

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592390

研究課題名（和文） In vivo electroporation法を用いた骨性癒着
歯根膜の再生研究課題名（英文） Regeneration of the periodontal ligament in ankylosed teeth by in
vivo electroporation

研究代表者

金香 佐和（KANEKO SAWA）

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：80372449

研究成果の概要（和文）：骨性癒着歯根膜の病態を分子細胞レベルで把握するために、歯根膜の治癒を促進するといわれている細胞増殖因子 IGF-1、創傷治癒を促進し骨形成を制御する線維芽細胞増殖因子 bFGF、血管新生を誘導する血管内皮細胞増殖因子 VEGF の発現様相を、咬合刺激低下歯モデルを用いて明らかにした。また、骨性癒着歯の発現機序に深く関与する歯槽骨代謝についても、エストロゲン欠乏や交感神経系が及ぼす影響を検討した。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathophysiology of periodontal ligament in the ankylosed tooth at a molecular cell level, we revealed patterns of expression of IGF-1 (cell growth factor), bFGF (fibroblast growth factor) and VEGF (vascular endothelial growth factor) using by occlusal hypofunction model in rat molars region. We also examined effects of SNS (sympathetic nervous system)/ovariectomy on alveolar bone loss induced by occlusal hypofunction in rats, because the pathophysiology of the ankylosed tooth was much concerned to alveolar bone remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：骨性癒着、歯根膜、再生、in vivo electroporation、石灰化抑制因子、再植

1. 研究開始当初の背景

骨性癒着歯の原因には、外傷、咬合刺激低下歯、歯科疾患、骨代謝異常、遺伝的要因などが挙げられるが、その分子細胞レベルでのメカニズムは未だ不明である。我々はこれまで、機能低下状態が歯周組織の廃用性萎縮を引き起こし、またこのような歯周組織に機械的刺激を与えると組織が再賦活化することを明らかにした。骨性癒着歯の歯周組織も廃用性萎縮を起こしていると考えられ、それを再賦活化できれば矯正臨床において大変有

意義である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨性癒着歯根膜の分子細胞レベルでの病態を解明し、歯根膜における石灰化抑制分子の同定、それが関与するシグナル伝達機構を解明し、さらに再賦活化することにより組織再生を促進させる方法を開発することである。

3. 研究の方法

(1)骨性癒着歯モデルの確立

5週齢 SD 系雄性ラットを使用し、上顎第一臼歯の再植術を施す。その後、咬合刺激を排除することにより骨性癒着を誘導する。

(2)骨性癒着歯歯根膜の病態の組織化学的・免疫組織学的検討

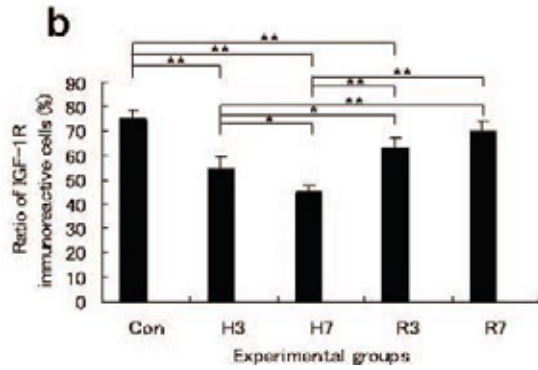
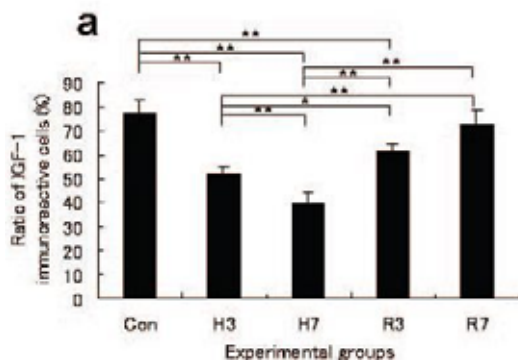
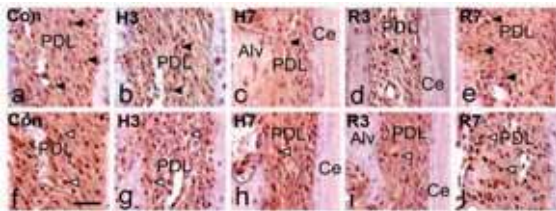
試料を固定、脱灰後、組織切片を作製し、アルカリフォスファターゼ染色を行う。BrdUの免疫染色を行い、歯根膜細胞の分化・増殖活性を解析する。Integrin、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカン、periostin、cadherinなどの細胞接着分子について、免疫染色およびRT-PCR法、Western blot法による検討を行う。

(3)in vivo electroporation 法のラット歯根膜組織への応用

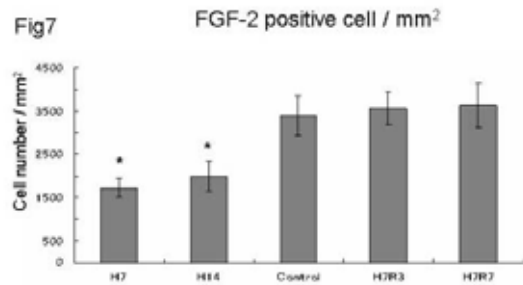
electroporation 法をラット歯根膜に使用できるよう電極を開発する。開発した電極と electroporator を用いて、前述の骨性癒着歯歯根膜で検討を行った細胞接着分子を導入する。目的の分子をコードした発現プラスミドを歯根膜に注入する。細胞にかかるパルスは歯根膜細胞に適した条件の設定を行う。プラスミド濃度や in vivo electroporation の回数といったパラメーターを変化させる。

4. 研究成果

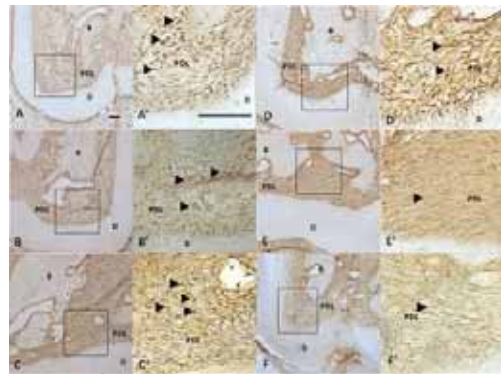
(1)機能低下歯モデルを用いて、歯根膜細胞の増殖因子の一つであり歯根膜の治癒を促進するといわれているインスリン様成長因子(IGF-1)の発現変化を検討した。機能低下歯歯根膜において IGF-1 および IGF-1 受容体の発現量は減少した。

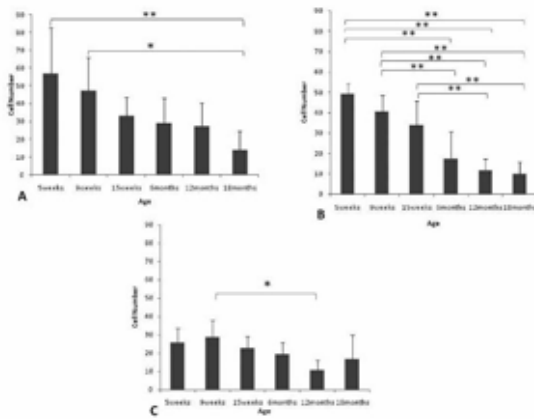


(2)再植歯モデルを用いて、創傷治癒の過程において重要な因子である線維芽細胞成長因子(bFGF)の発現変化を検討した。再植後非咬合群では骨性癒着が観察され、bFGF陽性細胞は咬合群に比べ減少していた。再植後咬合群と再植後咬合回復群では骨性癒着は観察されず、bFGF陽性細胞数は未処置群に近い値を示したことから、咬合刺激が再植歯の骨性癒着を抑制し、その機序の一つに bFGF が関与することが示唆された。



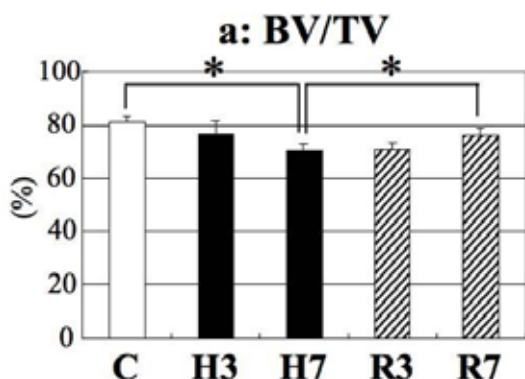
(3)創傷治癒、血管新生を促進し、骨量や骨形成を制御している線維芽細胞成長因子(bFGF)は、歯根膜において、破骨細胞の活動を増強しアルカリフォスファターゼ活性を抑制し、歯根膜細胞が石灰化物形成細胞へ分裂するのを防ぐといわれている。成長・加齢モデルにおいて、歯根膜における bFGF の発現変化を検討したところ、加齢に伴い発現低下が見られたが、咬合力の影響を大きく受けていると考えられる根分岐部においては発現が多く見られた。





(4) 血管新生を活発に誘導するといわれている血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は、メカニカルストレスを受けることでその産生量が増加することがわかっており、VEGF 受容体は骨芽細胞・破骨細胞にも発現するため、歯根膜の恒常性維持や骨リモデリングの一端を担う重要な因子と考えられる。機能低下歯モデルにおいて、歯根膜における VEGF 受容体の一つである VEGFR-2 の発現を蛍光抗体法により検出できる手法を開発した。また、機能低下歯に矯正力を与えたモデルにおいて、蛍光抗体法を用いて VEGFR-2 および CD31 の歯根膜における発現様相を明らかにした。

(5) 骨性癒着歯発現の機序には歯槽骨代謝のバランスも深く関与していると思われる。刺激低下歯モデルにエストロゲン欠乏が及ぼす影響を検討したところ、歯槽骨微細構造や骨吸収に変化が認められた。刺激低下歯モデルに交感神経系が及ぼす影響を検討したところ、刺激低下に伴う歯槽骨吸収はβアドレナリンレセプター遮断薬により抑制され、メカニカルストレスに対する歯槽骨代謝に交感神経系が関与していることが明らかとなった。



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10件)

Abbassy MA, Watari I, Soma K. The effect of diabetes mellitus on rat mandibular bone formation and microarchitecture. *European Journal of Oral Science* 査読有, 118(4), 2010, 364-9.

Jung H, Horiuchi M, Soma K. Changes in the distribution of nerve fibers immunoreactive to calcitonin gene-related peptide according to growth and aging in rat molar periodontal ligament. *The Angle Orthodontist* 査読有, 80(2), 2010, 309-15.

Shibutani N, Hosomichi J, Ishida Y, Soma K. Influence of occlusal stimuli on the microvasculature in rat dental pulp. *The Angle Orthodontist* 査読有, 80(2), 2010, 316-21.

Sako E., Hosomichi J. Alteration of bFGF Expression with growth and age in rat molar periodontal ligament. *The Angle Orthodontist*. 査読有, 80(5), 2010, 904-911.

Suzaki Y, Matsumoto Y, Kanno Z, Soma K. Pre-application of orthodontic forces to the donor teeth affects tooth transplantation prognosis. *The Angle Orthodontist* 査読有, 78(3), 2008, 495-501.

Hu FW, Hosomichi J, Kanno Z, Soma K. The influence of occlusal stimuli on basic fibroblast growth factor expression in the periodontal healing of replanted teeth. *Journal of Medical and Dental Science* 査読有, 55, 2008, 129-35.

Termsuknirandorn S, Hosomichi J, Soma K. Influences of occlusal stimuli on the expression of IGF-1 and IGF-1 receptor in the rat periodontal ligament. *The Angle Orthodontist* 査読有, 78(4), 2008, 610-616.

[学会発表](計10件)

Usumi R, Ono N, Hosomichi J, Shibutani N, Kaneko S, Ono T. Occlusal stimuli influence VEGFR-2/CD31 expressions in periodontium during tooth movement. 89th IADR, Mar 16-19, 2011, San Diego, USA.

清水康広, 細道純, 金香佐和, 小野卓史. 咬合刺激低下時における歯槽骨代謝に交感神経系が与える影響について. 第69回日本矯正歯科学会大会, 2010年9月27-29日, 横浜.

本田康二, 渡一平, 小野卓史. 咬合刺激低下はラット下顎歯槽骨微細構造に変化をもたらす. 第69回日本矯正歯科学会大会, 2010年9月27-29日, 横浜.

酒向絵美, 細道純. ラット臼歯歯根膜における塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の成長・加齢に伴う発現変化. 第68回日

本矯正歯科学会大会, 2009年11月16-18日, 福岡.

Usumi R, Ono N, Hosomichi J. Usefulness of the observation on VEGF receptor-2 in rat periodontal ligament using fluorescent antibody method. 42nd Annual Scientific Congress of the Korean Association of Orthodontists, Nov 5-7, 2009, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金香 佐和 (KANEKO SAWA)

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：80372449

(2) 研究分担者

簡野 瑞誠 (KANNO ZUISEI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40345301

小池 真理子 (KOIKE MARIKO)

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：50376779

細道 純 (HOSOMICHI JUN)

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：00420258

渡 一平 (WATARI IPPEI)

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：10431941

(3) 連携研究者

()

研究者番号：