骨折治癒の際には、骨折部位に起こる局所性低酸素状態が SDF-1 発現を促し、血行を介して局所への幹細胞供給を誘導することが分かっている。一方、歯の移動時においては、圧迫側の歯根膜の血管が圧縮され、局所の低酸素が引き起こされることが示唆されていることから、圧迫側の歯根膜細胞から SDF-1 発現が促されることが想定されるが、圧迫側歯根膜に大量の破骨細胞が出現し、血行性に供給された幹細胞が歯の移動メカニズムに果たす役割については不明である。

上述の背景のもと私は、『矯正学的歯の移動における SDF-1 を介した新たな血行性幹細胞供給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制御法についての新規治療戦略の開発』を目的に掲げ、本研究を立案した。本研究の最終目標としては、SDF-1 遺伝子に対する核酸医薬と、薬剤キャリア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乳酸グリコール酸共重合体(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を目指し、実験を計画した。

2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は、

- (1) 動物モデルを用いた歯の移動時における骨髄系幹細胞を局所に誘導する SDF-1 の歯周組織内発現動態の解析
- (2) 骨髄移植モデルを用いた、歯の移動時における歯根膜の血行性幹細胞供給様態およびその分化様相の追跡
- (3) SDF-1/CXCR4 シグナル阻害による新たな歯の移動に対する薬理的制御法の探索である。

3. 研究の方法

(1) 骨髄移植モデルの作成

6 週齢の GFP 自家蛍光を発する SD-Tg (CAG-EGFP) の大腿骨、上腕骨から骨髄細胞を採取し、生理食塩水にて細胞濃度を調整した。また、レシピエントとなる 6 週齢の SD ラットの大腿骨を露出させ、骨髄内を生理食塩水で洗浄後、骨髄腔内へ調整した蛍光ラベリングされた骨髄細胞を移植した。移植細胞の評価は IVIS および切片作成後蛍光顕微鏡を用いて行った。

(2) 歯の移動モデルにおける SDF-1 発現動態の評価

移植後 1 日たったのち、移植したラットおよび未移植の対照群ラットに対し、10g NiTi 製クローリングコイルを用いて、上顎第一臼歯の近心移動を開始した。歯の移動の評価としては、移動開始後、1、3、7 日後にマイクロ CT を撮影し、歯の移動量および歯槽骨の骨プロパティの評価について行った。また、7 日後に動物を屠殺し、組織学的な評価のため切片を、生化学的評価のため mRNA の抽出を行った。切片は、HE 染色、TRAP / ALP 染色、免疫染色 (IL-1、IL-6、RANKL、CathepsinK、SDF-1) をおこない組織学的解析を行った。また、抽出した mRNA を用いて、SDF-1、CXCR4、IL-1、RANKL、OPG の RT-PCR 解析を行い評価した。

(3) 矯正的歯の移動時の、SDF-1/CXCR4 シグナル抑制による血行性骨髄系幹細胞供給メカニズムへの影響の探求

移植モデルを用いて、上記と同様の歯の移動モデルを作成し、移動させる歯の周囲に抗 SDF-1 中和抗体を毎日連続して 3 日目まで歯肉内注射し、周囲の SDF-1/CXCR4 シグナルのサイレンシングを行った。3 日目以降は注射を中断し、効果の持続期間を検討した。評価法は上記と同じ方法を用い、さらに末梢血を歯の移動後 1、3、7 日目に採取し、ELISA を用いて末梢血中の SDF-1 濃度を測定した。

4. 研究成果 (研究成果のデータは論文作成中のため未掲載)

(1) 骨髄移植モデルの作成

移植細胞の評価は、IVIS では検出が不可能であった。原因としては、GFP 蛍光の特性 (長波長ではないため介在する組織に吸収されてしまう) ならびに弱い蛍光強度が原因であると考えられる。組織学的な評価では、移植した大腿骨骨髄内に GFP 蛍光を認める細胞を確認できた。上

記結果より、歯の移動時の移植した細胞動態の評価は、IVIS ではなく組織学的解析のみを行うこととした。

(2) 歯の移動モデルにおける SDF-1 発現動態の評価

細胞移植群では、対照群と比べ、移動後 1, 3, 7 日ともに歯の移動量の減少が認められた。また、歯の移動に伴い両群ともに歯根膜圧迫側に破骨細胞の集積が認められ、牽引側には ALP 陽性細胞が認められた。しかしながら、歯根膜内に蛍光ラベリングされた細胞は細胞移植群において認められなかった。PCR 解析からは、歯の移動に伴う SDF-1、CXCR4、IL-1、RANKL 発現の上昇が認められた。以上の結果から、歯の移動に移植の処置に伴う影響が出ていることが判明した。また、矯正力の付与により歯周組織内の SDF-1 発現の上昇が認められたことから、矯正歯の移動に伴う破骨細胞集積に血行性細胞の関与が強く疑われたが、蛍光ラベリングされた細胞が観察されなかったことから、上記仮説を証明するためには移植の処置の影響を最小限に抑制する必要性、あるいはラベリング方法の変更の必要性が示唆された。

(3) 矯正歯の移動時の、SDF-1/CXCR4 シグナル抑制による血行性骨髄系幹細胞供給メカニズムへの影響の探求

SDF-1 中和抗体投与により、連続投与した期間である 3 日目までは歯の移動量の減少が認められた。一方で、投与を中断した 4 日目以降の歯の移動量は、対照群（生理食塩水投与群、IgG コントロール抗体）と同程度に回復することが分かった。組織学的解析より、中和抗体投与群では、他の対照群と比べ、歯根膜圧迫側における破骨細胞集積が抑制されていた。また、ELISA 解析からは、末梢血中の SDF-1 濃度の変化はどの群においても認められなかった。生化学的解析からは、歯周組織内の SDF-1 発現量が中和抗体投与により 3 日目まで減少が、7 日目においては軍艦の差が認められなかった。

以上の結果から、矯正歯の移動において、歯根膜圧迫側における SDF-1 発現が上昇すること、局所的な破骨細胞集積に局所の SDF-1 が関与していること、抗 SDF-1 中和抗体の局所投与により歯の移動を抑制できること、中和抗体の効果が非常に短期であり投与中断により速やかに薬理効果が切れること、中和抗体の局所投与による全身性の影響が少ないことが明らかとなった。これらの知見は、SDF-1 が将来的な歯の矯正移動について薬理的コントロールする治療法を開発する際のターゲット分子となる可能性が期待できる結果となり、将来の効率的で安定した矯正治療法の開発の一助になるとと思われる。

< 引用文献 >

- Hatano K et al. The chemokine receptor type 4 antagonist, AMD3100 ... *Arch Oral Biol.* 2018;86:35-39
- Sucur A et al. Chemokine signals are crucial for enhanced homing and ... *Arthritis Res Ther.* 2017;19:142-57.
- Kitaori T et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for ... *Arthritis Rheum.* 2009;60:813-23.
- Shinohara K et al. Stromal cell-derived factor-1 and monocyte chemotactic... *J Orthop Res.* 2011;29:1064-9.
- Liu X et al. SDF-1 promotes endochondral bone repair during fracture healing at ... *PLoS One.* 2013;8:e54077.
- Iinuma S et al. Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFR ... *J Immunol.* 2015;194:1996-2003.
- Dutta D et al. Spatiotemporal presentation of exogenous SDF-1 with PLGA ... *Biomater Sci.* 2017;5:1640-51.
- Pandita D et al. Hybrid poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: ... *Drug Discov Today.* 2014;62:227-42.
- Losi P et al. Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded ... *Acta Biomater.* 2013;9:7814-21.
- Sucur A et al. Chemokine signals are crucial for enhanced homing and... *Arthritis Res Ther.* 2017;19:142-57.
- Yoon KA et al. Fibroblast growth factor 2 supports osteoblastic niche ... *Cell Commun Signal.* 2017;15:25-

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	細道 純 (Hosomichi Jun) (00420258)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	研究計画の立案 研究の実施 専門的知識の提供

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関