

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592278

研究課題名（和文） 歯周組織のリモデリングを制御する細胞バイオメカニクスシグナリング機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the cellular mechanism of biomechanical signaling regulating the periodontal tissue remodeling

研究代表者

千葉 美麗（CHIBA MIREI）

東北大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：10236820

研究成果の概要（和文）：本研究は、メカニカルストレス受容により発現誘導される分子群を解析し、機能的に有効な骨改造制御分子を選択し、歯周組織に発現誘導して、改造機構の制御法を開発することを目的とし、以下のような結果を得た。メカニカルストレス負荷により歯根膜細胞と骨芽細胞は、細胞一般のおよび細胞特異的な遺伝子発現パターンの両方を示した。さらに遺伝子発現パターン解析によりいくつかのシグナル伝達経路が候補として示された。また、軟組織をターゲットとしたナノ・マイクロバブルと超音波を用いた遺伝子導入法は確立した。

研究成果の概要（英文）：The aims of this study were to investigate the mechanical-stress-induced gene expression patterns by gene profiling using microarray analysis in the cells of periodontal tissue, and to select the functionally effective molecules to regulate the bone remodeling, and then to establish the transfer method of selected gene into the periodontal tissue. The expression pattern analysis suggested that both properties common among cells and cell-specific properties affect the remodeling mechanism of periodontal tissues in response to mechanical stress. Moreover several signal pathways were identified as candidates. A non-viral gene delivery approach with nano/microbubbles and ultrasound were established for targeting soft tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000円	660,000円	2,860,000円
2011年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
2012年度	500,000円	150,000円	650,000円
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：骨改造, シグナル伝達, 歯周組織, マイクロアレイ, バイオメカニクス, 歯根膜細胞, 骨芽細胞, 超音波

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正学的な歯の移動時には、骨と歯周組織に多様なメカニカルストレスが作用し、局所に複雑なバイオメカニカルな刺激が発生する。その刺激に反応して歯周組織に誘導され発現した分子は、局所に本来存在してい

た、もしくは誘導された多様な細胞群に作用し、その刺激に対して調和のとれた改造現象を惹起し、結果として歯の移動がおこる。その複雑な改造機構を分子レベルおよび細胞レベルで明らかにすることは、速やかな矯正学的歯の移動と最小限の副作用のために重

要な課題である。

これまで我々は、*in vitro* の研究において、過度の持続的圧縮力が Caspase-8 を介する系により Caspase-3 を活性化し、直接的に骨芽細胞のアポトーシスを誘発することが明らかとした (JDR 2006)。また一方興味深いことに、歯根膜細胞は過度の持続的圧縮力に対して抵抗性を有しており、負荷した力依存性に反応して RANKL の発現を増強して破骨細胞形成を促進し (JBMR 2002)、伸展力に反応して Osteoprotegerin の発現を増強して破骨細胞形成を抑制した。

さらに歯根膜細胞は、負荷した力依存性に反応して血管新生因子 VEGF の産生も亢進し (JDR 2009)、変性組織周囲への血管形成と血流を介した未分化な細胞群を動員し、骨形成と骨吸収に直接的かつ間接的に作用し、リモデリングにおいて重要な役割を果たしていると考えられる。以上の研究成果より、細胞バイオメカニクスに対する応答により発現誘導される分子と細胞のネットワークシステムの一部が明らかとなった。

近年、我々はラットの *in vivo* 実験で、遺伝子導入の方法として、HVJ-Envelop 法 (J Period Res 2008, Gene Ther 2006, JDR 2006)、エレクトロポレーション法、ナノバブルと超音波法 (JDR 2009) の開発に成功し、歯の移動を制御しうることを示した。また歯周組織に最も有効にメカニカルストレスを誘導すると考えられる共振振動を起こす固有振動数を決定し、人為的に RANKL 発現を促進し、結果として歯の移動速度を促進した。 (AJODO 2008)。

しかしながら、これまでの我々の研究は既知の分子の解析に留まっており、未知の分子や想定外の分子には対象が及んでいない。また、メカノレセプターによるシグナル伝達機構の情報も少ない。この問題を解決するためには、網羅的解析が有効であり、最新の飛躍的に進歩したマイクロアレイとバイオインフォマティクス技術を用いることにより、正確で予見性の高い詳細な解析が可能と思われる。

2. 研究の目的

本研究では、まず (1) メカニカルストレス受容により発現誘導される分子群とシグナリング分子をマイクロアレイにより網羅的に解析し、発現分子を解明し、候補シグナル伝達経路分子を同定する。続いて、(2) 臨床応用を想定したモデル動物の歯根膜、歯槽骨およびその周囲組織に、遺伝子導入 (分子生物学的方法) および共振振動 (物理的方法) を用いて制御分子を誘導し、将来的には副作用がない人為的歯周組織リモデリング機構制御法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* におけるメカニカルストレスにより歯周組織細胞に発現誘導される分子の解析

①細胞

培養細胞は、マウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 細胞)、もしくはヒト骨芽細胞様細胞株 MG-63 またはヒト歯根膜細胞を使用した。細胞は 10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum: FBS), 100U/ml penicillin-G, および 100 μ g/ml streptomycin sulfate 含有 alpha-minimum essential medium (α MEM) を用いて 37°C, 5% CO₂ 気相下で培養した。

②メカニカルストレスの負荷方法

メカニカルストレスは圧縮力、伸展力または振動刺激を、細胞に加えた。また、培養細胞振動刺激装置を開発・評価し、それを用いて細胞に振動刺激を加えた。

③解析

1) total RNA を抽出し、マイクロアレイにより網羅的に発現解析する。解析ソフト GeneSpring™ および Ingenuity™ Pathway Analysis を用いて、発現変化のクラスタリングを行い、解析分子を絞り込んだ。

2) リアルタイム RT-PCR 法により mRNA 発現レベルを調べた。Runx2, Ostelx などの転写因子の発現を検討した。

3) 同様に刺激した細胞を固定もしくは細胞蛋白を可溶化し、特異的なモノクローナル抗体を用いて、免疫細胞化学的もしくはウエスタンブロットティング法により、ERK, JNK, p38 など MAPK ファミリーや NF κ B の蛋白の発現やリン酸化の有無を観察及び定量した。アポトーシス関連分子の発現を調べた。

4) 石灰化培地を用いた硬組織形成能、アルカリホスファターゼ活性を定量した。

(2) モデル動物におけるターゲット分子の *in vivo* 遺伝子導入法

6 週齢雄性ラットに、イソフルラン吸入麻酔下にてナノ・マイクロバブルと超音波を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子をラット歯周組織に導入し、生体発光イメージング法で遺伝子導入効率および遺伝子の発現特性を検討した。

4. 研究成果

(1) 持続的圧縮力に対するヒト歯根膜細胞もしくは骨芽細胞の遺伝子発現応答

ヒト歯根膜細胞もしくは骨芽細胞をコンフルエントの状態に培養し、その後、重さを調節したガラス円柱を介して持続的圧縮力を直接負荷した。刺激後、細胞から total RNA を抽出し、BioAnalyzer 分析で測定し、RIN (RNA integrity number) =10 を示す非分解 total RNA を用いて、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。

歯根膜細胞は、骨芽細胞に比較して抵抗性を有していた。骨芽細胞では、アポトーシスやDNA修復に関係するシグナル伝達経路の関与が示された。歯根膜細胞は、持続的圧縮力の負荷により、発現上昇する遺伝子群、発現減少する遺伝子群、不変の遺伝子群が検出された。さらに遺伝子発現パターン解析により、HIF-1 α やNF κ Bを介するシグナル伝達経路が候補としてあがった。

細胞特性の違いが、歯周組織のリモデリング機構において重要な役割を果たし、発現誘導される遺伝子群が、組織リモデリングのバランスを調節している可能性がある。

(2) 周期的伸展刺激に対する骨芽細胞の遺伝子発現応答

骨芽細胞をコンフルエントの状態に培養し、その後、周期的伸展刺激を負荷した。刺激後、細胞からtotal RNAを抽出し、非分解total RNAを用いてマイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。

周期的伸展刺激の負荷により、発現上昇する遺伝子群、発現減少する遺伝子群、不変の遺伝子群が検出された。さらに遺伝子発現パターン解析により、MAPKファミリーを介するシグナル伝達経路など、いくつかのシグナル伝達経路が候補としてあがった。

また、圧縮刺激と伸展刺激の違いにより、刺激特異的に発現上昇する遺伝子群、発現減少する遺伝子群、不変の遺伝子群が検出された。

(3) 振動刺激に対する骨芽細胞の遺伝子発現応答

振動制御器・電力増幅器・小型振動試験装置・加振ロッド・チャージアンプからなる振動付加システムおよびフォースセンサーを有するシステム制御コンピュータソフトウェアを用いて、培養細胞への振動刺激装置を開発した。装置の性能評価は加速度0-10 m/s²、周波数0-60 Hzの条件下でストレインゲージ法を用いて行った。

細胞への振動刺激は、底面がType I collagenコートしたシリコン製の6 wellプレート

(Flexcell International Corp., NC, USA)のwellの下側から振動負荷ロッドを介して行った。培養細胞への振動刺激負荷条件は加速度0、1.0 m/s²または5.0 m/s²、周波数60 Hz、振動負荷時間10 minを1回とした。細胞増殖活性に差はなかった。Real-time PCRによりRunx2およびOstelix mRNA発現上昇が観察された。

(4) Photolithography 技術を利用した微小空間培養系の細胞応答

底面にボックスタイプの微小空間マイクロパターンを付与した24wellプレートを用い、細胞増殖活性、Real-time PCRによる

mRNA発現の定量評価、細胞の形態や配向性および細胞骨格の観察を行った。骨芽細胞に最適な微小空隙を与えると、細胞外微細構造環境を認識した培養骨芽細胞は増殖活性には影響を与えなかったが、骨芽細胞への分化が促進され、actin filamentが発達し、細胞接着分子Integrin α 2と β 3 mRNA発現が有意に増強した。また、骨芽細胞分化関連遺伝子群が有意に発現上昇した。

細胞の増殖・分化さらに組織形成(再生)過程においては、細胞外基質との細胞膜接触面で働くメカニカルストレスのみならず、細胞の動きに伴って細胞内で働くメカニカルストレスが重要になることが推測される。

(5) 遺伝子導入法

ラットの歯周組織に遺伝子を導入する方法として、超音波とナノバブルを併用した遺伝子導入法を確立した。この遺伝子導入法は免疫原性がなく、繰り返し投与が可能で、非侵襲的に遺伝子を局所的に導入できることから、歯科領域でより安全に応用できる方法である。

歯肉への遺伝子導入は確立できたが、歯槽骨、歯根膜については、目的および導入部位に適した条件をさらに研究、改善が必要である。

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(9)件

①千葉美麗、太田岳、林治秀：持続的圧縮力に対するヒト歯根膜細胞および骨芽細胞の遺伝子発現応答, *Clinical Calcium* 第23巻4号599頁, 2013. (査読無)

②宮井良介, 千葉美麗, 林治秀, 骨芽細胞分化を制御する最適微小空間の検討, *Clinical Calcium*, No.21, No.5, p.116, 2011. (査読無)

③鳴澤祐香, 千葉美麗, 鈴木恵子, 村上忍, 竹山禎章, 山田章司, 五十嵐薫, 篠田壽：新規ビスフォスホネート [4-(methylthio)phenylthio] methanebisphosphonate] のanabolicな作用, *Clinical Calcium* 第21巻5号116-117頁, 2011. (査読無)

④千葉美麗, 宮井良介, 林治秀：培養表面微細構造の細胞認識, *日本実験力学会講演論文集*, No.11, 146-147, 2011. (査読無)

⑤千葉美麗, 宮井良介, 林治秀, ヒト歯根膜細胞における機械刺激誘導性発現遺伝子の解析, *日本実験力学会講演論文集*, No.10, 68-69, 2010. (査読無)

⑥R. Chen, M. Chiba, S. Mori : *In vivo* detection of cancer metastases at an early stage by vessel density with ultrasound and nano/microbubbles, *J Oral Biosci.* 52, Suppl., p96, 2010. (査読無).

⑦宮井良介, 千葉美麗, 林治秀: 微小空間的

環境における骨芽細胞の増殖及び分化について, *J.Oral Biosci.* 52, Suppl., 157, 2010. (査読無)

⑧鳴澤祐香、千葉美麗、鈴木恵子、村上忍、竹山禎章、山田章司、五十嵐薫、篠田壽 Anabolicな作用をもつ新規ビスホスフォネート [4-(methylthio) phenylthio] methanebisphosphate の作用機序, *J.Oral Biosci.* 52, Suppl., 112, 2010. (査読無)

⑨千葉美麗: 機械的刺激に対する細胞応答の実験技術—周期的伸展刺激と持続的圧縮刺激について—, *実験力学*, 第10巻, No.3:100-103, 2010. (査読無)

[学会発表] (計 21 件)

①T. Ota, M. Chiba, and H. Hayashi, Responses of Osteoblasts to Vibrational Stimulation, *IADR/AADR/CADR 91st General Session and Exhibition*, March 20-23, 2013, The Washington State Convention Center, Seattle, Wash., USA.

②M. Chiba, R. Miyai, T. Ota, H. Hayashi, The effects of micro-spatial environment for osteoblast osteogenesis, *The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2012 Annual Meeting*, October 12-15, 2012, Minneapolis Convention Center, Minneapolis, Minnesota, USA.

③R. Miyai, M. Chiba, H. Hayashi, Gene Expression Related to Osteoblast Differentiation in Mouse Calvaria-Derived MC3T3-E1 Cells Cultured in Micro-Space, *6th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (6th ISEM '11-Sendai/Kansai)*, 3-5 November, 2011, Kansai Airport Conference Halls, Osaka, Japan.

④M. Chiba and H. Hayashi, The Role of Mechanical Stretching During Skeletal Muscle Organogenesis, *6th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (6th ISEM '11-Sendai/Kansai)*, 3-5 November, 2011, Kansai Airport Conference Halls, Osaka, Japan

⑤M. Chiba, R. Miyai and H. Hayashi, Micro-spatial environment for osteoblast osteogenesis, *The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science*, 7-8 March, 2011, Sendai Plaza Hotel, Sendai, Japan

⑥M. Chiba, R. Miyai and H. Hayashi, The effects of compressive force on gene expression in human osteoblasts and periodontal ligament cells, *The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science*, 7-8 March, 2011, Sendai Plaza Hotel, Sendai, Japan

⑦M. Chiba, R. Miyai, and H. Hayashi, Micro-spatial environment for osteoblast osteogenesis studied using a photolithographic technique, *IADR/AADR/CADR 89th General*

Session and Exhibition, 16-19 March, 2011, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA

⑧M. Chiba, R. Miyai, H. Hayashi, Compressive force induced gene expression of human periodontal ligament cells, *5th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (5th ISEM'10-Kyoto)*, 4-7 November, 2010, Ryukoku University, Omiya Campus, Kyoto, Japan

⑨M. Chiba, and H. Hayashi, Mechanical-stress-induced gene expression profiling of osteoblasts and periodontal ligament cells, *IADR/AADR 88th General Session and Exhibition*, 14-17 July, 2010, Centre Convencions Internacional Barcelona, Barcelona, Spain.

⑩千葉美麗、清水良央、高橋温、鈴木敏彦、相田潤、小坂健、磯貝恵美子、木野康志、福本学、篠田壽、歯と骨を用いた被災動物内部被曝量の解析, 第55回日本放射線影響学会大会, 2012年9月6-8日、東北大学川内北キャンパス, 仙台.

⑪千葉美麗、宮井良介、太田岳、林治秀: マイクロ微小空間3次元培養系における骨芽細胞の接着と移動, *The 11th Conference on Biomechanics in Niigata*, 2012年4月28日, 29日, 新潟大学, 新潟.

⑫千葉美麗、宮井良介、林治秀、培養表面微細構造の細胞認識, 日本実験力学学会2011年度年次講演会, 2011年8月30日-9月1日, 奈良県文化会館, 奈良.

⑬宮井良介、千葉美麗、林治秀、骨芽細胞分化を制御する最適微小空間の検討, 第32回東北骨代謝研究会, 2011年2月5日, 江陽グランドホテル, 仙台.

⑭宮井良介、千葉美麗、林治秀、最適足場条件の検討-培養骨芽細胞の分化と空間について-, *The 10th Conference on Biomechanics in Sendai*, 2010年11月20-21日, 仙台市戦災復興記念館, 仙台.

⑯千葉美麗、宮井良介、林治秀、歯根膜細胞の圧縮刺激に対する応答機構, *The 10th Conference on Biomechanics in Sendai*, 2010年11月20-21日, 仙台市戦災復興記念館, 仙台

⑰陳銳、千葉美麗、森士朗, *In vivo* detection of cancer metastases at an early stage by vessel density with ultrasound and nano/microbubbles, 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月20-22日, タワーホール船堀, 東京.

⑱宮井良介、千葉美麗、林治秀、最適な骨再生条件に関する研究-微小空間的環境における骨芽細胞の増殖及び分化について-, 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月20-22日, タワーホール船堀, 東京.

⑲鳴澤祐香、千葉美麗、鈴木恵子、村上忍、竹山禎章、山田章司、五十嵐薫、篠田壽 Anabolicな作用をもつ新規ビスホスフォネート [4-(methylthio) phenylthio]

methanebisphosphonate] の作用機序. 第 52 回
歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 20 日
～22 日, タワーホール船堀, 東京.

⑳千葉美麗, 宮井良介, 林治秀, ヒト歯根膜
細胞における機械刺激誘導性発現遺伝子の
解析, 日本実験力学会 2010 年度年次講演会,
2010 年 8 月 17-19 日, 長崎大学、長崎

㉑陳銳, 森士朗, 千葉美麗, 福本学, 小玉哲也.
歯肉癌の遺伝子治療のためのナノ・マイクロ
バブルと超音波を用いた分子導入法の検討.
第 34 回日本頭頸部癌学会, 2010 年 6 月 10-11
日, 京王プラザホテル, 東京.

〔図書〕(計 4 件)

①千葉美麗「機械的刺激に対する細胞応答実
験—伸展刺激と圧縮刺激について—」, 日本
実験力学会編『よくわかる実験技術・学術用
語第二版』、北陽ビジネスフォーム株式会社,
p48-51, 2012.

②M. Chiba, R. Miyai and H. Hayashi;
Micro-spatial environment and osteoblast
osteogenesis, *Interface Oral Health Science 2011*,
110-111, 2012. (査読無) DOI:
10.1007/978-4-431-54070-0_23

③M. Chiba, R. Miyai and H. Hayashi; Gene
Expression in Human Osteoblasts and
Periodontal Ligament Cells under Compressive
Force, *Interface Oral Health Science 2011*,
112-113, 2012. (査読無) DOI:
10.1007/978-4-431-54070-0_24

④Chiba M, Miyagawa A, Igarashi K, Hayashi H.
Mechanical-stress-induced apoptosis and
angiogenesis in periodontal tissue. In: *Interface
Oral Health Science 2009*, Sasano T, Suzuki O,
editors, Tokyo: Springer, pp. 145-147, 2010. (査
読無) DOI: 10.1007/978-4-431-99644-6_27

〔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

① <http://www.iadr.com/i4a/pages/index.cfm?pageid=3429#.UcapjeBC9io>

② <http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2011/03/award20110329-01.html>

③ https://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/awardimg/prizeimg/award20110329_01.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 美麗 (CHIBA MIREI)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号 : 10236820

(2) 研究分担者

清水 良央 (SHIMIZU YOSHINAKA)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 30302152

工藤 忠明 (KUDO TADA-AKI)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 50431606

篠田 壽 (SHINODA HISASHI)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非
常勤講師
研究者番号 : 80014025

林 治秀 (HAYASHI HARUHIDE)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非
常勤講師
研究者番号 : 90107293

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :