

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593075

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞を用いた組織修復および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 the molecular mechanisms of tissue repair using stem cells

研究代表者

中野 敬介 (Nakano, Keisuke)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10325095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題で以下の結果を得た。

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. 傷害性刺激を加えた歯根膜組織ではRunx2、Msx2、ALPの発現に加え、HSPや神経内分泌関連因子の発現増強があった。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) The expression of Runx2, Msx2, ALP, Neuroendocrine-related factors and HSPs were enhanced in the periodontal ligament under injurious stimuli. 4) These results can be applied to development of new orthodontic treatment and the effective treatment of the injury.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：骨髄幹細胞 組織修復 リモデリング 分子調節機構

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。歯内・歯周病学と歯科矯正学領域は、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。また、顎骨の骨折、抜歯創の治癒、粘膜損傷の治癒など細胞増殖性病変の場合においても、その治癒を促進させる過程には骨髄幹細胞が関与すると考えられる。これらの場合における局所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、いかにして必要な場所に骨髄幹細胞を定着させるかも不明である。従って、骨髄幹細胞の機能解明を行う生物学的意義は非常に大きい。骨髄幹細胞の機能解明により、歯周疾患や外傷に対する効果的な再建修復療法や歯科矯正学的治療法の開発に繋がるのみならず、様々な臓器組織の再生修復療法に必須な根幹技術が得られる。

2. 研究の目的

骨髄幹細胞を用い、歯周組織の修復とリモデリングを促進的に生じさせると共に、骨髄幹細胞の動態および機能の全貌を明らかにし、骨髄幹細胞を用いた新規の歯周組織再建修復法、歯科矯正学的治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

1. GFP 骨髄細胞移植マウス・ラットを用いて歯周組織損傷モデル動物、歯科矯正学的牽引モデル動物の作成を行う。また同動物の組織学的解析を行い、歯周組織修復時およびリモデリング時の骨髄幹細胞の動態・機能について解析する。

2. 骨髄幹細胞由来の歯周組織構成細胞の初代培養、生化学的解析を行い、骨髄幹細胞の同構成細胞への分化機構を明らかにする。なお、骨髄幹細胞と歯周組織を構成する通常細胞との共生培養実験を行い、分化干渉作用について解析する。

3. 創傷治癒モデルマウス、骨折治癒モデルマウス、抜歯創治癒モデルマウス、矯正学的歯の移動モデルマウスに、G-CSF 等骨髄幹細胞の組織生着率を促進させる薬剤を投与し、その効果について検討する。

4. 研究成果

歯科矯正学的牽引モデル動物および歯周組織損傷モデル動物の作製を行い、歯周組織を構成する細胞ならびに骨髄幹細胞の生体内における動態と分化に関する研究を行った。歯科矯正学的牽引時における歯周組織の変化において、歯根膜組織への力学的刺激が引き起こす骨芽細胞の分化を免疫組織化学的に詳細に検討した。また、歯周組織損傷モデル動物では、歯周組織の恒常性維持や組織修復、細胞分化に HSPs や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細胞への分化能に関する研究では、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ているが、これらの前駆細胞となる骨髄幹細胞は、組織により生着の度合いが異なり、主にリモデリングが盛んな組織に生着しやすい事を示した。この結果は、歯科矯正学的牽引モデル動物を用いた実験において示された、メカニカルストレスを受け、リモデリングが盛んな歯根膜組織に骨髄幹細胞由来の細胞が多数存在していることとも一致する。これら一連の研究結果により、人為的に骨髄由来幹細胞を所定の場所へ供給することが可能であることが示された。適切な強度のメカニカルストレスもしくは傷害性刺激を歯周組織に加えることにより、効率的な幹細胞の局所への誘導、歯周組織リモデリングや修復の促進、および効率的な矯正学的歯の移動が可能になると考えられ、幹細胞の実験的局所誘導というアプローチを通じて技術的にもその可能性が強く示された。これらの結果は骨髄幹細胞を用いた組織再生や修復を効果的に行う治療法開発に具体的実現性を提供するものとなった。

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 24 件)

Zhang G, Zhou L, Ito K, Sugita Y, Nakano K, Maeda H, Wang X and Wang M (2013) Expression of TRAF6 protein and TRAF6 mRNA during different stages of deciduous tooth root physiological absorption. J Hard Tissue Biol 22: 1-6. 査読有, DOI: 10.2485/jhtb.22.1

Nakano K, Saito S, Nabeyama A, Oishi S, Sato M, Yokoi Y, Osuga N, Okafuji N and Kawakami T (2013) HSP70 expression in the mouse dental pulp after immediate teeth separation. J Hard Tissue Biol 22: 7-12. 査読有, DOI: 10.2485/jhtb.22.7

Hattori T, Nakano K and Kawakami T (2013) Phenytoin-induced elevation of the intracellular calcium concentration by stimulation of

calcium-sensing receptors in gingival fibroblasts. *Pharmacol Pharm* 4: 261-5. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.22.7

Tomida M, Tsujigiwa H, Nakano K, Muraoka R, Nakamura T, Okafuji N, Nagatsuka H and Kawakami T (2013) Promotion of transplanted bone marrow-derived cell migration into the periodontal tissues due to orthodontic mechanical stress. *Int J Med Sci* 10: 1321-6. 査読有,
DOI: 10.7150/ijms.6631

Osuga N, Matsuda S, Shoumura M, Moriyama K, Yokoi Y, Nakano K and Kawakami T (2013) Establishment of experimental periapical inflammatory lesions in mice. *J Hard Tissue Biol* 22: 517-20. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.22.517

Tomoda 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. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.21.43

Yan G, Sugita Y, Wang X, Takayama M, Jinno M, Nakano K, Kawakami T, Yang M, Lu L (2012) The value of 2-3-dimensional computed tomography for jaw osteotomies. *J Hard Tissue Biol* 21: 97-102. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.21.97

Harada T, Nakano K, Matsuda H, Muraoka R, Tomoda M, Yokoi Y, Yamada K, Okafuji N (2012) Immunohistochemical Expression of Osterix Appearing in the Mouse Orthodontic Periodontal Tension Sides. *J Hard Tissue Biol* 21: 321-328. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.21.321

Tomida M, Nakano K, Matsuura S and Kawakami T (2011) Comparative examination of subcutaneous tissue reaction to high molecular materials in medical use. *Eur J Med Res* 16:249-52. 査読有,
DOI: 10.1186/2047-783X-16-6-249

Muraki E, Nakano K, Maeda H, Takayama M, Jinno M, Kubo K, Yoshida W, Hasegawa H and Kawakami T (2011) Immunohistochemical localization of Notch signaling molecules in ameloblastomas. *Eur J Med Res* 16:253-7. 査読有,
DOI: 10.1186/2047-783X-16-6-253

Na Y, Wang Q, Nakano K, Tomida M, Kawakami T and Zhang Y (2011) L929 cell adhesion on the surface oxidized shape memory alloy. *J Hard Tissue Biol* 20:53-8. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.20.53

Tomida M, Nakano K, Sato M, Matsuura S and Kawakami T (2011) Histopathological examination of newly-developed adhesive silicone denture relining material. *Eur J Med Res* 16:328-30. 査読有,
DOI: 10.1186/2047-783X-16-7-328

Tsujigiwa H, Katase N, Sathi GA, Buery RR, Hirata Y, Kubota M, Nakano K, Kawakami T and Nagatsuka H (2011) Transplanted bone marrow-derived cells differentiated to tooth, bone and connective tissues in mice. *J Hard Tissue Biol* 20:147-52. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.20.147

Saito 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. 査読有,
DOI: 10.1186/2047-783X-16-11-495

Nabeyama 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* 16:507-13. 査読有,
DOI: 10.1186/2047-783X-16-11-507

Fijinami Y, Nakano K, Ueda O, Ara T, Hattori T, Kawakami T and Wang PL (2011) Dental caries area of rat molar expanded by cigarette smoke exposure. *Caries Res* 45:561-7. 査読有,
DOI:

Nakano K, Tomida M, Sato M, Matsuura S, Yamamoto A, Kasahara E and Kawakami T (2011) Histopathological safety evaluation of newly-developed MgO sealer. *Eur J Med Res* 16:526-30. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.16.526

Wang Q, Komori A, Maeda H, Zhang D, Zhang Y, Zhao B and Kawakami T (2011) Phase transformation and corrosion properties of surface oxidized NiTi shape memory alloy. *J Hard Tissue Biol* 20:169-76. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.20.169

Zhang G, Nakano K, Honda Y, Wang X, Wang M, Xu Y and Kawakami T (2011) Expression of TRAF6 mRNA on the resorbed surface of deciduous teeth root. *J Hard Tissue Biol* 20:177-84. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.20.177

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* 20:275-82. 査読有,
DOI: 10.2485/jhtb.20.275

[学会発表](計 41 件)

89th Congress of the European Orthodontic Society, 2013 年 6 月 29 日 レイキャビック, アイスランド, Effect of HSP70 in the periodontal ligaments remodeling due to orthodontic force. Muraoka R, Nakano K, Yamada K and Kawakami T,

89th Congress of the European Orthodontic Society, 2013 年 6 月 29 日 レイキャビック, アイスランド, Cell dynamism of the periodontal tissues remodeling elicited by orthodontic mechanical stress. Kawakami T, Nakano K, Tomida M, Muraoka R and Yamada K

The 37th International Congress of Physiological Sciences 2013 年 7 月 21 日, バーミンガム, イギリス, Cytological remodeling of the periodontal ligament tissues due to mechanical stress. Kawakami T, Tomida M, Muraoka R, Nakamura T and Nakano K

日本外傷歯学会総会・学術大会 (第 13 回) 2013 年 7 月 20 日 所沢市民文化センターミューズ, 所沢市, 外傷ストレスを負荷した歯周組織変化: 岡藤範正, 中野敬介, 魚住智子, 山木貴子, 安東信行, 安東史子, 中村曲正, 横井由紀子, 大須賀直人, 西川康弘 (日外傷歯誌 9 (2): 39, 2013)

硬組織再生生物学会 (第 22 回) 2013 年 8 月 22 日 鶴見大学歯学部, 横浜市, 歯科矯正学的メカニカルストレスによりマウス歯根膜に発現する HSP47 の分子シャペロンとしての可能性: 村岡理奈, 山田一尋, 中野敬介, 川上敏行 (抄録集 p28; *J Hard Tissue Biol* 22: 525, 2013)

硬組織再生生物学会 (第 22 回) 2013 年 8 月 22 日 鶴見大学歯学部, 横浜市, 歯科矯正学的メカニカルストレスによる歯周組織改造時における細胞動態: 宮城圭子, 富田美穂子, 中野敬介, 村岡理奈, 中村貴美, 岡藤範正, 川上敏行 (抄録集 p29; *J Hard Tissue Biol* 22: 525, 2013)

硬組織再生生物学会 (第 22 回) 2013 年 8 月 22 日 鶴見大学歯学部, 横浜市, マウスにおける実験的慢性根尖炎症性病巣の確立: 松田紗衣佳, 正村正仁, 森山敬太, 大須賀直人, 中野敬介, 川上敏行 (抄録集 p40; *J Hard Tissue Biol* 22: 528, 2013)

歯科基礎医学会総会 (第 55 回) 2013 年 9 月 21 日 岡山大学, 岡山市, 骨治癒過程における骨髄由来細胞の関与: 河合穂高, 辻極秀次, 伊藤 聡, 中野敬介, 于 湊, 川上敏行, 長塚 仁 (*J Oral Biosci* 54 (S): 120, 2013)

歯科基礎医学会総会 (第 55 回) 2013 年 9 月 21 日 岡山大学, 岡山市, 歯科的矯正学的メカニカルストレスが惹起する HSP27 のマウス歯根膜細胞における局在変化: 村岡理奈, 中野敬介, 山田一尋, 川上敏行 (*J Oral Biosci* 54 (S): 197, 2013)

日本矯正歯科学会大会 (第 72 回) 2013 年 10 月 8 日 長野県松本文化会館, 松本市 マウス歯根膜細胞に発現する HSP47 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, 川上敏行, 岡藤範正, 山田一尋 (プログラム・抄録集 p 182)

Congress of the European Hematology Association (17th), 2012 年 6 月 14 日, アムステルダム, オランダ, Migration 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 (*Hematologica* 97(s1): 729, 2012)

Physiology 2012, 2012 年 7 月 2 日, エジンバラ, イギリス, Migration 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 (Abstract book p135)

International Congress of the Transplantation Society (24th), 2012 年 7 月 15 日, ベルリン, ドイツ, Transplanted 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 (Abstract book p101)

硬組織再生生物学会 (第 21 回) 2012 年 8 月 25 日 愛知学院大学, 名古屋市, 実験的歯間分離により歯髄に発現する HSP27 の免疫組織化学的検討: 齊藤進之介, 中野敬介, 鍋山篤史, 佐藤将洋, 岡藤範正, 山本昭夫, 笠原悦男, 川上敏行 (抄録集 p21, *J Hard Tissue Biol* 22: 155, 2012.)

硬組織再生生物学会 (第 21 回) 2012 年 8 月 25 日 愛知学院大学, 名古屋市, 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(抄録集 p22 ,J Hard Tissue Biol 22: 155-6, 2012.)

硬組織再生生物学会(第21回)2012年2012年8月25日 愛知学院大学,名古屋市,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(抄録集 p30 ,J Hard Tissue Biol 22: 158, 2012.)

硬組織再生生物学会(第21回)2012年2012年8月25日 愛知学院大学,名古屋市,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(抄録集 p31 ,J Hard Tissue Biol 22: 158, 2012.)

硬組織再生生物学会(第21回)2012年2012年8月25日 愛知学院大学,名古屋市,エナメル上皮腫におけるSynaptophysinの局在:落合隆永,中野敬介,川上敏行,長谷川博雅(抄録集 p33 ,J Hard Tissue Biol 22: 158-9, 2012)

日本臨床口腔病理学会総会(第23回)2012年8月29日 東京医科歯科大学,東京,歯科矯正学的牽引側歯周組織におけるRunx2とOsterixの骨形成への分化誘導:中野敬介,川上敏行(プログラム・抄録集 p118)

歯科基礎医学会総会(第54回)2012年9月14日 奥羽大学,郡山市,歯肉線維芽細胞におけるフェニトインとカルシウム感受容体との関係:服部敏己,中野敬介,川上敏行(J Oral Biosci 54 (S): 156, 2012)

〔図書〕(計2件)

Antoh M, Fuchino T, Fujii H, Hasegawa H, Kawakami T, Machida Y, Mizutani T, Nakamura C, Nakano K, Ochiai T, Sato M, Shibuya T, Takei N, Teramoto S, Tomida M, Yumii T (2012) Kawakami T ed: Pathological Basis of Root Canal Restoration -Using Calcium Hydroxide Paste-, IDP Publishing Inc., Tokyo, Japan; Hardcover. ISBN-10: 4905130069, ISBN-13: 978-4905130062

Kawakami T, Nakano K, Shimizu T, Kimura A, Okafuji N, Tsujigiwa H, Hasegawa H and Nagatsuka H(2011)Chapter 5: Histopathological and immunohistochemical background of orthodontic treatment. In Berhardt LV ed:Advances in Medicine and Biology Volume 18. p63-88, Nova Science Publishers, New York, USA;Hardcover.

ISBN:978-1-61122-791-8; ebook,
ISBN:978-1-61209-495-3

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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, Hidetugu)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号: 70335628

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

村岡 理奈 (MURAOKA, Rina)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 20549430