

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592951

研究課題名(和文) 機械受容神経再生機構の解明：メカノセンサーを有する新規人工歯根の開発と応用

研究課題名(英文) Mechanism of mechanoreceptive nerve regeneration: development of novel artificial dental roots with a mechanosensor

研究代表者

林 治秀 (Hayashi, Haruhide)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90107293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：失われた歯の代替として埋入したインプラント(人工歯根)は、患者のQOLの向上に重要な役割を果たしている。本研究の目的は、機械受容神経の再生機構を解明し、メカノセンサーを有する新規インプラント(人工歯根)を開発することである。

歯根膜細胞および骨芽細胞へのメカニカルストレス負荷により、細胞特異的に発現上昇する神経栄養因子および神経伝達物質が解明され、遺伝子発現パターン解析から数種のシグナル伝達経路が示唆された。これらの結果は、天然歯根に近く、咬み心地のいい、また、外傷性の咬合力を抑制する生理機能も発揮できるメカノセンサーを有する人工歯根への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Dental implant (artificial dental root) is a substitute for lost teeth and plays an important role in improving patient quality of life. This study aimed to elucidate the mechanism of mechanoreceptive nerve regeneration and to develop new dental implants with mechanosensors. Cell-specific expression of neurotrophic factors and neurotransmitters was elevated by mechanical stress loading on periodontal ligament cells and osteoblasts. Furthermore, gene expression pattern analysis suggested that several signal transduction pathways were involved in the process. These results have potential applications for the production of artificial dental roots that have mechanosensors similar to natural roots, have normal biting sensations, and exhibit physiological functions to suppress traumatic occlusal force.

研究分野：口腔生理学

キーワード：機械受容神経 インプラント メカニカルストレス 歯根膜細胞 骨芽細胞 神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

骨と歯周組織には、咀嚼などにより多様なメカニカルストレスが作用し、その局所部位に複雑なバイオメカニカルな刺激が発生する。刺激に反応して歯周組織に発現した分子は、局所に存在する、もしくは局所に誘導された多様な細胞群に作用し、その刺激に対して調和のとれた改造現象を惹起する。その複雑な改造機構を分子レベルおよび細胞レベルで明らかにすることは、生理的かつ健康的な歯の機能を維持するために重要である。

これまで我々は培養細胞を用いた *in vitro* の研究を行い、過度の持続的圧縮力が骨芽細胞で Caspase-8 を介する系を活性化し、直接的に骨芽細胞のアポトーシスを誘発することを明らかにした。一方、興味深いことに、歯根膜細胞の場合は、過度の持続的圧縮力に対して抵抗性を有しており、負荷した力依存性に反応して RANKL の発現を増強させ、破骨細胞の形成を促進し、伸展力に反応して OPG の発現を増強させて、破骨細胞の形成を抑制した。加えて、歯根膜細胞は、負荷した力依存性に反応して血管新生因子の産生も亢進したことから、過度の持続的圧縮力により生じる変性組織に対して、周囲に血管を形成し、それによる血流を介して未分化な細胞群を動員し、変性組織の改築のための血流と細胞を供給するという重要な役割を果たしていると考えられた。

以上のように、メカニカルストレスに対する細胞応答により発現誘導される分子と細胞のネットワークシステムが徐々に解明されつつある。これらの現象の解明は、力学的な力を利用して歯の移動を制御する歯科矯正学的治療のみならず、過剰な力が歯に働く咬合性外傷を生じさせない機械受容神経の仕組みやメカノセンサーを有する人工歯根の開発に応用しうる。

2. 研究の目的

失われた歯の代替として埋入したインプラント(人工歯根)は、患者の QOL の向上に重要な役割を果たしている。しかしながら、人工歯根はメカノセンサーを持っていないため、天然歯根と比較して、咬み心地が異なり、また、強い咬合力がかからないように特別の配慮が必要である。本研究の目的は、(1) 機械受容神経の再生機構を解明することと、(2) その機構に関する知見からメカノセンサーを有する新規インプラント(人工歯根)を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* にて、骨芽細胞、歯根膜細胞、または iPS 細胞を培養、もしくは共存培養し、相互作用により神経細胞の増殖や分化がどのように制御されるかについて検討した。さらに、メカニカルストレス受容により、変化するかどうかを調べた。また、そのときに発現誘導される分子群を網羅的に解析し、その

シグナル伝達機構を解析した。

(2) *in vivo* において、歯周組織に類似した環境でその機能から有効な改造制御分子を選択し、臨床応用を想定したモデル動物の歯根膜、歯槽骨およびその周囲組織に、分子生物学的方法(遺伝子導入)もしくは物理的方法(共振周波数)を用いてメカニカルストレスで誘導される分子を誘導し、組織学および病理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯周組織に持続的に圧縮力が負荷された時に直接圧縮され、リモデリングに深く関与する歯根膜細胞と骨芽細胞に着目し、*in vitro* で、刺激による網羅的に解析した。ヒト由来歯根膜細胞もしくはヒト骨芽細胞を confluent に培養し、その後、重さを調節したガラス円柱を介して直接、持続的圧縮力を負荷した。刺激後、細胞から total RNA を抽出し、BioAnalyzer 分析により RIN (RNA integrity number) = 10 を示す非分解 total RNA を用いた Agilent 遺伝子発現 Whole Human Genome 44K マイクロアレイを用い、44,000 遺伝子について網羅的発現解析の後、解析ソフト GeneSpring および Integrity Pathway Analysis を用いて検討した。持続的圧縮力の負荷により、細胞特異的に発現上昇する神経栄養因子および神経伝達物質が検出された。さらに遺伝子発現パターン解析により、数種のシグナル伝達経路の関与が示唆された。

(2) マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に振動刺激を負荷すると、骨芽細胞の分化が促進され、神経栄養因子群の遺伝子発現を増強した。

(3) マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞とマウス誘導多能性幹細胞株を用いて、周期的伸展刺激を負荷し、神経栄養因子群の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて検索した。また、タイムコースと刺激の強さによる発現様相の変化を解析した。

(4) 神経細胞培養モデルであるラット PC12 細胞の神経突起形成を確立した。ラット PC12 細胞は、ある種の刺激を加えると、MEK-ERK1/2 シグナル伝達経路を介して神経突起を伸長した。

(5) ラットを用いた *in vivo* 実験系のために、小動物 μ CT による骨量、骨密度などの定量的解析方法を確立した。

(6) マウス誘導性多能性幹細胞株から神経細胞への分化誘導実験の条件設定を行った。伸展刺激を負荷するとマウス iPS 細胞の stemness は減少する傾向があった。

(7) LIF (Leukemia Inhibitory Factor) は、神経分化、骨形成、脂肪細胞の脂質輸送を促進する機能が知られている。神経分化における stemness 維持機構を、Nanog 遺伝子発現を指標とした定量的リアルタイム PCR と、LIF の有無により検討した。その結果、LIF 存在下ではマウス誘導性多能性幹細胞株の stemness は維持されるが、伸展刺激負荷の影響は認め

られなかった。一方、LIF 非存在下で伸展刺激を負荷すると、有意に Nanog 遺伝子発現は減少した。未分化な細胞がメカニカルストレスに反応する際に LIF が何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

(8) マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞は、伸展刺激や振動刺激のような力学的刺激を負荷することにより、神経栄養因子の発現を変化させた。

(9) ラット歯根膜細胞は、発生、成長発育、歯周組織の再生、骨形成等で役割を果たすことが知られている BMP-4 を発現している。我々は、エレクトロポレーション法により、培養ラット歯根膜細胞に BMP-4 を強制発現させた。BMP-4 タンパク質は、細胞内においては、mature form (23-kDa) と precursor form (54-kDa) が検出された。さらに培養上清中には mature form の BMP-4 が検出された。BMP-4 タンパク質の産生はプラスミド量に比例して増加した。一方、in vivo でラット歯根膜に BMP-4 を強制発現させても、骨形成は誘導されなかった。以上のことから、機械受容神経を含む歯周組織の恒常性において、BMP-4 が何らかの作用を有することが示唆された。

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 1 1 件)

Tsuchiya S, Chiba M, Kishimoto KN, Nakamura H, Tsuchiya M, Hayashi H, Transfer of the bone morphogenetic protein 4 gene into rat periodontal ligament by in vivo electroporation. Arch Oral Biol. 2017;74: 123-132, 査読有 [DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.11.013]

Ota T, Chiba M, Hayashi H, Vibrational stimulation induces osteoblast differentiation and the upregulation of osteogenic gene expression in vitro, Cytotechnology 2016;68(6):2287-2299, 査読有 [DOI: 10.1007/s10616-016-0023-x]

Takizawa A, Chiba M, Ota T, Yasuda M, Suzuki K, Kanemitsu T, Itoh T, Shinoda H, Igarashi K, The novel bisphosphonate disodium dihydrogen-4-[(methylthio) phenyl thio] methanebisphosphonate increases bone mass in post-ovariectomy rats, *Journal of Pharmacological Sciences* 131, 37-50, 2016 査

読有. [DOI:10.1016/j.jpshs.2016.04.011]

滝澤愛子, 太田岳, 安田真弓, 林 治秀, 篠田 壽, 千葉美麗, 卵巣摘出ラット脛骨のマイクロCT解析 実験力学 Vol.16 (2016), No.2,140-146, 査読有 [DOI: 10.11395/jjsem.16.140]

千葉美麗, 歯科バイオメカニクス. 歯周組織の細胞バイオメカニクス, 非破壊検査 Vol. 65 (2016), No.4 : 150-157. 査読無

Takeru OTA, Mirei CHIBA and Haruhide HAYASHI, The Effect of Vibrational Strain on Osteoblasts Cultured on A Type I Collagen-coated Silicone Membrane, Proceeding of 10th International Symposium on Advanced Science and Technology In Experimental Mechanics, 2015 ; [CD-ROM] 038. 査読有 .

Mayumi YASUDA, Mirei CHIBA, Takeru OTA, Aiko TAKIZAWA, Kaoru IGARASHI, The effects of mechanical stretch on mouse iPS cell line, Proceeding of 10th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics 2015 ; [CD-ROM] 070. 査読有.

Aiko TAKIZAWA, Mirei CHIBA, Takeru OTA, Mayumi YASUDA, Haruhide HAYASHI, Kaoru IGARASHI and Hisashi SHINODA, Micro-CT Analysis of Bone in Ovariectomized Rats Treated with a Novel Bisphosphonate, [4-(methylthio)phenylthio] methanebisphosphonate, *Proc. of the 8th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics*, CD-ROM, 063, 2014. 査読有 .

Mirei Chiba, Ryosuke Miyai, Haruhide Hayashi, Gene Expression in Human Osteoblasts and Periodontal Ligament Cells under Compressive Force, *Interface Oral Health Science* 2011, 2012, 112-113. 査読無 Mirei Chiba, Ryosuke Miyai, Haruhide

Hayashi, Micro-spatial environment and osteoblast osteogenesis, *Interface Oral Health Science* 2011, 2012, 110-111. 査読無

千葉美麗, 機械的刺激に対する細胞応答実験—伸展刺激と圧縮刺激について—『よくわかる実験技術・学術用語第二版』(日本実験力学会編), 北陽ビジネスフォーム株式会社. 岡山. p48-51.2012年.査読無

[学会発表](計35件)

- (1) Mayumi YASUDA, Mirei CHIBA, Shiho KATSUKI, Michiko MATSUOKA, Kaoru IGARASHI, Haruhide HAYASHI, Effects of Cyclic Tensile Strain on Mouse Stem Cells, 95th General Session & Exhibition of the IADR/46th AADR/41st CADR, 2017.3.22~25, Moscone West, San Francisco, USA.
- (2) Mirei Chiba, Aiko Takizawa, Takeru Ota, Mayumi Yasuda, Keiko Suzuki, Kaoru Igarashi, Hisashi Shinoda. The Novel Bisphosphonate Regulates Osteoclastogenesis, Osteogenesis, and Adipogenesis. 95th General Session & Exhibition of the IADR/46th AADR/41st CADR, 2017.3.22~25, Moscone West, San Francisco, CA 94103, USA.
- (3) Aiko Takizawa, Mirei Chiba, Yuka Narusawa, Makoto Nishimura, Takeru Ota, Mayumi YASUDA, Keiko Suzuki, Haruhide Hayashi, Kaoru Igarashi, Hisashi Shinoda, A novel bisphosphonate, [4- (methylthio) phenylthio] methanbisphosphonate, facilitates bone formation by local administration to the alveolar bone in rats, The 2017 Japan-NIH joint Symposium, Feb15-17, 2017, Seiry Auditorium, Seiry Campus, Tohoku University, Japan
- (4) 太田 岳, 千葉美麗, 安田真弓, 林 治秀, 振動刺激に対する骨芽細胞のメカノセンシング, 第38回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会, 2017年2月4日, 仙台サンプラザ

- (5) 千葉美麗『振動刺激による歯周組織の賦活化 ~矯正学的歯の移動の促進効果に関する研究~』臨床セミナー2、第75回日本矯正歯科学会大会, 2016年11月7-9日, 徳島県徳島市.
- (6) M. Chiba, T. Ota, and H. Hayashi, Osteoblast mechanosensing by vibration: Cytoskeletal changes and signal transduction, *IADR/AADR/APR 94th¹ General Session and Exhibition*, June 22-25, 2016, COEX Convention & Exhibition Center, Seoul, Republic of Korea.
- (7) 千葉美麗, 振動刺激のアナボリックな作用に関する細胞生物学的研究, The 15th Conference on Biomechanics in Matsushima, 2016年3月19日, パレス松島、宮城県.
- (8) Takeru OTA, Mirei CHIBA and Haruhide HAYASHI, The Effect of Vibrational Strain on Osteoblasts Cultured on A Type I Collagen-coated Silicone Membrane, 10th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (10th ISEM '15-Matsue), November 1-4, 2015, Kunibikimesse, Shimane Prefectural Convention Center, Matsue, Japan.
- (9) Mayumi YASUDA, Mirei CHIBA, Takeru OTA, Aiko TAKIZAWA, Kaoru IGARASHI, The effects of mechanical stretch on mouse iPS cell line, 10th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (10th ISEM '15-Matsue), November 1-4, 2015, Kunibikimesse, Shimane Prefectural Convention Center, Matsue, Japan.
- (10) 滝澤愛子, 千葉美麗, 太田岳, 安田真弓, 鈴木恵子, 篠田壽, 五十嵐 薫, 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットへの新規ビスホスホネート投与による骨量改善と作用機序について, 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015年9月11~13日, 朱鷺メッセ,新潟.

- (11) 太田岳, 千葉美麗, 林治秀, in vitro 振動刺激負荷装置の開発と振動刺激が培養骨芽細胞分化に及ぼす影響, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年 9 月 11~13 日, 朱鷺メッセ、新潟
- (12) 安田真弓, 千葉美麗, 太田岳, 滝澤愛子, 五十嵐薫, 幹細胞の未分化性に与える力学的刺激の影響に関する研究, 日本実験力学会 2015 年度年次講演会, 2015 年 8 月 28 日、29 日, 新潟大学工学部、新潟市.
- (13) 太田岳, 千葉美麗, 安田真弓, 林治秀, 骨芽細胞への in vitro 振動刺激負荷システムの確立と培養表面の動的ひずみ様相 ~ 周波数と加速度が骨芽細胞分化に与える影響 ~, 日本実験力学会 2015 年度年次講演会, 2015 年 8 月 28 日、29 日, 新潟大学工学部、新潟市.
- (14) 千葉美麗, 滝澤愛子、太田岳、安田真弓, ビスホスホネート投与が骨組織に与える影響とその考察, 2015 年バイオメカニクスワークショップ新潟、日本実験力学会バイオメカニクス分科会, 2015 年 3 月 14 日、新潟大学医学部保健学科, 新潟県新潟市.
- (15) 安田真弓、千葉美麗、太田岳、滝澤愛子、五十嵐薫, マウス iPS 細胞に及ぼす伸展刺激負荷の影響, 第 75 回日本矯正歯科学会大会, 2014.10.20~22.幕張メッセ, 千葉市.
- (16) 滝澤愛子、千葉美麗、太田岳、安田真弓、鈴木恵子、篠田 壽、五十嵐薫, 新規ビスホスホネートが卵巣摘出ラットの骨形成に及ぼす影響, 第 75 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20 日~22 日、幕張メッセ, 千葉市.
- (17) 太田岳、千葉美麗、林治秀, 振動刺激によるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞の分化誘導, 第 75 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20 日~22 日、幕張メッセ, 千葉市.
- (18) 太田岳、千葉美麗、林治秀, 細胞培養系への振動刺激により細胞培養表面に生じるひずみ評価と細胞分化に関する研究, 日本実験力学会 2014 年度年次講演会、2014 年 8 月 28 日~30 日、兵庫県立大学姫路工学キャンパス (兵庫県姫路市)
- (19) 滝澤愛子、千葉美麗、太田岳、安田真弓、鈴木恵子、篠田 壽、五十嵐薫, 新規ビスホスホネート MPMBP が骨粗鬆症モデルラットの骨形成に及ぼす影響, 第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7 月 1 日~4 日、万国津梁館, 沖縄.
- (20) 太田岳、千葉美麗、林治秀, 力学的振動刺激はマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞の骨形成分化を促進する, 第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 24 日~26 日、大阪国際会議場, 大阪府大阪市.
- (21) 千葉美麗, 安田真弓, 滝澤愛子, 太田岳, “iPS 細胞への力学的刺激負荷の試み”, The 13th Conference on Biomechanics in Sendai, 仙台, 2014 年 3 月 8 日 .
- (22) 滝澤愛子、千葉美麗、太田岳、安田真弓、林治秀、五十嵐薫、篠田 壽, 新規ビスホスホネート [4-(methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate (MPMBP) が骨粗鬆症モデルラットの骨に及ぼす影響, 第 35 回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会, 仙台, 2014.2.1.
- (23) Takeru Ota, Mirei Chiba, and Haruhide Hayashi, “Vibrational stimulation induced osteoblast differentiation in vitro”, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium, Sendai, JAPAN, 2014.1.20~21.
- (24) Aiko TAKIZAWA, Mirei CHIBA, Takeru OTA, Mayumi YASUDA, Haruhide HATYASHI, Kaoru IGARASHI, and Hisashi SHINODA, “MPMBP increased bone mass and improved the mechanical properties of rat osteoporotic”, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface

- Symposium, Sendai, JAPAN, 2014.1.20~21.
- (25) Aiko TAKIZAWA, Mirei CHIBA, Takeru OTA, Mayumi YASUDA, Haruhide HAYASHI, Kaoru IGARASHI and Hisashi SHINODA, "Micro-CT Analysis of Bone in Ovariectomized Rats Treated with a Novel Bisphosphonate, [4-(methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate", ISEM'13-Sendai, Technical Program, Sendai, JAPAN, Nov. 3-6. 2013.
- (26) 太田 岳, 千葉美麗, 林 治秀, 骨芽細胞培養系への振動刺激負荷, 日本実験力学会 2013 年度年次講演会 秋田, 2013.8.22 .
- (27) Mayumi Yasuda, Mirei Chiba, Ryosuke Miyai, Takeru Ota, Kaoru Igarashi, Haruhide Hayashi, The effects of the micro-spacial environment on osteoblast differentiation, NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, May 9-11, 2013, Gonryo Hall, Sendai, Japan.
- (28) Takeru Ota, Mirei Chiba, Mayumi Yasuda, Haruhide Hyashi, Osteogenic transcription factors are regulated by vibration in MC3T3-E1 cells, NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, May 9-11, 2013, Gonryo Hall, Sendai, Japan.
- (29) Mirei CHIBA, Ryosuke MIYAI, Takeru OTA, Mayumi YASUDA and Haruhide HAYASHI, $\alpha 2$ -Integrin subunits are upregulated in micro-space-induced osteoblast differentiation, abstract of 2013 annual meeting, *Bone* 54 (Supplement), 2013 (査読あり) 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, 28 May-1 June 2013, Kobe, Japan
- (30) T. Ota, M. Chiba, and H. Hayashi, Responses of Osteoblasts to Vibrational Stimulation, *IADR/AADR/CADR 91st General Session and Exhibition*, March 20-23, 2013, The Washington State Convention Center, Seattle, Wash., USA.
- (31) 千葉美麗, 宮井良介, 太田 岳, 安田真弓, 林 治秀, "培養細胞による微細空間認識と細胞外マトリックス", 第 12 回日本実験力学会バイオメカニクス分科会, 大阪, 2013.3.14 .
- (32) 千葉美麗, 太田 岳, 林 治秀 持続的圧縮力に対するヒト歯根膜細胞および骨芽細胞の遺伝子発現応答, *Clinical Calcium*, Vol.23, No.4, p599, 2013. 第 32 回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会, 2013 年 2 月 2 日, 江陽グランドホテル, 仙台
- (33) M. Chiba, R. Miyai, T. Ota, H. Hayashi. The effects of micro-spatial environment for osteoblast osteogenesis, *The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2012 Annual Meeting*, October 12-15, 2012, Minneapolis Convention Center, Minneapolis, Minnesota, USA , abstract of 2012 annual meeting, *J Bone Miner Res* 27 (Supplement), 2012 (査読あり)
- (34) 千葉美麗 『噛み応えの知覚』 第 4 回 多分野交流研究会「資源循環型技術と実験力学 ~食用植物プラントに関連して~」, 2012 年 7 月 21 日, 新宿, 東京
- (35) 千葉美麗, 宮井良介, 太田 岳, 林 治秀, マイクロ微小空間 3 次元培養系における骨芽細胞の接着と移動, *The 11th Conference on Biomechanics in Niigata*, 2012 年 4 月 28 日, 29 日, 新潟大学, 新潟 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 治秀 (HAYASHI, HARUHIDE)
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
 研究者番号 : 90107293

(2)研究分担者

千葉 美麗 (CHIBA, MIREI)
 東北大学・大学院歯学研究科・講師
 研究者番号 : 10236820