

科学研究費助成事業 研究成果報告書

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：23592951

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞移植を用いた口腔の増殖性病変における細胞分化の分子調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cell differentiation molecular regulation mechanism in proliferative lesions of the oral cavity using bone marrow stem cell transplantation model

研究代表者

川上 敏行 (Toshiyuki, Kawakami)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：80104892

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)：GFP骨髄移植マウスを用いて骨髄幹細胞の動態を検討し以下の結果を得た。

1) 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。2) Runx2をはじめとするこれらの因子が歯周組織の恒常性維持と組織修復に重要な役割を持っていることを示した。3) 歯周組織では細胞増殖が活発な場所に骨髄幹細胞が集中的に生着することを明らかにした。4) 骨髄幹細胞の動態に神経系の細胞が関与していることを示した。5) 増殖性病変の生物学的性格の確立への骨髄幹細胞の関与を示唆した。6) 骨髄幹細胞を用いた組織修復促進や増殖性疾患の制御を可能とする学術的根拠を得た。

研究成果の概要(英文)：We investigated the dynamics of bone marrow stem cells in tissue repair using GFP bone marrow transplantation mouse. We clarified following results.

1) The expression of Runx2, Msx2, ALP, Neuroendocrine-related factors and HSPs were enhanced in the periodontal ligament under injurious stimuli. 2) These factors have important roles in tissue repair and homeostasis of periodontal tissue. 3) Bone marrow stem cells engraft in active growth sites. 4) Scientific basis that allows for control of proliferative disease and promoting tissue repair using bone marrow stem cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科係歯学

キーワード：骨髄幹細胞 腫瘍 増殖性疾患 組織修復 再生

## 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。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治療の臨床応用研究が既に始まっている。従って現状では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。口腔外科領域における各種細胞増殖性病変、すなわち歯原性腫瘍、唾液腺腫瘍などの腫瘍細胞の供給に関わる研究領域のほか、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為の過程には骨髄幹細胞が関与すると推察される。しかし、これらの場合における骨髄幹細胞の振る舞いを検討した報告は殆ど無く、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、効果的な新規の細胞増殖性病変の治療法の開発に繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

口腔領域における腫瘍、その他細胞の増殖性病変における細胞分化と増殖の機構を骨髄幹細胞の移植系を用いて解明、追究する。さらに、これらの結果を元に新規治療法の開発の可能性をさぐる。

## 3. 研究の方法

1. GFP 骨髄細胞移植マウス・ラットと実験的腫瘍発生の実験系を組み合わせ、口腔の腫瘍増殖性病変の細胞の分化・増殖機構の解明を行う。また同動物の組織学的検討を行い、歯の組織発生時ならびに同腫瘍発生時における骨髄幹細胞の動態・機能を解析する。

2. 骨髄幹細胞由来の歯の構成細胞、同腫瘍細胞の初代培養、生化学的解析を行い、骨髄幹細胞の同構成細胞と同腫瘍細胞への分化機構を明らかにする。なお、共生培養実験を行い、生理的な細胞との分化干渉作用について解析する。

3. 腫瘍発生モデルマウス、ならびに同様な創傷治癒モデルマウス、骨折治癒モデルマウス、抜歯傷の治癒モデルマウスに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を検討するとともに、その抑制による治療方法を検討する。

## 4. 研究成果

GFP トランスジェニックマウス由来骨髄移植マウスの作製、および組織損傷モデル動物の作製を行い、歯牙および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。傷害性

刺激を加えた歯周組織における細胞動態においては、メカニカルストレス付与後の歯根膜組織において歯根膜線維芽細胞および骨芽細胞にRunx2、Msx2、ALPの局在と陽性反応増強を確認しているが、これらに加え、HSPや神経内分泌関連因子の発現増強も生じていることを確認した。さらに、これらの因子が歯周組織の恒常性維持や組織修復、細胞分化に密接に関与していることを示した。これらのモデル動物の解析結果から、骨髄幹細胞が末梢組織へ移行して骨芽細胞、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、前駆細胞となる骨髄幹細胞は、歯周組織では主に細胞増殖の盛んな部位に集中的に生着することを明らかにした。またこれら一連の細胞動態に神経系の細胞が関連していることを示した。増殖を伴う組織変化においては骨髄幹細胞の局所への遊走と分化が重要な役割を持つ事を示しており、いわゆる増殖性病変の生物学的性格の確立にも骨髄幹細胞が密接に関与している可能性を示した。歯原性腫瘍においても、先に挙げた細胞分化関連因子や増殖関連因子の動態を検討しその細胞分化と増殖の機構を検討した。これらの研究成果から、骨髄幹細胞の末梢局所への分布と分化をコントロールできる可能性が具体例を挙げて示すことができた。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組織に加える等の方法により、効率的な幹細胞の局所への誘導、組織修復の促進や増殖性疾患の増殖抑制などが可能となる学術的根拠を示し得た。当該年度に得られた新知見を元に申請者らはさらに効果的な幹細胞誘導法を検索中である。

## 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30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

Fujita M, Nakano K, Funato A, Sugita Y, Kubo K, Maeda H, Okafuji N, Hasegawa H and Kawakami T (2013) Heat shock protein27 expression and cell differentiation in ameloblastomas. *Int J Med Sci* **10**: 1271-7. 査読有, DOI: 10.7150/ijms.6597

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

Osga 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

Siar CH, Nagatsuka H, Han PP, Buery RR, Tsujigiwa H, Nakano K, Ng KH and Kawakami T (2012) Differential expression of canonical and non-canonical Wnt ligands in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* **41**:332-339. 査読有, DOI: 10.1111/j.1600-0714.2011.01104.x

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 Sites. *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

Liu H, Xiao J, Zhong W, Wang L, Qi M, Ying X, Nakano K, Kawakami T and Ma Guown(2011)In vitro behavior of bacteria on fluoride ion-coated titanium:with special regards on porphyromonas gingivaris. *J Hard Tissue Biol* **20**:47-52. 査読有, DOI: 10.2485/jhtb.20.47

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

Siar CH, Yeo KB, Nakano K, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, Tomida M, Ng KH and Kawakami T (2011) Strawberry gingivitis as the first presenting sign of Wegener's granulomatosis: Report of a case. *Eur J Med Res* **16**:331-4. 査読有, DOI: 10.1186/2047-783X-16-7-331

Siar CH, Nakano K, Han PP, Tomida M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Ng KH and Kawakami T(2011)Co-expression of BMP-2 and -7 in the tumoral epithelium of CEOT with selective BMP-7 expression in amiloid materials. *J Hard Tissue Biol* **20**:125-32. 査読有, DOI: 10.2485/jhtb.20.125

Tsujigiwa H, Katase N, Sathi GA, Buery RR, Hirata Y, Kubota M, Nakano K, Kawakami T and Nagatsuka H (2011) Transplanted bone marrowderived 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

Siar CH, Kawakami T, Buery RR, Nakano K, Tomida M, Tsujigiwa H, Han PP, Nagatsuka H and Ng KH (2011) Notch signaling and ghost cell fate in the calcifying cistic odontogenic tumor. Eur J Med Res 16:501-6. 査読有  
DOI: 10.1186/2047-783X-16-11-501

〔学会発表〕(計 78 件)

骨軟部腫瘍研究会(第 49 回)2013 年 6 月 5 日 福岡国際会議場, 福岡市, 下顎臼歯根尖部病変: 落合隆永, 嶋田勝光, 中野敬介, 長谷川博雅 (抄録集 p1),

日本病理学会総会(第 102 回)2013 年 6 月 6 日 ロイトン札幌, 札幌市, 多彩な肉腫様成分を伴った上顎歯肉の combined desmoplastic melanoma の 1 例: 落合隆永, 中野敬介, 高橋 学, 長谷川博雅 (日病会誌 102: 322, 2013)

日本病理学会総会(第 102 回)2013 年 6 月 6 日 ロイトン札幌, 札幌市, Calcifying epithelial odontogenic tumor における Notch シグナルの検討: 中野敬介, 長塚 仁, 落合隆永, 長谷川博雅, 川上敏行 (日病会誌 102: 362, 2013)

日本病理学会総会(第 102 回)2013 年 6 月 6 日 ロイトン札幌, 札幌市, エナメル上皮腫における神経内分泌マーカーの発現: 落合隆永, 中野敬介, 長谷川博雅 (日病会誌 102: 449, 2013)

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, エナメル上皮腫における HSP27 の免疫組織化学的検討: 中野敬介, 藤田宗輝, 久保勝俊, 杉田好彦, 芳山昌典, 落合隆永, 前田初彦, 長谷川博雅, 川上敏行 (抄録集 p39; J Hard Tissue Biol 22: 528, 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)

日本臨床口腔病理学会総会(第 24 回)2013 年 8 月 29 日 日本大学理工学部, 東京, 下顎臼歯部に発生した focal osseous dysplasia の 1 例: 落合隆永, 嶋田勝光, 中野敬介, 長谷川博雅 (プログラム・抄録集 p84)

日本臨床口腔病理学会総会(第 24 回)2013 年 8 月 29 日 日本大学理工学部, 東京, Immunohistochemical expression of HSP27 in ameloblastomas: Nakano K, Kubo K, Sugita Y, Ochiai T, Maeda H, Hasegawa H and Kawakami T(プログラム・抄録集 p119)

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, 口腔粘膜上皮の過形成病変におけるデスモゾーム関連遺

伝子の発現：落合隆永，中野敬介，長谷川博雅 (J Oral Biosci 54 (S): 195, 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)

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，エナメル上皮腫に発現する HSP27 の免疫組織学的検討：中野敬介，久保勝俊，杉田好彦，前田初彦，長谷川博雅，川上敏行 (J Oral Biosci 54 (S): 216, 2013)

日本口腔科学会中部地方部会（第 56 回）2013 年 9 月 28 日 石川県教育会館 金沢市，Focal osseous dysplasia の 1 例：下地茂弘，高田匡基，丸川和也，伊藤香那，嶋田勝光，落合隆永，中野敬介，内田啓一，長谷川博雅，田口 明，篠原 淳，各務秀明（プログラム・抄録集 p28）

日本口腔科学会中部地方部会（第 56 回）2013 年 9 月 28 日 石川県教育会館，金沢市上顎歯肉の combined desmoplastic melanoma の一例：中野敬介，長谷川博雅，落合隆永（プログラム・抄録集 p29）

〔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, Tsuji giwa 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

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

(2)研究分担者

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

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

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