

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 5 月 13 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592303

研究課題名（和文） 骨髄幹細胞を用いた歯科矯正学的リモデリングの促進とその分子調節機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular regulation mechanism and promotion of the orthodontic remodeling using the bone marrow stem cell

研究代表者

岡藤 範正（OKAFUJI NORIMASA）

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50194379

研究成果の概要（和文）：

1. 骨髄幹細胞が歯根膜構成細胞および歯髄細胞に分化することを確認した。
2. 骨髄由来幹細胞はリモデリングの盛んな部位に生着することを示した。
3. 骨髄幹細胞の誘導に神経が関与していることを示唆した。
4. 歯科矯正治療法の改良や新手法の開発、外傷の効果的な治療法につながる結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated the following results in this study.

1. Bone marrow stem cells have a potential to differentiate into dental pulp cells and periodontal ligament cells.
2. Bone marrow stem cells engraft in the active remodeling tissues.
3. Peripheral nerves are involved in the migration of bone marrow stem cells.
4. These results can be applied to development of new orthodontic treatment and the effective treatment of the injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯科医学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：メカニカルストレス、細胞分化、免疫組織化学、遺伝子発現、シグナリング、Runx2, Msx2, 歯周組織、骨髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄幹細胞の多分化能が明らかになり、さまざまな臓器において骨髄幹細胞の関

与が報告されている。心筋梗塞や脳梗塞等、一部の疾患では実際に骨髄幹細胞を用いた臨床応用研究が始まっており、現状では ES

細胞や iPS 細胞を用いる方法より、こちらの方が実践的で確実な治療法として期待されている。

歯科領域では、骨髄幹細胞を用いた再生医療研究は骨組織の再建等限られた領域で報告があるのみであり、今後の発展が見込まれる。歯科矯正学領域は、歯牙と骨組織が密接に関連した組織を対象としており特に期待される分野である。歯科矯正治療時には、牽引側表面に骨芽細胞、圧迫側に破骨細胞が出現し、骨組織の吸収と添加の結果「歯の移動」が起こる。この過程には骨髄幹細胞が関与していると推察されるが、歯科矯正学的牽引時の骨髄幹細胞の振る舞いについて検討した報告は殆ど無く、骨髄幹細胞の機能解明を行う生物学的意義は大きい。また骨髄幹細胞の機能解明により、な新規歯科矯正学的治療法の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化能に関する研究では、GFP マウス骨髄細胞移植実験系において、骨髄幹細胞が骨芽細胞、破骨細胞、歯根膜線維芽細胞、および歯髄細胞に分化することを確認している。

骨髄幹細胞は歯牙組織及び歯周組織を形成する全ての細胞への分化能を有しており、骨髄幹細胞を用いた歯科矯正学的治療応用への可能性を示している。以上の研究成果から、歯科矯正学的牽引時の歯根膜組織に対するメカニカルストレスの結果、骨髄幹細胞が骨芽細胞や破骨細胞に分化誘導され、また歯根膜のリモデリングにも同幹細胞が関わっているとの発想に至った。

これら一連の歯牙牽引時における骨髄幹細胞の機能解明を行うことが本研究の目的である。積極的にリモデリングの盛んな部位に骨髄幹細胞を供給することができれば、効

率的な「歯の移動」が可能になると考えられる。

3. 研究の方法

実験には ddY (♂) マウスを使用する。エーテルの吸入による全身麻酔下の実験的矯正装置装着用基盤に固定した状態にて、“歯の移動を惹起させるメカニカルストレス”を与える器材の装着を行う。装着時から経時的に歯周組織を採取し固定する。また、胎生期マウスの下顎頭を経時的に採取し固定する。

GFP トランスジェニックマウス・ラットは組織を構成する細胞の全てが GFP 蛋白を発現している。移植した骨髄幹細胞がどのような細胞に分化しても、GFP 蛋白を有する為、分化した細胞の追跡が可能である。

GFP マウス・ラット由来骨髄細胞の調整と骨髄細胞移植：GFP トランスジェニック動物をエーテル麻酔下にて屠殺し大腿骨を摘出する。抗生物質を含む RPMI 1640 培地で骨髄細胞を洗浄後、HBBS に置換、GFP マウス及びラットと同系の 6 週齢(雌)に X 線照射(10Gray)を行った後、尾静脈から 1×10^7 個の細胞を移植する。歯科矯正学的牽引には GFP 骨髄細胞移植を行ったマウス・ラットを用いる。歯牙牽引の初期組織変化、長期組織変化を観察するのに最適なモデル動物の作成を行う。歯科矯正学的牽引モデル動物の組織学的解析には歯牙構成細胞に分化した骨髄由来 GFP 陽性細胞の同定を行う為、HE 染色、免疫組織化学的染色、蛍光免疫二重染色を行う。通常のパラフィン包埋 4 ミクロン連続切片を作製し、メカニカルストレスを受けた歯周組織を確認する。確認された適切な組織切片標本に対して、各種の因子『BMP、FGF、PDGF、ILGF、TGF- β 、Runx2、Msx2、OPG、RANKL、Notch、HSP』等について免疫組織化学的検討を行う。

特に優位差が認められた因子に対しては再検討を行うと共に、染色結果の統計的処理を行う。細胞傷害、細胞分化連抗体と抗 GFP 抗体を用いた蛍光免疫二重染色を行う。

4. 研究成果

歯科矯正学的牽引時における歯周組織の早期変化、ならびに骨髄幹細胞の生体内における動態と多分化能に関する研究を行ってきた。歯科矯正学的牽引側における歯周組織の変化では、牽引側において歯根膜線維芽細胞および骨芽細胞に Runx2、Msx2、ALP、BMPs をはじめとする骨芽細胞分化関連因子の著明な発現上昇と経時的な局在の変化が生じることを明らかにした。また、メカニカルストレスに伴う歯周組織の恒常性維持と細胞分化に HSPs と神経内分泌関連因子が密接に関与していることを示した。骨髄幹細胞の歯牙および歯周組織構成細胞への分化能に関する研究では、GFP マウス骨髄細胞移植実験系において、骨髄幹細胞が骨芽細胞、破骨細胞、歯根膜線維芽細胞、および歯髓細胞に分化することを確認し、これらの前駆細胞となる骨髄由来幹細胞がおもりにモデリングの盛んな部位に生着すること、その誘導に神経が関与していることを示唆した。歯科矯正学的牽引時の歯根膜組織では、骨髄幹細胞が骨芽細胞や破骨細胞に分化誘導され、また歯根膜のリモデリングにも同幹細胞が強く関わっているとの結果から、歯牙牽引時における骨髄幹細胞の機能解明を行ったところ、メカニカルストレスによって積極的にモデリングが行われている部位に多くの骨髄幹細胞が供給されており、これらは神経内分泌関連因子の強い局在がみられる領域と一致していた。今回新規に得られた結果により骨髄幹細胞の歯科矯正学的治療応用の可能性はさらに現実味を帯びてきた。さらに矯正学的

治療法の開発に加え、外傷的ストレスを受けた組織の修復、再生を効果的治療法の開発つながら非常に有用な結果を得ることができた。

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 16 件)

①Harada T, Nakano K, Matsuda H, Muraoka R, Tomoda M, Yokoi Y, Yamada K and Okafuji N (2012) Immunohistochemical expression of osterix appearing in the mouse orthodontic periodontal tension sides. J Hard Tissue Biol **21**: 321-328. Doi: 10.2485/jhtb.21.321. 査読有

②Tomoda M, Nakano K, Muraoka R, Matsuda H, Yamada K and Kawakami T (2012) Immunohistochemical changes of heat shock protein 27 expression in the mouse periodontal tissues exposed to orthodontic mechanical stress. J Hard Tissue Biol **21**: 43-50. Doi: 10.2485/jhtb.21.43. 査読有

③村岡理奈, 中野敬介, 松田浩和, 共田真紀, 岡藤範正, 山田一尋, 川上敏行 (2011) 実験的歯科矯正力により歯根膜組織に発現する HSP70 の役割に関する一考察. J Hard Tissue Biol **20**: 275-282. Doi: 10.2485/jhtb.20.275. 査読有

④松田浩和, 原田寿久, 村岡理奈, 共田真紀, 岡藤範正 (2011) 歯科矯正力によりマウス歯周組織に発現する Osterix の免疫組織化学的観察. J Hard Tissue Biol **20**: 283-288. Doi: 10.2485/jhtb.20.283. 査読有

⑤佐藤将洋, 中野敬介, 斉藤進之介, 鍋山篤史, 岡藤範正, 山本昭夫, 笠原悦男, 長谷川

博雅, 川上敏行 (2011) Chromogranin A のマウス歯髄と歯周組織における発現. *J Hard Tissue Biol* **20**: 295-300. Doi: 10.2485/jhtb.20.295. 査読有

⑥村岡理奈, 辻極秀次, 中野敬介, 片瀬直樹, 玉村 亮, 富田美穂子, 岡藤範正, 長塚 仁, 川上敏行 (2011) 移植骨髄由来細胞の歯周組織への移動と細胞分化. *J Hard Tissue Biol* **20**: 301-306. Doi: 10.2485/jhtb.20.301. 査読有

⑦岡藤 範正, 中野 敬介, 山木貴子, 魚住智子, 横井由紀子, 安東信行, 大須賀直人, 西川康博 (2011) 実験的外傷ストレスを負荷した歯周組織変化 - 歯科矯正学的視点からの検討 -. *日外傷歯誌* **7**(1): 25-31. 査読有

⑧Nabeyama A, Nakano K, Saito S, Sato M, Okafuji N, Yamamoto A, Kasahara E and Kawakami T (2011) Immunohistochemical expression of hard tissue related factors in the mouse pulp after immediate teeth separation. *Eur J Med Res* **16**: 507-513. Doi: 10.1186/2047-783X-16-11-507. 査読有

⑨Saito S, Nakano K, Nabeyama A, Sato M, Okafuji N, Yamamoto A, Kasahara E and Kawakami T (2011) Immunohistochemical expression of heat shock protein27 in the mouse dental pulp after immediate teeth separation. *Eur J Med Res* **16**: 495-500. Doi: 10.1186/2047-783X-16-11-495. 査読有

⑩Tsujiyama H, Katase N, Sathi GA, Buery RR, Hirata Y, Kubota M, Nakano K, Kawakami T and Nagatsuka H (2011) Transplanted bone marrowderived cells differentiated to tooth, bone and connective tissues in mice. *J Hard Tissue Biol* **20**: 147-152. Doi: 10.2485/jhtb.20.147. 査読有

⑪Matsuda H, Nakano K, Muraoka R, Tomoda M, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T (2010) BMPs and related factors appearing in the mouse periodontal tissue due to orthodontic mechanical stress. *J Hard Tissue Biol* **19**: 153-160. Doi: 10.2485/jhtb.19.153. 査読有

⑫Muraoka R, Nakano K, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T (2010) Immunohistochemical expression of heat shock proteins in the mouse periodontal tissues due to orthodontic mechanical stress. *Eur J Med Res* **15**: 475-482. Doi: 10.1186/2047-783X-15-11-475. 査読有

⑬Murata M, Kawai T, Kawakami T, Akazawa T, Tazaki J, Ito K, Kusano K and Arisue M (2010) Human acid-insoluble dentin with BMP-2 accelerates bone induction in subcutaneous and intramuscular tissue. *J Ceram Soc Jpn* **118**: 438-441. Doi: 10.2109/jcersj2.118.438. 査読有

⑭Nakano K, Muraoka R, Tomida M, Matsuura S, Okafuji N, Siar CH and Kawakami T (2010) Possibility of odontoblasts activity up-regulation due to orthodontic mechanical stress in mice. *J Hard Tissue Biol* **19**: 13-16. Doi: 10.2485/jhtb.19.153. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

①HSP expression as recovery reaction in the periodontal ligament cells to mechanical stress: Muraoka R, Nakano K, Yamada K and Kawakami T, Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery (10th), November 16, 2012, Bali, Indonesia

②歯科矯正力による骨形成分化誘導のダイナミクス: 村岡理奈, 中野敬介, 渡邊武寛,

松田浩和, 共田真紀, 岡藤範正, 山田一尋, 川上敏行, 日本歯科医学会総会 (第22回) 2012年11月11日, 大阪国際会議場, 大阪市

③メカニカルストレスに対する歯髄反応のダイナミクス: 佐藤将洋, 中野敬介, 斉藤進之介, 鍋山篤史, 岡藤範正, 山本昭夫, 笠原悦男, 川上敏行, 日本歯科医学会総会 (第22回) 2012年11月10日, 大阪国際会議場, 大阪市

④マウスの歯科矯正学的牽引側歯周組織に発現する Osterix の蛍光免疫染色による検討: 松田浩和, 中野敬介, 村岡理奈, 共田真紀, 岡藤範正, 山田一尋, 日本矯正歯科学会大会 (第 71 回) 2012 年 9 月 27 日, 盛岡市民分化ホール, 盛岡市

⑤メカニカルストレスによりマウス歯髄組織に惹起される Chromogranin A : 佐藤将洋, 中野敬介, 斉藤進之介, 鍋山篤史, 岡藤範正, 山本昭夫, 笠原悦男, 長谷川博雅, 川上敏行, 硬組織再生生物学会総会 (第 21 回) 2012 年 8 月 25 日, 愛知学院大学, 名古屋市

⑥歯科矯正学的牽引側歯周組織における Osterix の蛍光免疫染色による観察: 中野敬介, 原田寿久, 松田浩和, 村岡理奈, 共田真紀, 横井由紀子, 山田一尋, 岡藤範正, 硬組織再生生物学会総会 (第 21 回) 2012 年 8 月 25 日, 愛知学院大学, 名古屋市

⑦歯間分離によりマウス歯髄に発現する HSP70 の免疫組織化学的検討: 大石真太郎, 斉藤進之介, 鍋山篤史, 中野敬介, 佐藤将洋, 横井由紀子, 大須賀直人, 岡藤範正, 川上敏行, 硬組織再生生物学会総会 (第 21 回) 2012 年 8 月 25 日, 愛知学院大学, 名古屋市

⑧Transplanted bone marrow-derived cell migration into periodontal tissues induced by orthodontic mechanical stress: Tomida M, Tsujigiwa H, Nakano K, Muraoka R, Nagatsuka H and Kawakami T,

International Congress of The Transplantation Society (24th), July 16, 2012, Berlin, Germany

⑨Migration of the transplanted bone marrow-derived cells into periodontal ligaments due to orthodontic mechanical stress: Tomida M, Tsujigiwa H, Nakano K, Muraoka R, Nakamura T, Asanuma N, Nagatsuka H and Kawakami T, Physiology 2012, July 3, 2012, Edinburgh, UK

⑩Migration and differentiation of transplanted bone marrow-derived cells into periodontal tissues promoted by mechanical stress: Kawakami T, Tsujigiwa H, Nakano K, Tomida M, Muraoka R and Nagatsuka H, Congress of the European Hematology Association (17th), June, 2012, Amsterdam, Netherland

⑪Orthodontic stress as a possible promoter of transplanted bone marrow-derived cell migration into periodontal tissues: Muraoka R, Yamada K and Kawakami T, SIDO International Congress, Follow-up in Orthodontics (XXIII), Nov 11, 2011, Roma, Italy

⑫メカニカルストレスの引き起こすマウス歯周組織における HSP27 の免疫組織化学的推移: 共田真紀, 村岡理奈, 中野敬介, 松田浩和, 山田一尋, 川上敏行, 日本矯正歯科学会大会 (第 70 回, 第 4 回国際会議) 2011 年 10 月 18 日, 名古屋国際会議場, 名古屋市

⑬歯科矯正力が引き起こすマウス歯根膜細胞における HSP27 の免疫組織化学的発現変化: 村岡理奈, 中野敬介, 松田浩和, 共田真紀, 岡藤範正, 山田一尋, 川上敏行, 日本矯正歯科学会大会 (第 70 回, 第 4 回国際会議) 2011 年 10 月 18 日, 名古屋国際会議場, 名古屋市

⑭歯科矯正学的メカニカルストレスによるマウス歯根膜組織における Osterix の発現：松田浩和，村岡理奈，共田真紀，中野敬介，山田一尋，川上敏行，日本矯正歯科学会大会（第70回，第4回国際会議）2011年10月19日，名古屋国際会議場，名古屋市

⑮矯正学的牽引側歯根膜に発現するHSP27の骨芽細胞分化誘導の分子シャペロンとしての可能性：村岡理奈，中野敬介，松田浩和，共田真紀，岡藤範正，山田一尋，川上敏行，歯科基礎医学会総会（第53回）2011年10月2日，長良川国際会議場，岐阜市

⑯マウス歯周組織における矯正学的メカニカルストレスによるHSP27の免疫組織化学的推移：共田真紀，村岡理奈，中野敬介，松田浩和，山田一尋，川上敏行，歯科基礎医学会総会（第53回）2011年10月1日，長良川国際会議場，岐阜市

⑰歯科矯正学的メカニカルストレスによるマウス歯根膜組織における Osterix の発現：松田浩和，村岡理奈，共田真紀，中野敬介，岡藤範正，山田一尋，川上敏行，歯科基礎医学会総会（第53回）2011年10月1日，長良川国際会議場，岐阜市

〔図書〕（計2件）

①Kawakami T，Nakano K，Shimizu T，Kimura A，Okafuji N，Tsuji giwa H，Hasegawa H and Nagatsuka H (2011) Histopathological and immunohistochemical background of orthodontic treatment. in Leon V E Ed: Advances in Medicine and Biology. Volume 18, p63-88, Nova Science Publishers, New York, USA; Hardcover, ISBN:978-1-61122-791-8

②Kawakami T，Nakano K，Shimizu T，Watanabe T，Muraoka R，Kimura A and Hasegawa H (2010) Chapter 6:

Immunohistochemical basis for orthodontic treatment. in Fuchs S and Auer M Ed: Biochemistry and Histochemistry Research Development. p117 - 141, Nova Science Publishers, New York, USA; Hardcover, ISBN: 978-1-60876-283-5; ebook, ISBN: 978-1-61668-932-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡藤 範正 (OKAFUJI NORIMASA)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50194379

(2) 研究分担者

中野 敬介 (NAKANO KEISUKE)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：10325095

富田 美穂子 (TOMIDA MIHOKO)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：00366329

川上 敏行 (KAWAKAMI TOSHIYUKI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：80104892

辻極 秀次 (TSUJIGIWA HIDETSUGU)
岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・准教授
研究者番号：70335628