

平成 29 年 5 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463084

研究課題名(和文) 牽引力による縫合間葉系幹細胞分化のCTGFとOdz3による分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of CTGF and Odz3 in biological response of sutures to tensile force

研究代表者

竹下 信郎 (Takeshita, Nobuo)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50431515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：牽引力による縫合の生物反応メカニズムの解明を目指し、CTGFの機能解析を行った。マウス矢状縫合への牽引力負荷後3時間に、縫合におけるCtgfとVegfの発現上昇が認められた。CTGF中和抗体投与により、牽引力による縫合でのVegf発現上昇は抑制された。CTGF中和抗体を投与しながら21日間縫合に牽引力を負荷した結果、縫合性骨形成の抑制が認められた。さらにマウスの頭蓋矢状縫合由来の細胞の培養に成功し、それらの細胞を用いたin vitroでのCTGFの機能解析を行っている。これらの成果から、CTGFは牽引力による縫合の生物反応を制御する重要な因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the function of CTGF during biological response of cranial sutures to tensile force. Tensile force induced the expression of Ctgf and Vegf in sutures 3 hours after loading. The tensile force-induced Vegf expression in sutures was inhibited by the administration of CTGF-neutralizing antibody. The administration of CTGF-neutralizing antibody also inhibited sutural bone formation induced by tensile force. Moreover, we have cultured primary suture-derived cells to analyze CTGF function in vitro. Our findings indicate that CTGF is an essential factor to regulate biological response of sutures to tensile force.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：縫合 CTGF 牽引力

## 1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療では、顎顔面領域の縫合に牽引力を顎整形力として負荷することにより、成長期患者における骨格的不調和を改善する。例えば、上顎前方牽引装置は鼻上顎複合体の縫合に、急速拡大装置は正中口蓋縫合に牽引力を負荷し、それぞれ上顎骨の前方成長と側方拡大を促す。これらの牽引力を縫合に適応する矯正歯科治療を、効果的かつ少ない為害性で行うためには、牽引力による縫合の生物反応のメカニズムを理解することが必須である。

縫合は脳頭蓋と顔面頭蓋の骨を結合する線維性組織であり、膜内性骨化による顎顔面骨格成長の中心である。縫合に牽引力が負荷されると、初期には隣在する骨間距離の開大に伴う縫合の拡大が認められ、その後経時的に骨辺縁に新生骨が添加することにより、骨格サイズの増大とともに、牽引力負荷前と同じ幅径の縫合組織の再構築が起こる。申請者らは最近、牽引力が負荷されたマウス頭蓋縫合の初期反応として、VEGF と血管内皮細胞マーカーの発現亢進を初めて明らかにした。一方、牽引力により誘導される縫合部での骨芽細胞分化および骨形成は、BMP-4 や osteopontin により分子的に制御される。以上のことから、縫合への牽引力負荷により初期には血管形成が誘導され、酸素、サイトカイン、および骨芽細胞の前駆細胞が供給されることにより、後に骨芽細胞分化が亢進し新生骨の形成が誘導されることが推察される。しかし、その一連の過程における縫合の細胞動態と分子制御機構の詳細は明らかではない。

CTGF は CCN ファミリーに属する因子で、細胞の増殖、分化、細胞外基質産生に関与し、血管形成や骨形成を促す。また CTGF は、種々の細胞・組織において機械的刺激に対する反応因子として機能する。申請者らは、牽引力が負荷されたマウス頭蓋縫合の初期反応で

CTGF の発現が亢進し、また CTGF 中和抗体により牽引力による縫合での VEGF 発現亢進が抑制されることを示した。さらに申請者らは、マウス頭蓋縫合への圧縮力負荷により、縫合および隣在する骨の骨細胞において CTGF の発現が上昇することを示した。以上の結果から、CTGF は機械的刺激が負荷された縫合での血管形成や骨形成を促すことが示唆される。

以上の背景のもと申請者らは、効果的で為害性の少ない牽引力を縫合に適応する矯正歯科治療を目指した基盤的知見を得るために、牽引力による縫合の生物反応メカニズムの解明を目指し、縫合における CTGF の機能に着目した解析を行うこととした。

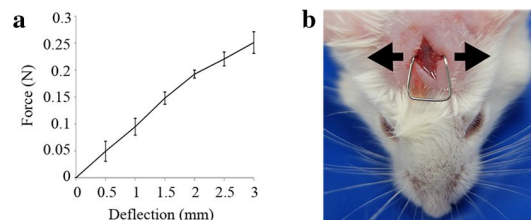
## 2. 研究の目的

牽引力による縫合の生物反応メカニズムの解明を目指し、牽引力による縫合の初期反応である血管形成とその後の骨形成の分化制御因子として CTGF の機能を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1) 頭蓋縫合への牽引力負荷モデル

6 週齢雄性 ICR マウスの頭頂骨にスプリングを装着し、矢状縫合に牽引力を負荷した。牽引力は初期荷重 0.2 N に設定した。また中和抗体投与実験では、縫合部皮下に CCN2/CTGF 中和抗体を注射しながら、牽引力を 21 日間矢状縫合に負荷した。



### 2) 免疫組織化学

牽引力が負荷された矢状縫合の組織切片を作製し、pERK1/2 の免疫組織化学を行った。

### 3) リアルタイム PCR

牽引力が負荷された縫合組織から RNA を精製し、Ctgf、Vegf、および Hif1 $\alpha$  の発現をリアルタイム PCR で解析した。

#### 4) Western blot

牽引力が負荷された縫合組織からタンパク質を精製し、ERK1/2 と pERK1/2 の発現を western blot で解析した。

#### 5) 新生骨形成解析

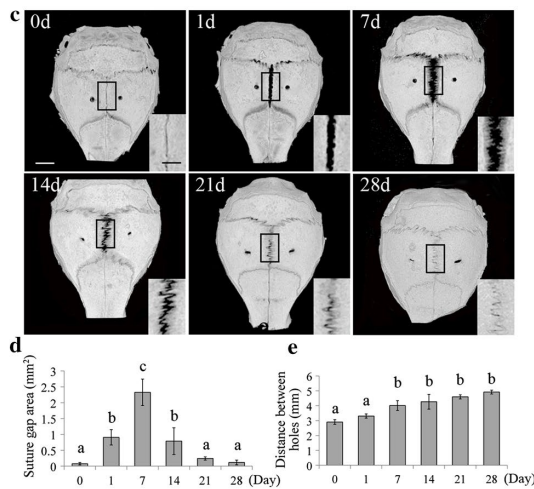
マイクロ CT 解析と、カルセインおよびテトラサイクリンによる骨標識により、新生骨形成解析を行った。

#### 6) 縫合細胞培養

6週齢雄性 ICR マウス頭蓋矢状縫合組織を採取し、骨膜と硬膜を除去した後、培養ディッシュ上に静置し、縫合細胞を遊走、増殖させた。トリプシンを用いて細胞を回収し、間葉系幹細胞培地で培養した。

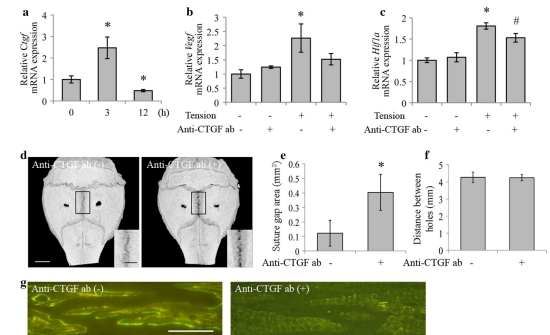
### 4. 研究成果

1) 牽引力は持続的に縫合を拡大し、7日目にピークに達した。その後、縫合性骨形成が進行し、拡大された縫合領域の面積は経時的に減少した。

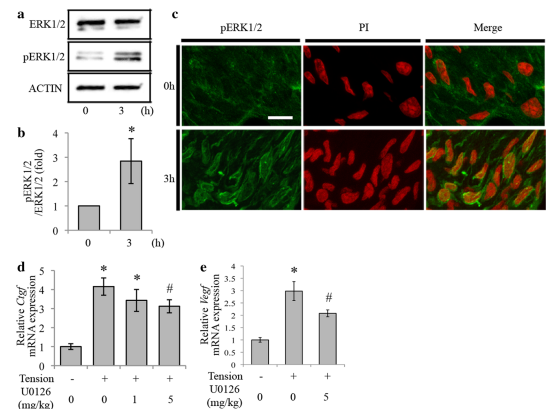


2) 牽引力負荷後3時間に、縫合における CTGF、VEGF、および Hif1 $\alpha$  の発現上昇が認められた。CTGF 中和抗体投与により、

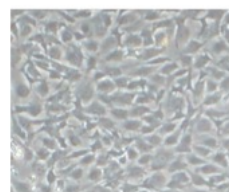
牽引力による縫合での VEGF および Hif1 $\alpha$  発現上昇は抑制された。CTGF 中和抗体を投与しながら21日間縫合に牽引力を負荷した結果、縫合性骨形成の抑制が認められた。



3) 縫合における ERK1/2 の活性化が、牽引力負荷後3時間で認められ、ERK1/2 阻害剤は、牽引力による CTGF および VEGF 発現上昇を部分的に抑制した。



4) 6週齢マウスの頭蓋矢状縫合由来の細胞の培養に成功した。現在、それらの細胞を用いた in vitro での CTGF の機能解析を行っている。



### 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 1 件）

Nobuo Takeshita, Masakazu Hasegawa, Kiyo Sasaki, Daisuke Seki, Masahiro Seiryu, Shunro Miyashita, Ikuko Takano, Toshihito Oyanagi, Yuki Miyajima, Teruko Takano-Yamamoto. *In vivo* expression and regulation of genes associated with vascularization during early response of sutures to tensile force. *J Bone Miner Metab.* 2017, 35(1):40-51. doi: 10.1007/s00774-016-0737-z., 査読あり

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 竹下信郎、佐々木紀代、関大輔、清流正弘、宮下俊郎、高野郁子、大柳俊仁、長谷川正和、山本照子、**CCN2/CTGF** は牽引力が負荷された頭蓋縫合における骨および血管の形成を制御する、第 75 回日本矯正歯科学会大会、徳島、2016.11.7-9
2. 竹下信郎、関大輔、清流正弘、木村晴地、高野郁子、大柳俊仁、吉田倫子、長谷川正和、山本照子、機械的刺激が促す骨形成過程における前駆骨芽細胞凝集への **CCN2/CTGF** の影響、第 8 回日本 CCN ファミリー研究会、岡山、2016. 8. 27
3. 竹下信郎、佐々木紀代、関大輔、宮下俊郎、高野郁子、大柳俊仁、山本照子、**CCN2/CTGF** は牽引力が負荷された頭蓋縫合における血管および骨の形成を制御する、第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2016. 7. 20-23

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹下 信郎 (NOBUO TAKESHITA)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：50431515

### (2) 研究分担者

千田 透子 (TOKO CHIDA)

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：40647947

### (3) 連携研究者

加藤 龍史 (RYUSHI KATO)

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：90706699