

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792456

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞移植を用いた歯科矯正治療による細胞傷害とその回復機構の解明

研究課題名(英文) The recovery mechanism and cell injury from orthodontic treatment with promoter of transplanted bone marrow-derived cell migration into periodontal tissues

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、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、およびその制御法の開発、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を目的とした。骨髄幹細胞移植を行なったマウスを用い、マウス臼歯に歯科矯正力を負荷して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した。骨髄幹細胞は、歯周組織では主にリモデリングの盛んな部位において生着することを示したが、この現象も神経系の細胞と密生に関連していることを実験により示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed that the elucidation of the molecular regulation mechanism of recovery and cytotoxicity of periodontal tissue by orthodontic mechanical stress, and to clarify the development of the control method, the full particulars of the function and dynamics of bone marrow-derived cell. Using the mouse that performed the bone marrow-derived cell transplantation, and were elucidated the involvement of bone marrow-derived cell in the surrounding bone and tissue study of cell injury to receive the periodontal ligament fibroblasts in particular periodontal ligament tissue loaded with orthodontic academic ability in mouse molars. Bone marrow stem cells were shown to engraft in a thriving site remodeling mostly in periodontal tissue showed experimentally that this phenomenon is associated with the dense and cells of the nervous system.

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：骨髄幹細胞 歯根膜 歯周組織 歯科矯正学 治療 修復 再生

1. 研究開始当初の背景

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。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、骨組織の添加と吸収が起こる。その結果「歯の移動」が起こる。この際の矯正のメカニカルストレスの刺激を細胞傷害因子として取り扱った研究はほとんどなされておらず、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。

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。最近では、骨髄幹細胞を用いた臨床応用研究が既に始まっており、実際に骨髄幹細胞移植による各種病変の治療等が開始されている。

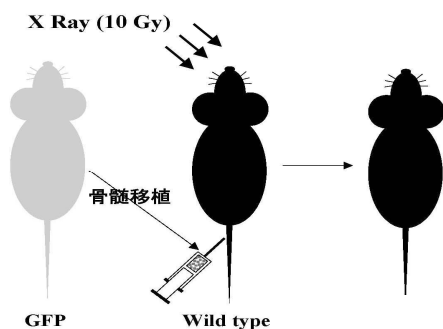
しかし口腔の、特に歯科矯正学的牽引時の歯周組織の改造現象におけるこれらの骨髄幹細胞の振る舞いを検討した報告は無く、骨髄幹細胞の機能解明を行う生物学的意義は大きい。また骨髄幹細胞の機能解明により、効果的な新規歯科矯正学的治療法の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、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、およびその制御法の開発を目的とすると共に、骨髄幹細胞の動態および機能の全貌を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

・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。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。

・歯科矯正学的牽引には GFP 骨髄細胞移植を行ったマウスを用いる。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。免疫組織化学的染色: 歯科矯正学的牽引後に経時的にマウスを屠殺し、下顎部組織を摘出、4% paraformaldehyde にて固定する。固定後 EDTA にて脱灰、定法にてパラフィンブロックを作成する。パラフィンブロックは薄切後、抗 Runx2 抗体、抗 Msx2、抗 HSP、Collagen 抗体等の骨、歯牙および歯周組織の関連抗体と抗 GFP 抗体を用いた蛍光免疫二重染色を行う。

・歯根膜組織中に存在する移植骨髄細胞由来 GFP 陽性細胞の同定解析を行う為、モデル動物から歯根膜構成細胞の初代培養を行う。

・歯根膜組織からの初代培養: 下顎部を無菌的に摘出、滅菌 PBS で洗浄し歯根膜組織を回収する。歯根膜組織は回収細切後 Collagenase Dispase 溶液にて処理を行う。その後培地に懸濁 37 二酸化炭素濃度 5% で培養する。必要に応じて細胞のクローン化に FACS Cellsorter 等を用いる。

・骨髄幹細胞の歯根膜線維芽細胞への分化機構解析の為、遺伝子発現、産生蛋白質に関する解析を行い、分化関連遺伝子を同定する。

・マイクロアレイ解析: 骨髄幹細胞および歯根膜線維芽細胞のマイクロアレイを行い、遺伝子発現について分析する。データは解析専用ソフトを用いて解析する。

・Western Blotting: マイクロアレイによって発現量に変化の確認された遺伝子について、蛋白質産生レベルについて確認する。

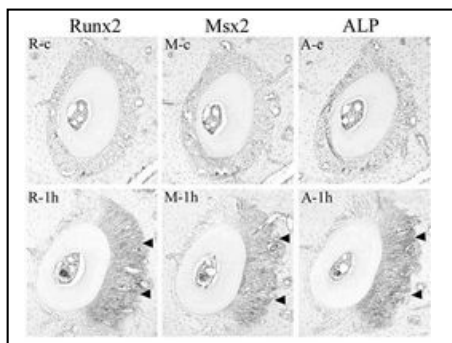
・歯科矯正学的牽引時メカニカルストレスの付与は、歯根膜線維芽細胞は骨髄幹細胞の骨芽細胞もしくは破骨細胞への分化に干渉していると考えられる。本現象を培養条件下で立証するため、共生培養による実験を行う。

・共生培養: インターセル等共生培養用シャーレを用い、上層で歯根膜線維芽細胞、下層で骨髄幹細胞の培養を行い、歯根膜線維芽細胞が骨髄幹細胞の骨芽細胞もしくは破骨細胞への分化誘導にどのような影響を及ぼすかを検討する。

4. 研究成果

現在までに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歯の関連細胞への分化(多分化能)に関する研究を行ってきた。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、その起因子として細胞傷害因子と捉え取り扱った本研究において、顎骨・歯周組織の形態形成とリモデリングに密接に関与しているいくつかの転写調節因子とそのリガンド、すなわち Runx2、Mxs2、Notch、Jagged、HSPs 等の因子が骨、軟骨の発生や形成に密接に関与していることを明らかにした。歯科矯正学的牽引時にける歯周組織の変化では、牽引1時間以内で牽引側において、歯根膜線維芽細胞および骨芽細胞に Runx2、Mxs2、ALP 蛋白の局在と強いシグナルを確認している。



また、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 HSPs は歯根膜の恒常性維持、骨添加傾向への分子シャペロンとして機能する可能性が強いということを示した。

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、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。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。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の発想に至った。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。

そしてこれらの研究データは各種学会においても高く評価され、第 20、22 回硬組織再生生物学会総会、第 71 回日本矯正歯科学会大会にて研究発表を行った際に優秀発表賞を受賞した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 6 件)

Mihoko Tomida(1 番目), Rina Muraoka(4 番目), 他 6 名: Promotion of Transplanted Bone Marrow-derived Cell Migration into the Periodontal Tissues due to Orthodontic Mechanical Stress. *Int J Med Sci.* 査読有, 2013, 10(10): 1321-1326.

Maki Tomoda(1 番目), Rina Muraoka(3 番目), 他 4 名: Immunohistochemical Changes of Heat Shock Protein 27 Expression in the Mouse Periodontal Tissues Exposed to Orthodontic Mechanical Stress. *J.Hard Tissue Biol.* 査読有, 2012, 21(1): 43-50.

Toshihisa Harada(1 番目), Rina Muraoka(4 番目), 他 6 名: Immunohistochemical Expression of Osterix Appearing in the Mouse Orthodontic Periodontal Tension Sides. *J.Hard Tissue Biol.* 査読有, 2012, 21(3): 321-328.

村岡理奈(1 番目), 他 6 名: 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.* 査読有, 2011, 20: 175-282.

松田浩和(1 番目), 村岡理奈(2 番目), 他 3 名: 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.* 査読有, 2011, 20: 283-288.

村岡理奈(1 番目), 他 8 名: 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 Bio.* 査読有, 2011, 20: 301-306.

(学会発表)(計 27 件)

Rina Muraoka(1 番目), 他 3 名: Effect of HSP70 in the periodontal ligaments remodeling due to orthodontic force: 89th congress of the European Orthodontic Society, 2013 年 6 月 29 日, Reykjavik, Iceland.

Toshiyuki Kawakami(1 番目), Rina Muraoka(4 番目), 他 3 名: Cell Dynamism of the Periodontal Tissues Remodeling elicited by Orthodontic Mechanical Stress: 89th congress of the European Orthodontic Society, 2013 年 6 月 29 日, Reykjavik, Iceland.

Toshiyuki Kawakami(1 番目), Rina Muraoka(3 番目), 他 3 名: Cytological Remodeling of the Periodontal Ligament Tissues due to Mechanical Stress: The 37th International Congress of Physiological Sciences, 2013 年 7 月 6 日, Birmingham, UK.

村岡理奈(1 番目), 他 5 名: 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．第 72 回日本矯正歯科学会大会．2013 年 10 月 9 日，長野県 松本市．

村岡理奈(1 番目)，他 3 名：歯科矯正学的メカニカルストレスが惹起する HSP47 のマウス歯根膜細胞における局在変化．第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会．2013 年 9 月 22 日，岡山市 岡山県．

宮城圭子(1 番目)，村岡理奈(4 番目)，他 5 名：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．第 22 回硬組織再生生物学会学術大会・総会．2013 年 8 月 22 日，鶴見市 神奈川県．

村岡理奈(1 番目)，他 3 名：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．第 22 回硬組織再生生物学会学術大会・総会．2013 年 8 月 22 日，鶴見市 神奈川県．

〔図書〕(計 2 件)

Kawakami T(1 番目)，Muraoka R(5 番目)，他 5 名：Immunohistochemical basis for orthodontic treatment. in Fuchs S and Auer M ed, Biochemistry and Histochemistry Research Developments. Nova Science Publishers, Inc., 2010, Chapter6: 117-141

村岡理奈(1 番目)，他 7 名. 歯科矯正力による骨形成分化誘導のダイナミクス. 歯界展望 特別号. 歯界展望 特別号. 2013, 221.

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・歯科矯正学
講座・助教
研究者番号： 20549430