

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861804

研究課題名(和文) 歯科矯正治療による歯周組織の傷害と回復の分子調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular regulation mechanism of injury and recovery of periodontal tissue by orthodontic treatment

研究代表者

村岡 理奈 (Muraoka, Rina)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20549430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、骨髄幹細胞を用いて歯科矯正学的メカニカルストレスによる歯周組織の細胞傷害と回復の分子調節機構の解明をすることである。歯周組織に負荷されたメカニカルストレスは、骨髄からの歯周組織への未分化間葉系の細胞の移動を長期間にわたり促進して、それら未分化間葉系細胞が歯周組織にて歯根膜特有の線維芽細胞等の歯根膜構成細胞へ分化していると考えられる。

またマウス歯根膜線維芽細胞におけるHSP47は、メカニカルストレスが負荷され、歯根膜線維芽細胞が強いダメージを受けることによってその発現量を増大させ、歯根膜線維芽細胞の活性化によるコラーゲン組織の修復に関与し、細胞傷害に対する回復反応に寄与している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to determine the cell dynamics in periodontal ligament in response to mechanical stress during orthodontic movement. 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. Also HSP47 is expressed in PDL fibroblasts on the compressed side damaged by application of mechanical stress and contributes to the repair of collagen tissue by activating PDL fibroblasts, supporting recovery from cell damage. HSP47 investigated in this study acts differently depending of the time of expression.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯周組織 歯根膜 メカニカルストレス 歯科矯正 修復 リモデリング

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積極的関与が報告されている。歯科領域では、骨髄幹細胞を用いる再生医療研究は骨組織の再建等極めて限られた領域での報告があるのみであり、今後の発展が見込まれる研究である。

歯科矯正学領域は、歯と骨組織が密接に関連した組織を対象としており、とくに期待される分野である。歯科矯正治療時に起こる組織学的変化としての骨の改造に直接関与するサイトカインの動態、また歯根膜構成細胞の変化について、これを矯正学的メカニカルストレスが引き起こす歯周組織改造現象として捉え、その起因因子として細胞傷害因子と捉えて取り扱った研究は少ない。したがって、細胞傷害に対する回復反応として「歯根膜の改造機転」を捕らえると「細胞分化と増殖」についての研究が必要である事が理解できる。

また、口腔の、とくに歯科矯正学的な歯の移動時によって起こる歯周組織の改造現象における骨髄幹細胞の振る舞いを検討した報告は無く、骨髄幹細胞に着目して骨組織リモデリング機構解明を試みた研究は研究代表者らの報告以外に無い。すなわち、骨髄幹細胞の機能解明を行う生物学的意義は大きい。そして骨髄幹細胞の機能解明により、将来的に効果的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

骨髄幹細胞が歯牙組織および歯周組織を形成する多くの細胞への分化能を有していることは、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。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負荷の結果、骨髄幹細胞が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予測し、これら一連の歯の牽引時における骨髄幹細胞の機能解明を行い、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。

そこで本研究の目的は、骨髄幹細胞を用いて歯科矯正学的メカニカルストレスによる歯周組織の細胞傷害と回復の分子調節機構の解明およびその制御法について解明すると共に、骨髄幹細胞を用いた新規歯科矯正学的治療法の開発につながるよう、骨髄幹細胞の動態および機能の全貌を明らかにすることである。

3. 研究の方法

骨髄幹細胞移植を行なったマウスを用い、

GFP 骨髄細胞移植マウスの臼歯を歯科矯正学的に牽引し、メカニカルストレス負荷後の歯根膜組織とくに歯根膜線維芽細胞の受ける細胞傷害の病理組織学的ならびに免疫組織化学的検討および周囲骨組織における骨髄幹細胞の関与について解明する。

研究材料：実験動物として GFP トランスジェニックマウスを用いる。GFP トランスジェニックマウスは組織を構成する細胞の全てが GFP 蛋白を発現している。この GFP (Green Fluorescent Protein; 緑色蛍光タンパク質) は、青色の光を吸収して緑色の蛍光を発する分子量約 29 kDa のタンパク質である。そのため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 トランスジェニックマウス由来骨髄細胞の移植：GFP マウス由来骨髄細胞の調製と骨髄細胞移植：GFP トランスジェニックマウスの大腿骨を摘出し、抗生剤を含む 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 (10 Gray) を行った後、尾静脈から 1×10^7 個の細胞を移植する。

歯科矯正学的牽引モデル動物の作成：GFP 骨髄細胞移植を行ったマウスを用い歯科矯正学的牽引モデル動物を作成し、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：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。

4. 研究成果

歯科矯正学的牽引時にける歯周組織の変化では、歯科矯正学的メカニカルストレスは、圧迫側、牽引側ともに歯周組織における細胞数の増加を促すことが示唆された。

そしてこれらの細胞増加が 1 週間という短期間で起きている点から、細胞が歯周組織で増殖し、構成細胞へ分化しているとは考えにくい。増加した細胞の種類と同定とその由来について追究してところ、マウス歯周組織に、歯科矯正学的メカニカルストレスを付与した実験群の GFP 陽性細胞の含有率が対照群を比べて明らかな有意差を持って高いことが示された。この GFP 陽性細胞は、メカニカルストレスを受けた直後から増加し、少なくとも 6 か月経過後にも継続して増加していた。この GFP 陽性細胞の存在から、メカニカルストレスにより増殖した細胞は、歯周組織による細胞分化ではなく、骨髄より移動した細胞が占有していると推測される。以上のこ

とから、歯周組織に負荷されたメカニカルストレスは、骨髄からの歯周組織への未分化間葉系の細胞の移動を長期間にわたり促進して、それら未分化間葉系細胞が歯周組織にて歯根膜特有の線維芽細胞等の歯根膜構成細胞へ分化していると考えられる。

それらを確認するため、骨髄幹細胞の歯周組織構成細胞への分化能に関する実験を行った。GFP マウス骨髄細胞移植実験において、歯周組織内に移動した骨髄由来細胞は、未分化間葉系の細胞からマクロファージ、破骨細胞、歯周組織特有の線維芽細胞等、歯周組織を主に構成する細胞へと分化する。このように骨髄幹細胞が歯牙組織および歯周組織を形成する多くの細胞への分化能を有していることは、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。

さらに、歯科矯正学的メカニカルストレスは、歯周組織におけるタンパクの構造変化をもたらす種々の分子を誘導することから、歯科矯正学的メカニカルストレスの負荷によるマウス歯根膜組織における各種タンパクのうち HSP47 の発現動態および歯根膜の回復機構における HSP47 の発現推移を観察した。

歯科矯正学的メカニカルストレス負荷によって歯根膜が伸展された牽引側では、ストレス負荷 1 時間以内で歯根膜線維芽細胞および骨芽細胞に Runx2、Msx2、ALP 蛋白の局在と強いシグナルを確認しており、これら骨形成系のタンパクと時期を同じくして HSP47 は発現していた。牽引側歯根膜に骨添加が行われる際に、HSP47 も骨形成系タンパクの成熟を介添えし、骨芽細胞活性化の一助となる分子シャペロン機能を持っていることが示唆された。一方で、一時的な時間だけ牽引側歯根膜にメカニカルストレスが負荷されて、骨添加に至らずに歯根膜線維芽細胞のコラーゲン構造に異常をきたした場合には、HSP47 がその受傷部位に機能することによって、異常コラーゲンの細胞外への分泌を阻害し、変性タンパク質を小胞体に留めて、歯根膜の特徴である非石灰化を制御している可能性がある。すなわち HSP47 は、発現時間軸によって異なる働きを担うことが示唆された。また HSP47 は、非ストレス下においても構成的に発現し、細胞を各種ストレスから防御してホメオスタシス維持に関与していると考えられる。マウス歯根膜線維芽細胞における HSP47 は、メカニカルストレスが負荷され、歯根膜線維芽細胞が強いダメージを受けることによってその発現量を増大させ、歯根膜線維芽細胞の活性化によるコラーゲン組織の修復に関与し、細胞傷害に対する回復反応に寄与している。

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 3 件)

Muraoka R, Nakano K, Yamada K, Kawakami T. HSP47 as a Possible Molecular Chaperone for the Collagen Synthesis in the Mouse Periodontal Ligament Cells due to Orthodontic Force. *Int J Dentistry Oral Sci.* 4(1): 387-394, 2017. DOI: dx.doi.org/10.19070/2377-8075-1700078 (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: 248-54, 2016. DOI: 10.7150/ijms.14129 (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.* 12(9): 689-694, 2015. DOI:10.7150/ijms.12883 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

Muraoka R, Nakano K, Matsuda H, Kurata K, Yamada K, Kawakami T. HSP70 expression as recovery reaction in the mouse periodontal tissues: American (45th) and Canadian (40th) Association for Dental Research 2016 (AADR/CADR) Annual Meeting & Exhibition, Los Angeles, CA, USA, March, 2016 (Abstract #1429; Web Abstract: <https://aadr2016.zerista.com/poster/member/56320>)

Muraoka R, Nakano K, Yamada K, Kawakami T. HSP70 in recovery of the mouse PDL by mechanical stress : The 13th Biennial Congress of European Association of Oral Medicine (EAOM) Incorporating the World Workshop on Oral Medicine, Torino, Italy, September, 2016 (Abstract: A12; Oral Dis 22 (S2): 12, 2016)

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. The 46th International Congress of the Italian Society of

Orthodontics, Italy, Milano, October, 2015. (Web Abstract)

Muraoka R, Kaneko K, Nakano K, Yamada K and Kawakami T. Periodontal Tissue Remodeling due to Orthodontic Mechanical Stress. The 7th Asian Science Seminar in TAIWAN, 第 23 回硬組織再生生物学会学術大会総会. 2014 年 8 月 (Abstract; p 42)

〔図書〕(計 1 件)

Kawakami T, Tsujigiwa H, Takaya T, Kaneko K, Mimura H, Matsuda S, Muraoka R, Tomida M, Okafuji N, Fujii T, Nakano K and Nagatsuka H. Chapter 9. Injury and recovery of the periodontal ligament: from a view of point of developmental biology. In Advances in Medicine and Biology, Vol 111. Berhardt LV ed., Nova Biomedical Publisher, NY, USA, pp173-220, January 2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()