

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592419

研究課題名 (和文) メカニカルストレスが惹起する細胞分化の分子調節機構

研究課題名 (英文) Molecular regulation system of cytodifferentiation due to mechanical stress

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

研究成果の概要 (和文)：

マウス歯根膜におけるメカニカルストレスが引き起こすRunx2とMsx2の発現状況の初期変化を免疫組織化学的に検討した。結果として、実験群では、Runx2とMsx2は20分で牽引側の歯根膜線維芽細胞に強い免疫陽性反応がみられた。さらにALPも同様の反応を示した。BMPやHSPの発現も上昇していた。これらの実験結果はRunx2が骨芽細胞分化の初期では分化を促進し、Msx2はRunx2の作用を活性化する方向に働いていること、またHSPが分子シャペロンとして働いている可能性を強く示唆した。

研究成果の概要 (英文)：

Early changes of Runx2 and Msx2 expressions were examined by immunohistochemistry in mouse periodontal ligament exposed to mechanical stress. Expressions of Runx2, BMP and HSP became stronger in parallel with time, the periodontal fibroblasts, cementoblasts as well as osteoblasts showed strong expression. Moreover, ALP has also demonstrated similar strong expression. All these results strongly suggested that Runx2 promoted differentiation of osteoblasts at early stage and Msx2 worked as an activator of Runx2 function. Furthermore, it also suggests that these HSP act as molecular chaperones for osteoblast activation and maintenance.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,300,000 | 690,000   | 2,990,000 |
| 2009年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

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：歯科矯正学

## 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療において、矯正装置によるメカニカルストレスは歯周組織に作用する。その結果、歯周組織が反応し歯の移動側、いわゆる圧迫側には“破骨細胞の出現により骨の吸収”が惹起される。反対側、いわゆる牽引側では“骨芽細胞の活性化により骨の添加”が起こり、その際には歯根膜組織にも改変現象が起こる。その結果として“歯の移動”が起こることは周知の事実である。すなわち、歯根膜に作用しているメカニカルストレスを軽減させるような組織反応が生じる結果として歯は“移動”するのである。これは、歯根膜の恒常性維持による反応と考える事が出来る。近年では組織学的反応や細胞分化、さらには形態形成などを調節する各種の転写因子に関する研究が盛んになり多くの報告がある<sup>1,2)</sup>。歯周組織はメカニカルストレスや炎症に反応し種々の分子を発現して活発なりモデリングを引き起こし、その恒常性を保っている事が明らかとなってきた)。

以前より、細胞傷害性刺激やメカニカルストレスの負荷により様々な臓器や組織において発現する主要なタンパクとして、熱ショックにより一時的に発現が増強されるタンパクである熱ショックタンパク (HSPs) が知られている。

## 2. 研究の目的

歯周組織に歯科矯正学的メカニカルストレスを付与することによって起こる、いわゆる“圧迫側”と“牽引側”における歯根膜細胞の変化について、実験動物であるマウスを用いて歯科矯正学的歯の移動実験を行い、病理組織学的に詳細に追究するとともに、同時に発現しているであろう種々のHSPs、その中でも特にHSP27の発現について着目し、同時に

p-HSP27 について免疫組織化学的に検討した。

## 3. 研究の方法

実験動物としてddY マウスを使用し、Waldoの方法によりマウスの上顎臼歯間にセパレーターを挿入して矯正学的なメカニカルストレスの付与を行った。実験開始後10分、20分、1時間、3時間、9時間および24時間で当該部を切り出し、4%パラホルムアルデヒド0.05Mリン酸緩衝固定液にて固定した。その後、パラフィン連続切片標本を作製し、病理組織学的に検討するとともに免疫組織化学的にHSP27 およびp-HSP27 の発現状況を検討した。なお、対照として無処置群を設定した。

## 4. 研究成果

対照群： マウス上顎左側第一臼歯遠心側根の歯根膜全周にHSP27 ペプチドの弱い発現があった。詳細にみると、それは主として歯根膜線維芽細胞の細胞質での発現であった。p-HSP27 においてもその発現はかなり弱いものであった(図5p-C)。

実験群： 10分群では、HSP27 の発現は牽引側に局在化しており、これは対照群よりもやや強く歯根膜線維芽細胞の細胞質に認められた。圧迫側ではほとんど消失していた。一方、p-HSP27 は牽引側と圧迫側の両者ともほとんど陰性であった。20分群では、HSP27 において牽引側と圧迫側に見られた歯根膜線維芽細胞の細胞質の陽性反応は10分群よりも強まっていた。p-HSP27 は10分群と同様に変化は認められなかった(図5p-20m)。1時間群では、牽引側の伸展した歯根膜線維芽細胞にHSP27 が20分経過群と比べ若干広い範囲での発現が認められた。圧迫側の陽性反応は

認められなくなっていた。p-HSP27 は、牽引側および圧迫側の両方に変化はなかった。3時間群では、かなり伸張し拡大した歯根膜線維芽細胞とセメント芽細胞の細胞質がHSP27に強く陽性を呈した。陽性領域は1時間と比較して圧迫側へ伸びていた。この時点においても、p-HSP27の発現強度の差はみられなかった。9時間群のHSP27では、強く牽引された歯根膜線維芽細胞とセメント芽細胞、および骨芽細胞の細胞質に陽性反応が同様に強く発現していた。その免疫反応領域は3時間と比較してさらに圧迫側に拡大し、圧迫側にまで及んでいた。その陽性反応は、圧迫側の方がより強くなった。この時期においては、p-HSP27の陽性反応が強くなり始め、これは圧迫側でかなり強くなっていた。24時間群でのHSP27において、圧迫側で歯槽骨と密に近接した部以外の歯根膜全域における線維芽細胞とセメント芽細胞、および骨芽細胞の細胞質に強い陽性反応がでていた。牽引側の歯根膜線維芽細胞の発現強度は、9時間群よりさらに強くなった。一方、HSP27の圧迫側の全域においてHSP27は消失していた。また、p-HSP27の牽引側における発現強度は全実験時間中、最も強くなった。p-HSP27の圧迫側では、HSP27と同様に全域においてp-HSP27の陽性反応は消失していた。

以上、まとめると、歯根膜組織のホメオスタシスの維持や歯根膜線維芽細胞の活性化による組織の修復にHSP27が密接に関与しているということが強く示唆された。また、今回のデータは歯科矯正治療によるメカニカルストレスによりHSP27は、牽引側歯根膜組織に発現するRunx2やMsx2などの骨芽細胞の活性化による骨添加傾向への分子シャペロンとして働いていることを示唆した。

## 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7件)

①Matsuda 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, Peerreviewed.

②Muraoka 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, Peerreviewed.

③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 (2009) マウスの矯正学的牽引側歯根膜における BMP 組織化学的観察. *J Hard Tissue Biol* **18**: 181-184, 査読有.

④村岡理奈, 中野敬介, 松田浩和, 共田真紀, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋, 川上敏行 (2009) 歯科矯正学的メカニカルストレスによりマウス歯根膜組織に発現する熱ショックタンパクの免疫組織化学的観察. *J Hard Tissue Biol* **18**: 193-198, 査読有.

⑤渡邊武寛, 中野敬介, 村岡理奈, 清水貴子, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋, 川上敏行 (2009) 歯科矯正学的牽引側における歯根膜線維芽細胞の免疫組織化学. *J Hard Tissue Biol* **18**: 175-180, 査読有.

⑥Nakano K, Muraoka R, Tomida M, Matsuura S, Okafuji N, Siar CH and Kawakami T (2009) Expression of HSP in dental root pulp cells due to experimental orthodontic mechanical stress. *J Hard Tissue Biol* **18**: 127-130, Peerreviewed.

⑦ Watanabe T, Nakano N, Muraoka R,

Shimizu T, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T (2008) Role of Msx2 as a promoting factor for Runx2 at the periodontal tension sides elicited by mechanical stress. Eur J Med Res 13: 425-431, Peerreviewed.

[学会発表] (計 10 件)

①Asian Science Seminar (6<sup>th</sup>), Taichung, Taiwan, November 20, 2010

Role of Msx2 as an activator of Runx2 in periodontal tension side by orthodontic mechanical stress: Nakano K, Muraoka R and Kawakami T (Program & Abstract book p16)

②日本矯正歯科学会大会 (第 69 回) 2010 年 9 月 28 日, 横浜. 歯科矯正力が惹起する 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, 松田浩和, 共田真紀, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋, 川上敏行 (プログラム・抄録集 p178)

③ Biennial Conference of European Association of Oral Medicine (10<sup>th</sup>) Incorporating the World Workshop on Oral Medicine, London, September 25, 2010. HSP expression as recovery reaction in orthodontic periodontal tension sides: Muraoka R, Nakano K, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T (Oral Dis 16: 529, 2010)

④硬組織再生生物学会総会 (第 19 回) 2010 年 9 月 4 日, 岡山. メカニカルストレスが引き起こすマウス歯根膜組織における HSP の発現変化: 村岡理奈, 中野敬介, 松田浩和, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋, 川上敏行 (プログラム・抄録集 p48; J Hard Tissue Biol 19: 210, 2010)

⑤ Conference of Asian International Association of Dental Traumatology (4<sup>th</sup>),

Beijing, China, November 1, 2009. Biological basis of tissue reaction to orthodontic injury stimulation: Okafuji N and Nakano K (Program book p9-10)

⑥日本矯正歯科学会大会 (第 68 回) 2009 年 11 月 17 日, 福岡. 実験的歯科矯正治療により惹起されるマウス牽引側歯根膜細胞分化関連因子の免疫組織化学: 松田浩和, 村岡理奈, 中野敬介, 岡藤範正, 山田一尋, 川上敏行 (プログラム・抄録集 p161)

⑦歯科基礎医学会総会 (第 50 回) 2008 年 9 月 24 日, 東京. メカニカルストレスが引き起こすマウス歯根膜細胞における Runx2 と Msx2 の免疫組織化学的变化: 渡邊武寛, 村岡理奈, 清水貴子, 中野敬介, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋, 川上敏行 (J Oral Biosci 50(S): 166, 2008)

⑧日本矯正歯科学会大会 (第 67 回) 2008 年 9 月 17 日, 千葉. 歯科矯正力が引き起こすマウス歯根膜細胞における Runx2 と Msx2 の免疫組織化学的研究: 渡邊武寛, 村岡理奈, 清水貴子, 中野敬介, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋, 川上敏行 (プログラム・抄録集 p153)

⑨歯科基礎医学会総会 (第 51 回) 2009 年 9 月 10 日, 新潟. メカニカルストレスの惹起するマウス牽引側歯根膜細胞における骨芽細胞分化関連因子の免疫組織化学的検討: 松田浩和, 村岡理奈, 中野敬介, 岡藤範正, 山田一尋, 川上敏行 (J Oral Biosci 51(S): 116, 2009)

⑩硬組織再生生物学会総会 (第 17 回) 2008 年 8 月 30 日, 徳島. メカニカルストレスの惹起する矯正学的牽引側歯周組織における骨芽細胞分化因子の役割: 中野敬介, 渡邊武寛, 村岡理奈, 清水貴子, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋, 川上敏行 (プログラム・抄録集 p34)

[図書] (計 1 件)

① Kawakami 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

中野 敬介 (Keisuke Nakano)  
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・大学院歯学独立研究科・教授  
研究者番号：80104892

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