

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463204

研究課題名(和文) 歯周組織リモデリングにおける細胞の供給と移動そして分化の分子調節機構

研究課題名(英文) Molecular control mechanism of cell suppling, migration and differentiation in remodeling of periodontal ligament

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 外傷性咬合による歯周組織の改造について、主としてGFP骨髄移植マウスを用いた動物実験モデルによって検討したところ、当該の歯根分岐部歯根膜には、その部位の細胞および骨髄由来細胞によりなされ、同部の修復過程にHSPの関与がある事を明らかに出来た。

歯科矯正学的実験で、牽引側、圧迫側ともに細胞の増殖を促す事が示唆され、これらの細胞増殖は未分化間葉系細胞が骨髄から移動して増加したと推測される。さらに、蛍光免疫二重染色により歯周組織に移動した骨髄由来の未分化間葉系細胞は、血管内皮細胞、マクロファージ、破骨細胞、歯根膜線維芽細胞等の歯周組織を構成する細胞へ分化したものと考えられた。

研究成果の概要(英文)： Using a model of experimental occlusal trauma in mice, we investigated cytological kinetics of periodontal ligament by means of histopathological, immunohistochemical, and photographical analysis methods. The results suggested that restoration of mechanism seemed conspicuous by osteoclasts and macrophages from bone-marrow-derived cells for the periodontal ligament at the furcation area. It was also suggested that the remodeling was strongly received the action of HSP as a suggestive molecular chaperon. Thus, this experimental model recovered using the cells in situ and the bone-marrow-derived cells.

Mechanical stress during orthodontic movement promoted the increase in the number of cells in the periodontal ligament on both tension and pressure sides. The increase in the number of cells in the periodontal ligament is believed to be due to the migration and cell division of undifferentiated mesenchymal cells.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯周組織 細胞分化 リモデリング 咬合性外傷 細胞移動 骨髄移植実験系 動物実験 修復

1. 研究開始当初の背景

歯周組織は恒常的に改造機転(リモデリング)がなされている事が知られているが、そのリモデリングに関してその全貌は明らかにされていない。歯周組織の構成細胞、組織は多種多様であるが、その主たる構成細胞は歯根膜線維芽細胞である。この歯根膜線維芽細胞は発生生物学的には、神経堤に由来する神経外胚葉性間葉である事はあまり考えられていない。

また、上記においてもその修復過程において HSP の関与が強くうかがえる。

2. 研究の目的

そこで今回、種々の臨床的条件を想定し、咬合性外傷、歯科矯正治療時の2種の条件を想定し動物実験を企画したのである。

3. 研究の方法

週齢の ddY マウス 12 匹および C57BL/6 マウス(GFP 骨髄移植マウス) 8 匹を使用した。腹腔内麻酔を行い、手製の実験台上に仰臥位で固定し、開口状態を保持した。上顎左側第一臼歯咬合面にカーバイトバーにてガイドグループを形成後、マイクロプラスクリュー(頭部径 1.7 mm, 頭部厚 0.5 mm, 全長 3.5 mm) 植立し、対合する下顎左側第一臼歯根分岐部の歯根膜を観察した。なお、対照として無処置のマウスの同部位を用いた。下顎左側第一臼歯近心から遠心方向に前頭断切片を作製し、実験開始後 4 日目, 7 日目, 14 日目の根分岐部歯根膜における細胞動態の経時的变化を、病理組織学的ならびに免疫組織化学的検討を行い、細胞核占有率および陽性細胞率を Photoshop によって画像解析した。実験期間中のマウスの体調は良好で、体重に大きな変動はなく全身的に良好に経過した。

さらに、その修復過程について次の実験を行った。使用したマウスは6週齢の ddY および C57BL/6 で、イソフルランの吸入による全身麻酔下にて上顎第一臼歯の咬合面にマイクロプラスクリュー(頭部直径 1.7mm, 頭部厚さ 0.5mm, 呼び径 1.0mm, 全長 3.5mm) を植立し、対合する下顎第一臼歯に咬合性外傷を引き起こした。観察部位は該当歯の歯根分岐部の歯根膜とした。これを病理組織学的検討するとともに必要に応じて TRAP 染色によっても検討した。実験期間は最大長2週間とし、無処置のマウスを対照群とした。

ddY マウス 10 匹を使用し、Waldo 法によって上顎第一、第二臼歯間にラバーダムを挿入、ストレスを3時間負荷した。負荷を解除して3日後、1週間後まで病理組織学的に検討し、当該部歯周組織の圧迫側と牽引側における歯周組織内の細胞数を計測した。さらに、ストレス負荷後に出現する細胞の種類を同定するため、GFP 骨髄移植マウスモデル 10 匹を使用し、同様の方法でストレスを3時間負

荷し、負荷した直後、24 時間後、1 週間後、2 週間後、6 か月後に該当部歯周組織を摘出した。GFP の免疫染色によって移植骨髄由来の細胞の発現の様相やその経時的变化を観察した。同時に各種免疫染色を併用して細胞分化の様相を明らかにした。なお、対照として無処置の同種歯根膜部を使用した。

4. 研究成果

病理組織学的検討から、対照群と比較し実験4日群は、歯根膜の充血傾向、および円形の細胞核を有する細胞の密度が上昇していた。実験7日群は実験4日群と比較して、歯根膜の細胞密度は低下していたが、歯根膜中央部における多核巨細胞の出現とセメント質および歯槽骨表面には蚕食性の吸収窩が形成されていた。実験14日群には、多核巨細胞における骨吸収窩は拡大していた。根分岐部歯根膜における細胞核占有率は、対照群と比較し実験4日群、7日群、14日群共に増加した。とくに実験4日群は有意に増加していた(Scheffe 検定、 $p < 0.05$)。実験7日群および実験14日群は対照群との有意差を認められなかった。免疫組織化学的検討から、Ki67 陽性細胞率は、実験4日群($Av \pm SD: 17.2 \pm 4.1$)に对照群($Av \pm SD: 4.4 \pm 2.2$)と比較して有意な増加がみられ(Tukey 検定、 $P < 0.05$)、実験4日群と比較して低減傾向にあるものの、実験7日群($Av \pm SD: 14.7 \pm 2.2$)でも有意な値を示し(Tukey 検定、 $P < 0.05$)、実験14日群($Av \pm SD: 9.0 \pm 3.7$)では、有意差はない(Tukey 検定、 $P > 0.05$)ものの対照群と比較して増加していた。GFP 細胞陽性率は、対照群($Av \pm SD: 8.6 \pm 1.8$)と比較して、実験7日群($Av \pm SD: 19.7 \pm 6.8$)で有意な高い値を示し(Tukey 検定、 $P < 0.05$)、実験4日群($Av \pm SD: 7.7 \pm 1.6$)、14日群($Av \pm SD: 7.6 \pm 2.7$)では、有意差を認めなかった(Tukey 検定、 $P > 0.05$)。以上の結果から、咬合性外傷歯の共通する臨床所見は、歯の振動と動揺で、咬合時の振動、歯ざしり時の歯の動揺は、歯周組織に過大な力が負荷されたことを意味する。マウスの下顎運動サイクルは、比較的単純であり、過重咬合時に加わる咬合圧を歯軸方向に負荷することにより、実験系を単純化することができ、染色方法が多岐にわたり分析しやすい。本研究では、マウスの再現性を持った実験系を確立した。マウスは、飼育しやすいなどの点でも利点をもっている。規格統一性のある頭部高径のマイクロプラスクリューをマウスの上顎第一臼歯咬合面に植立することにより、過高状態を均一に設定にすることが可能であり、実験期間中の脱離の可能性を締付けトルクによって減少することが可能である。Ki67 細胞陽性率は、実験4日群では、対照群と比較し約2倍の値であった。Ki67 は、細胞周期関連タンパク質で、増殖中の細胞において発現が認められるが、増殖を休止している細胞には認められないため、増殖細胞を検出する際に使用され

る。このことから実験4日群では、外傷を受けた歯の根分岐部歯根膜に対して、活動性の細胞が多数存在することを意味しており、恒常性維持に関与しようとしていると推察できる。GFP陽性反応の所見から、実験7日群で有意に高く増加し、実験14日群では対照群と有意差がなくなっている。GFP骨髄移植マウスは、組織を構成する細胞全てがGFPタンパクを発現しており、移植した骨髄由来細胞がどのような細胞に分化しても、GFPタンパクを有しているため、生体内追跡が可能である。骨髄移植後のマウスの歯周組織にGFP陽性細胞が多数移動していることが報告されており、その細胞も同定されている。今回の実験において、GFP骨髄移植マウスによる咬合性外傷の根分岐部における歯根膜では、実験7日群で、骨髄由来細胞が増加していることがみられた。その細胞は、破骨細胞とマクロファージであると考えられる。これは、継続的な強い咬合力により、受傷部位の歯根膜線維芽細胞だけでは、組織適応できずに、骨髄由来細胞の積極的な動員を必要とする改造現象を誘起すると考えられる。以上から、外傷性咬合により惹起される咬合性外傷の根分岐部歯根膜における受傷部位では、細胞活性の亢進を伴う経時的な歯根膜の改造現象が実験4日から急激に誘起されることが示唆され、実験7日あたりから外傷が加わった歯の根分岐部歯根膜に対して骨髄由来細胞による破骨細胞とマクロファージによる修復機転が顕著にみられるのだと考えられる。よって、咬合性外傷を受けた歯周組織は、その部位の細胞および骨髄由来細胞により、組織適応が期待できると示唆された。

なお、第2弾の研究成果では、対照群の歯根膜線維芽細胞は核と細胞質ともに紡錘形でその細胞が比較的密にあり、その間に毛細血管が介在していた。歯槽骨表面などに多核巨細胞が若干みられた。実験群の4日例では多少充血傾向があった。さらに円形のヘマトキシリンに濃く染まる細胞核をもつ細胞があり、同部位の細胞密度が上昇していた。多核巨細胞は歯槽骨表面に多少あるに過ぎなかった。7日例では4日例と比較し歯根膜線維芽細胞の密度が低下していた。一方、多核巨細胞が歯根膜の中央部に出現していた。歯根セメント質の表面と歯槽骨に蚕食性の吸収窩が形成されていた。14日例では多核巨細胞の硬組織吸収窩は拡大していた。なお今回観察した多核巨細胞はTRAP染色で陽性反応を示した。なお7日例に認められた多核巨細胞はセメント質と歯槽骨表面に移動したのであろう。以上の所見は、セメント質および歯槽骨がその表面から多核巨細胞によって活発に吸収された結果であり、実験的に過重に負荷した外傷性咬合により引き起こされたものと考えられた。

ddYマウスを用いた実験系では、負荷を解除し3日経過した組織像は、牽引側で著明

に細胞が増加していた。1週間経過したもので、紡錘形の細胞が目立つ対照群と比べ、円形の細胞が新たに出現していた。これらの変化は、圧迫側と牽引側ともに確認できた。圧迫側では、対照群(15.26±8.29)に比べ、3日後(22.11±13.98)、1週間後(33.23±11.39)も継続して細胞数が増加していた。牽引側では、対照群(AD±SD:10.37±8.69)に比べ、3日後に著しく細胞増加し(35.46±11.85)、1週間後にはやや減少した(29.23±13.89)が、対照群との比較では大きく増加していた。

GFP骨髄移植マウスモデルを用いた実験系では、メカニカルストレス負荷から2週間後になると、紡錘形の細胞だけでなく、歯周組織内に円形細胞が目立つようになった。GFP陽性細胞数(率)は、負荷直後から6か月まで緩やかに増加していた。これらのGFP陽性細胞は、CD31、CD68、Runx2などとの蛍光免疫二重染色の重ね合わせにより、破骨細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、歯根膜線維芽細胞等に分化していることが明らかになった。以上の結果から、歯科矯正学的メカニカルストレスは、牽引側、圧迫側ともに歯周組織における細胞の増殖を促す事が示唆された。GFPマウスモデルを用いた実験により、これらの細胞増殖は、歯周組織局所での細胞分裂により増えたのではなく、未分化間葉系細胞が骨髄から移動して増加したと推測される。さらに、蛍光免疫二重染色により、歯周組織に移動した骨髄由来の未分化間葉系細胞は、血管内皮細胞、マクロファージ、破骨細胞、歯根膜線維芽細胞等の歯周組織を構成する細胞へ分化したと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

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: 1321-1236 (査読有)。

岡藤範正, 中野敬介, 鍋山篤史, 山木貴子, 魚住智子, 安東信行, 横井由紀子, 大須賀直人, 西川康博 (2014) 外傷性ストレスに対する歯周組織に関する実験的歯間分離モデルによる検討。 *日外傷歯誌* 10(1): 27-33 (査読有)。

Takaya T, Mimura H, Matsuda S, Nakano K, Tsujigiwa H, Tomida M, Okafuji N, Fujii T and Kawakami T. Cytological kinetics of periodontal ligament in an experimental occlusal trauma model. *Int J Med Sci* 2015; 12: 544-551 (査読有)。

Kaneko K, Matsuda S, Muraoka R, Nakano K, Iwasaki T, Tomida M, Tsujigiwa H,

Nagatsuka H and Kawakami T. Histological evaluation of periodontal ligament in response to orthodontic mechanical stress in mice. Int J Med Sci 2015; 12: 689-694 (査読有).

Matsuda S, Yokoi Y, Moriyama K, Shoumura M, Osuga N, Nakano K and Kawakami T. Pathological examination of experimentally induced periodontal polyp in mice. J Hard Tissue Biol 24: 307-400, 2015 (査読有).

Mimura H, Takaya T, Matsuda S, Nakano K, Muraoka R, Tomida M, Okafuji N, Fujii T, and Kawakami T. Functional Role of HSP47 in the Periodontal Ligament Subjected to Occlusal Overload in Mice. Int J Med Sci 13(4): 248-254, 2016 (査読有).

[学会発表](計 12件)

日本外傷歯学会総会・学術大会(第14回)2014年7月(大阪歯科大学,大阪) 外傷ストレスを負荷した歯周組織変化 実験的歯間分離による検討. 岡藤範正, 中野敬介, 魚住 智子, 山木貴子, 安東 信行, 鍋山 篤史, 横井由紀子, 大須賀直人, 西川康弘.

硬組織再生生物学会(第22回)/The 7th Asian science seminar in Taiwan 2014年8月(台中大学,台中,台湾)

移植骨髄由来細胞の歯周組織への移動と細胞分化. 辻極秀次, 村岡理奈, 中野敬介, 富田美穂子, 高島清文, 玉村 亮, 長塚 仁, 川上敏行(プログラム抄録集 p30; J Hard Tissue Biol 23: 470, 2014)

硬組織再生生物学会(第22回)/The 7th Asian science seminar in Taiwan 2014年8月(台中大学,台中,台湾)

マウスに惹起させた歯根膜息肉の病理学的検討. 松田紗衣佳, 中野敬介, 正村正仁, 大須賀直人, 辻極秀次, 川上敏行(プログラム抄録集 p41; J Hard Tissue Biol 23: 473, 2014)

硬組織再生生物学会(第22回)/The 7th Asian science seminar in Taiwan 2014年8月(台中大学,台中,台湾)

歯科矯正学的メカニカルストレスによる歯周組織の改造現象. 村岡理奈, 金子圭子, 中野敬介, 山田一尋, 川上敏行(プログラム抄録集 p42; J Hard Tissue Biol 23: 473, 2014)

歯科基礎医学会総会(第55回)2013年9月(福岡国際会議場,福岡)

実験的に惹起させた歯根膜息肉の病理組織学的検討. 松田紗衣佳, 中野敬介, 正村正仁, 大須賀直人, 辻極秀次, 川上

敏行(プログラム抄録集 p159)

歯科基礎医学会総会(第55回)2013年9月(福岡国際会議場,福岡)

マウスに惹起した咬合性外傷の病理組織学的検討. 三村泰亮, 高谷達夫, 中野敬介, 松田紗衣佳, 岡藤範正, 大須賀直人, 川上敏行, 藤井健男(プログラム抄録集 p161)

歯科基礎医学会総会(第55回)2013年9月(福岡国際会議場,福岡)

歯根膜における実験的咬合性外傷の細胞動態. 高谷達夫, 三村泰亮, 松田紗衣佳, 中野敬介, 川上敏行, 岡藤範正, 大須賀直人(プログラム抄録集 p176)

日本臨床口腔病理学会総会(第26回)2015年7月29-31日(北海道大学 札幌) 金子圭子, 松田紗衣佳, 辻極秀次, 中野敬介, 長塚 仁, 川上敏行: 歯科矯正学的メカニカルストレスによるマウス歯周組織改造における細胞動態. プログラム・抄録集 p107, 2015

硬組織再生生物学会(第23回)2015年8月22日(大阪歯科大学,大阪)

三村泰亮, 高谷達夫, 中野敬介, 松田紗衣佳, 富田美穂子, 岡藤範正, 藤井健男, 川上敏行. 実験的咬合性外傷における歯根膜中のHSP47の発現推移.(プログラム・抄録集 p41; J Hard Tissue Biol 24: 490, 2015)

硬組織再生生物学会(第23回)2015年8月22日(大阪歯科大学,大阪)

村岡理奈, 松田浩和, 山田一尋, 中野敬介, 川上敏行. メカニカルストレスが惹起するマウス歯根膜におけるHSP70の免疫組織化学的発現推移.(プログラム・抄録集 p42; J Hard Tissue Biol 24: 409, 2015)

硬組織再生生物学会(第23回)2015年8月22日(大阪歯科大学,大阪)

高谷達夫, 三村泰亮, 松田紗衣佳, 中野敬介, 辻極秀次, 富田美穂子, 岡藤範正, 藤井健男, 川上敏行. 実験的咬合性外傷における歯周組織変化.(プログラム・抄録集 p43; J Hard Tissue Biol 24: 409, 2015)

International Congress of the Italian Society of Orthodontics (46th), Milano, Italia, October, 2015

Muraoka R, Kurata K, Nakano K, Yamada K, Kawakami T. HSP27 expression as a possible molecular chaperone in the periodontal ligament cells due to orthodontic mechanical stress.

〔図書〕(計 0件)

〔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 なし

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

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

(3) 研究分担者

中野 敬介 (NAKANO Keisuke)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10325095

(4) 研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA Hidetsugu)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号：00366329

(5) 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