

令和元年6月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26462963

研究課題名(和文) 歯周組織の振動刺激応答機構の解明 —分子基盤の解析とその臨床応用—

研究課題名(英文) Mechanism of response of periodontal tissue to vibrational stimulation: molecular basis and clinical application

研究代表者

千葉 美麗 (Chiba, Mirei)

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：10236820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 振動刺激により歯周組織が活性化されることが明らかとなってきているが、不明な点が多い。本研究では、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞を培養し、振動刺激を負荷して細胞を解析した。振動刺激は骨芽細胞分化を促進し、その効果は加速度の影響が重要であることが明らかとなった。また、生体内における振動刺激による影響は、臨床的歯の移動モデルラットの歯およびその周囲組織に振動刺激を負荷して解析した。麻酔下での骨および周囲組織の経時的変化をマイクロCTにより解析定量し、振動刺激の効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科矯正治療には長期間を要する事が多く、治療の長期化に伴って齲蝕(むし歯)や歯周病などの問題が発生し、患者の精神的負担も大きい。また、治療期間の長期化は、重篤な副作用のひとつである歯根吸収の発現と関連性が高いことが報告され、治療期間を短縮する方法が求められている。

本研究では、振動刺激により歯周組織を活性化する刺激条件を解明した。副作用がなく生理的かつ速やかな骨改造制御の開発は、治療における骨吸収と骨形成の制御(矯正治療速度制御、副作用防止、動的治療期間および保定期間の短縮、術後経過の安定)、歯科インプラント植立時の新生骨再生、抜歯後の治癒促進などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)： It is known that periodontal tissue is activated by vibrational stimulation, but the mechanism is unknown.

In this study, mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells were cultured and subjected to vibrational stimulation. Vibrational stimulation induced osteoblast differentiation and the upregulation of osteogenic gene expression, and the development of actin stress fibers in the cells was enhanced. These effects varied with vibration parameters: frequency and particularly, acceleration.

The effects of vibrational stimulation in vivo were also analyzed by applying vibrational stimulation to teeth and periodontal tissue in model rats. Time-dependent changes in bone and tissue in the anesthetized animals were analyzed. Micro-computed tomography and ultrasound revealed quantitative effects.

研究分野：口腔生理学、歯科矯正学、分子生物学、細胞生物学、病理組織学

キーワード：振動 周波数 加速度 骨芽細胞 iPS細胞 歯科矯正学的歯の移動 歯周組織 骨密度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

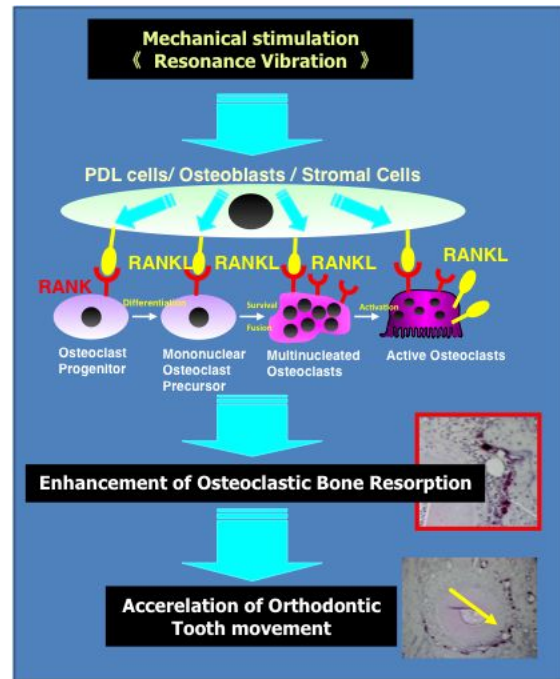
歯科矯正治療による歯の移動は、負荷した矯正力に対して歯周組織が反応し、圧迫側の破骨細胞による歯槽骨の吸収と牽引側の骨芽細胞による新生骨の形成により生じる。本研究では、この活発な骨改造現象を賦活化させる振動刺激を解明し、歯科医用工学的に有用な歯周組織改造/再生条件を決定することを目指す。

これまで我々は、ラットを用いた動物実験で、メカニカルな振動を歯周組織に与えるといった簡便な手法により、歯科矯正学的歯の移動速度を促進することを明らかにした(AJODO 2008 (Accept 2006))。また、その結果を受けて、米国において、2011年に歯科矯正用振動装置 AcceleDent™ がFDAの承認を得て、歯科臨床において商品化された(Proffit et al. Contemporary Orthodontics 5th Edition, Chapter 8, The Biologic Basis of Orthodontic Therapy, p295, 2012)。

また、歯科領域以外では、Rubinらにより全身性に与えられた高周波・低振幅の振動刺激(Low-Magnitude High-Frequency (LMHF) vibration)が、海綿骨密度を増加させることを報告(Nature 2001)され、彼らは、微小な振動刺激による適度なメカニカルストレスが骨形成促進作用を有することを示した。この成果は骨粗鬆症治療にも適用され、効果を上げている。

しかしながら、振動刺激による歯周組織改造/再生の賦活化に関するこれまでの研究報告は決して多いとは言えず、今後の臨床応用において、そのメカニズムの解明が求められている。振動刺激に対する歯の移動時の歯周組織の生体反応のメカニズムとしては、現在のところ(右図に示すように)、歯周組織圧迫側におけるRANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)が増加し、破骨細胞が増加・活性化し、歯根吸収などの有害作用を増大させることなく、破骨細胞による骨吸収が促進され、その結果として歯の移動が促進するという我々の報告(AJODO 2008)があるのみである。

一方で、整形外科領域では、超音波が臨床において骨折の治療に用いられており、新脈管形成促進、細胞増殖および蛋白質合成促進、血流増加、骨形成促進などの作用が報告され、その有用性が明らかとなっている。そのため、振動刺激においても同様に、歯周組織内における血流の促進および歯根膜に存在する様々な細胞への作用が考えられる。さらに、歯周組織は粘弾性体であり、物理エネルギーを一定時間保持できるため、間欠的刺激でも効果があると考えられている。しかし、どの程度保持できるのか、どのような変化が起きるのかについての十分な知見は無く、これらのエビデンスは不足しており詳細は不明である。



2. 研究の目的

振動刺激により歯周組織が賦活化されることが明らかとなってきているが、歯周組織再生機構における応答機構には不明な点が多い。本研究は、第一に、振動刺激によって歯周組織に発現誘導される分子群とそのシグナリング機構を解明し、歯周組織改造/再生に関わる分子基盤を確立し、第二に、歯周組織リモデリング機構制御法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* において振動刺激により発現誘導される分子群を解析し、発現分子とシグナル伝達経路を同定する。また振動刺激と、圧縮や伸展という他のメカニカルストレスとの違いを同様に解析した。(2) 臨床応用を想定した歯の移動モデル動物の歯およびその周囲組織に、振動刺激を負荷し、血流変化、機械受容神経応答、骨形成と骨吸収、歯根吸収などを指標として分子、細胞、組織レベルで解析し、歯の移動を促す最適な周波数や振幅、刺激時間などのパラメータを解析した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* において振動刺激により発現誘導される分子群を解析し、発現分子とシグナル伝達経路を同定した。

歯周組織における細胞分化に対する振動刺激の影響を明らかにするため、マウス iPS 細胞 (Induced pluripotent stem cell line:人工多能性幹細胞株) と骨芽細胞を用いて、細胞間相互作用と振動刺激負荷の影響を調べた。細胞は、Nanog プロモーター下流に GFP (Green fluorescent protein) 遺伝子を挿入した Okita らの報告したマウス iPS 細胞 (Nature, 2007) とマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を、それぞれ単独もしくは共存培養を行った。形態観察、Alkaline phosphatase (ALP) 染色、蛍光顕微鏡による GFP

発現の観察を行った。さらに、振動刺激刺激を負荷し、real-time PCRにより mRNA 発現を定量し、その影響を調べた。iPS 細胞単独培養系では多数のコロニーが観察され、振動刺激により Nanog 遺伝子発現は減少した。一方、骨芽細胞分化に必須な転写因子 Runx2、Osterix の遺伝子発現は増加した。

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を用いた in vitro 振動刺激負荷実験による細胞応答に関する検討を行なった。骨芽細胞の遺伝子発現は、骨芽細胞特異的転写因子 Runx2 と Osterix が上昇し、さらに Type I collagen、Alkaline phosphatase、Osteocalcin の発現上昇も確認された。

骨芽細胞における振動刺激の効果は、加速度の影響を受け、アクチンストレスファイバー発達を増強するが、伸展刺激や流れ刺激で見られるような配向性は見られないことが明らかとなった。骨芽細胞に対する振動刺激のシグナルは、伸展刺激や流れ刺激とは異なる経路を介している可能性があると考えられ、さらなる研究を進める必要がある。

- (2) 臨床応用を想定した歯の移動モデル動物の歯およびその周囲組織に、振動刺激を負荷し、血流変化、機械受容神経応答、骨形成と骨吸収、歯根吸収などを指標として分子、細胞、組織レベルで解析した。

ラット骨組織(上顎骨、大腿骨、脛骨など)をマイクロ CT を用いて、骨密度や機械的強度の定量などの解析方法を確立した。

生体内における振動刺激による影響を調べるために、マイクロ CT 解析定量方法について、イソフルラン麻酔科で生きたままの状態で経時的変化をラットの顎骨を用いて検討を行った。計測によるばらつきを解消すべく、さらに安定した正確な経時的な計測方法を検討中である。

- (3) 得られた成果についての学会発表と論文投稿を行なった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7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.

Archives of Oral Biology 74: 123-132, 2017.

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.11.013>

査読有

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) phenylthio] methanbisphosphonate increases bone mass in post-ovariectomy rats

Journal of Pharmacological Sciences 131: 37-50,2016.

DOI: 10.1016/j.jphs.2016.04.011

査読有

Ota T, Chiba M, Hayashi H

Vibrational stimulation induces osteoblast differentiation and the upregulation of osteogenic gene expression in vitro.

Cytotechnology 68: 2287-2299,2016.

DOI: 10.1007/s10616-016-0023-x

査読有

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 16: 140-146, 2016.

<http://doi.org/10.11395/jjsem.16.140>

査読有

千葉美麗

歯周組織の細胞バイオメカニクス

非破壊検査 65 : 150-157, 2016.

DOI: http://www.jsndi.jp/bulletin/J_01_Apr16.html

査読無

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

日本実験力学会講演論文集 14 : 45-46, 2014.

査読無

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
Clinical Calcium 24: 148-148, 2014.
査読無

[学会発表](計31件)

千葉美麗, Sanicha Yaklai, Roan Pechayco
振動刺激による培養骨芽細胞の石灰化亢進メカニズム
The 18th Conference on Biomechanics in Niigata 2019年

千葉 美麗
歯周組織の振動シグナル応答
—歯周組織リモデリングを制御する振動シグナル応答機構の解明と臨床応用への展開基盤—
日本実験力学会 多分野交流分科会(招待講演) 2018年

Sanicha Yaklai, Roan Pechayco, 阿部陽子, 高橋 哲, 千葉美麗
骨離断を伴う顎矯正手術後の治癒過程における骨代謝活性の亢進現象
第39回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会 2018年

長岡正博, 千葉美麗, 篠田 壽, 鈴木恵子
幼若ラットへの新規ビスホスホネート MPMBP 全身投与の影響
第39回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会 2018年

千葉美麗, 阿部陽子, Sanicha Yaklai, Roan Pechayco
歯周組織の骨代謝活性の亢進誘導
第17回 バイオメカニクス分科会講演会 2018年

阿部陽子, 千葉美麗, 斉藤志都, 鈴木飛佳里, 野上晋之介, 山内健介, 高橋哲
顎矯正手術後の治癒過程における骨代謝活性の亢進現象
第28回日本顎変形症学会 2018年

Mirei Chiba, Yoko Abe, Sanicha Yaklai, Roan Pechayco, Tetsu Takahashi
Acceleratory Phenomenon of Bone Metabolic Activity after Orthognathic Surgery
96th IADR/PER General Session & Exhibition 2018年 (国際学会)

千葉美麗, 安田真弓, ロアン ペチャイコ, サニーシャ ヤクライ
メカニカルストレスに対する iPS 細胞の細胞応答
2018年度日本実験力学会年次講演会 2018年

滝澤愛子, 千葉美麗, 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 がラット骨形成に及ぼす影響
第76回 日本矯正歯科学会学術大会 2017年

阿部陽子, 千葉美麗, 鈴木飛佳理, 山口佳宏, 片岡良浩, 野上晋之介, 山内健介, 高橋哲
顎矯正手術後の治癒過程における血清骨代謝マーカーとCirculating osteoblast-lineage cells の解析
第62回日本口腔外科学会学術大会 2017年

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(国際学会) 2017年03月22日~2017年03月25日 Moscone West, San Francisco, CA 94103, USA.

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(国際学会) 2017年03月22日~2017年03月25日 Moscone West, San Francisco, CA 94103, USA.

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] methanebisphosphonate, facilitates bone formation by local administration to the alveolar bone in rats
The 2017 Japan-NIH joint Symposium(国際学会) 2017年02月15日~2017年02月17日 Seiry Auditorium, Seiry Campus, Tohoku University, Japan.

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02月04日 仙台サンプラザ、仙台市

千葉美麗

【臨床セミナー2:理学療法と矯正歯科治療】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~

第75回日本矯正歯科学会大会(招待講演) 2016年11月07日~2016年11月09日 アステイ徳島・むらさきホール、徳島市

千葉美麗、滝澤愛子、太田岳、安田真弓、林治秀

マイクロCTを用いたラット脛骨の解析 力学的マーカーと組織学的および細胞生物学的マーカーの関連

日本実験力学学会2016年年次講演会 2016年09月01日~2016年09月03日 近畿大学東大阪キャンパス、東大阪市

千葉美麗、太田岳、安田真弓、林治秀

力学的振動刺激に対する細胞応答 リアルタイムPCR法を用いた遺伝子発現のための基礎的データ解析 2016年09月01日~2016年09月03日 近畿大学東大阪キャンパス、東大阪市

M. Chiba, T. Ota, M. Yasuda, H. Hayashi

94th General Session and Exhibition of the IADR/AADR/APR(国際学会)

Mechanosensing by Vibration: Cytoskeletal Changes and Signal Transduction

2016年06月22日~2016年06月25日 COEX Convention & Exhibition Center, Seoul, Republic of Korea.

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03月19日~2016年03月19日 パレス松島、宮城県

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)(国際学会) 2015年11月01日~2015年11月04日 Kunibikimesse, Shimane Prefectural Convention Center, Matsue, Japan

⑳ 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)(国際学会) 2015年11月01日~2015年11月04日 Kunibikimesse, Shimane Prefectural Convention Center, Matsue, Japan

㉑ 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09月11日~2015年09月13日 朱鷺メッセ、新潟

- ⑳ 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 09 月 11 日～2015 年 09 月 13 日 朱鷺メッセ、新潟
- ㉑ 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 08 月 28 日～2015 年 08 月 29 日
新潟大学工学部、新潟市
- ㉒ 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
The 14th Conference on Biomechanics in Niigata 2015 年 03 月 14 日 新潟大学(新潟市)
- ㉓ 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の影響
第 75 回日本矯正歯科学会 2014 年 10 月 20 日～2014 年 10 月 22 日 幕張メッセ(千葉県千葉市)
- ㉔ 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～2014 年 10 月 22 日 幕張メッセ(千葉県千葉市)
- ㉕ 太田 岳、千葉美麗、滝澤愛子、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～2014 年 10 月 22 日 幕張メッセ(千葉県千葉市)
- ㉖ 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 08 月 28 日～2014 年 08 月 30 日
兵庫県立大学姫路工学キャンパス(兵庫県姫路市)
- ㉗ 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 回骨代謝学会学術大会
2014 年 07 月 24 日～2014 年 07 月 26 日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
- ㉘ 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 07 月 01 日～2014 年 07 月 04 日
万国津梁館(沖縄)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：五十嵐 薫

ローマ字氏名：Kaoru Igarashi

所属研究機関名：東北大学

部局名：歯学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70202851

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。