様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：１２６０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６３０８９

研究課題名（和文）メカニカルストレスによる歯根膜幹細胞ニッチを介した骨形成シグナル制御機構の解明

研究課題名（英文）The study of bone modeling signals mediated by periodontal stem cells under mechanical stress

研究代表者

金香　佐和（KANEKO, Sawa）

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：８０３７２４４９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：これまで、矯正力に対してこのような増殖能や分化能をもつ歯根膜細胞の歯根膜内局在変化について報告されていない。本研究は、細胞増殖関連マーカーであるKi67およびLGR5を指標にして、矯正的歯の移動時における、細胞増殖能や骨芽細胞様分化能を示す歯根膜細胞の局在の推移変化について、ラット矯正移動モデルを用いて、免疫組織学的および生化学的観点から検証した。本研究の結果から、矯正学的な歯の移動の早期において、歯根膜内における細胞増殖関連マーカーKi67およびLGR5の発現は増加した。さらに、Ki67の発現部位は、骨芽細胞分化マーカーRUNX2と共局在することが認められた。

研究成果の概要（英文）：The response of stem cell-associated markers to orthodontic force in the periodontal ligament (PDL) in vivo is poorly understood. The aim of the study was to characterize the expression and localization of cell proliferation and osteogenic differentiation factors in the PDL during tooth movement, using Sprague-Dawley rats. Our findings suggested that orthodontic force induces Ki67 and LGR5-positive cells in the PDL in the early phase of orthodontic tooth movement.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯の矯正移動　動物実験　歯根膜幹細胞

１．研究開始当初の背景
歯根膜は、メカニカルストレスに応じて組織の再形成が間断なく行われる動的な器官である。歯周組織の形成において、歯周組織に存在する幹細胞が一端を担うと考えられ、歯根膜からin vitro において多分化能を持つ幹細胞が分離され、歯根膜幹細胞が発現するさまざまな幹細胞マーカーについて報告されている。

咬合力や矯正力などのメカニカルストレスは、歯槽骨の形成および吸収を制御する重要な要素であり、歯根膜に存在する骨芽細胞や破骨細胞は、伸展、曲げ、流れなどの刺激を受け、歯槽骨の形態を形成する。幹細胞を用いたin vitro研究により、歯根膜幹細胞や歯髄幹細胞の細胞性格が同定され、それらは多分化能をもち、分化刺激に応じて、骨芽細胞や軟骨細胞へ分化することが報告された。in vitroでは、幹細胞は、BMPシグナル（BMP2）、Wntシグナル（β-catenin）、RUNXシグナル（RUNX2）などの複数の経路により骨芽細胞への分化が進行すること、さらに、BMPシグナルとWntシグナルがクロストークすることが明らかにされた。8週齢SD系ラットを用いた矯正移動モデルにおいて、3日目をピークに、矯正移動歯の圧迫側歯根膜内における幹細胞マーカーNestinとPDGFRαの陽性反応が生じ、このとき、同部位においてβ-cateninのタンパクレベルの優位な上昇が認められた。培養ラット歯根膜幹細胞への進展力の負荷実験から、矯正移動歯におけるWnt/β-cateninシグナルを介したRANKL/OPGの発現制御と骨芽細胞への分化誘導が示唆された。

マラッセの上皮遺残は、歯根膜幹細胞の集合体であり、歯根膜幹細胞のニッチであると考えられている。幹細胞ニッチ内部に局在する幹細胞への骨形成に関する情報伝達は、矯正力などのメカニカルストレスによる制御を受け、歯槽骨の再形成、歯の矯正移動が円滑に進行すると推察される。しかし、矯正移動歯における、歯根膜幹細胞の局在変化と骨形成シグナルの詳細を、in vivoにおいて解析した報告は非常に少なく、不明な点が多い。

２．研究の目的
矯正力は、歯周組織に存在するさまざまな細胞に作用し、歯の移動を生じる。活発な増殖能および多分化能を持つ歯根膜前駆細胞は、メカニカルストレスの影響を受けながら、骨芽細胞様あるいは破骨細胞様の細胞を形成することが in vitro 研究により報告されている。しかしながら、矯正力に対してこのような増殖能や分化能をもつ歯根膜細胞の歯根膜内局在変化については、これまで報告されていない。そこで本研究では、幹細胞マーカーである細胞増殖関連マーカーKi67 および LGR5 を指標にして、矯正的歯の移動時における、細胞増殖能や骨芽細胞様分化能を示す歯根膜細胞の局在の推移変化について、免疫組織学的および生化学的観点から検証した。

３．研究の方法
5 週齢雄性 SD ラット（n=10）の上顎右側第一臼歯（RM1）に、10 gf の Ti-Ni コイルスプリングを装着し、rM1 の近心移動を 1 週間行った（図 1）。同顎の左側第一臼歯（LM1）は、対照群とした。各動物は、実験開始 3 日後および 7 日後に、マイクロ CT を用いて歯の移動量を測定した。屠殺後、歯根膜組織の免疫組織学的解析および定量 PCR 法を用いた生化学的解析を行い、統計学的に評価（$p < 0.05$）した。

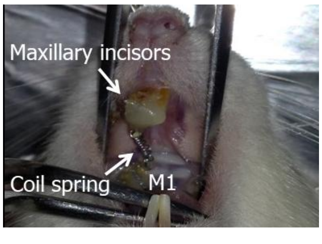
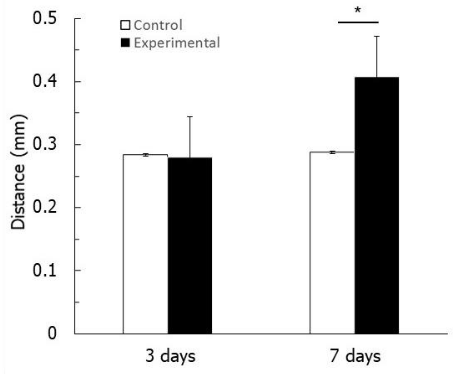
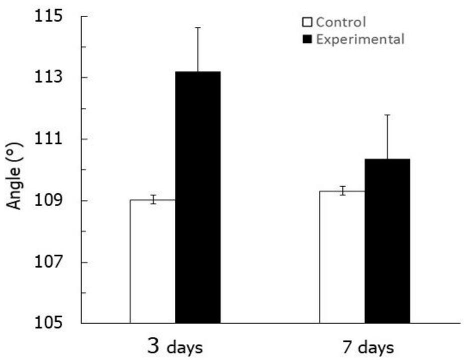


図 1.ラット上顎 M1 の矯正装置

４．研究成果

（１）マイクロ CT 解析により、実験開始 3 日後および 7 日後における RM1 の近心移動が認められた。（図 2）



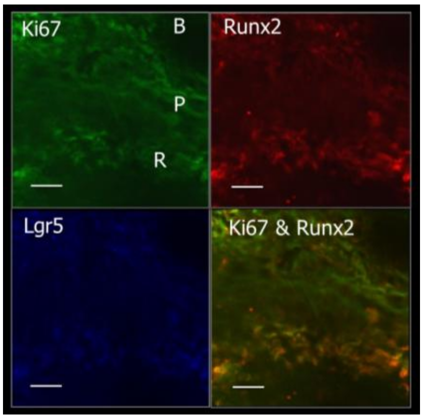


□対照群　■実験群　*p ＜ 0.05

図 2．M1 の矯正移動の様相

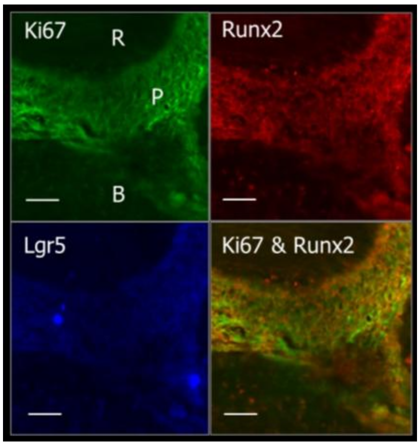
（上,移動距離；下,歯軸角度）

（２）蛍光免疫染色により、Ki67、LGR5 および骨芽細胞様分化マーカーRUNX2 の歯根膜内の発現は、実験開始 3 日後では LRM1 と比較して、RM1 において有意な増加が認められた。また、Ki67 の発現は、RUNX2 の発現と一部共局在していた。(図 3,4)



(B,歯槽骨;P,歯根膜;R,歯髄)

図 3．移動 3 日後 M1 近心側歯根膜免疫染色像

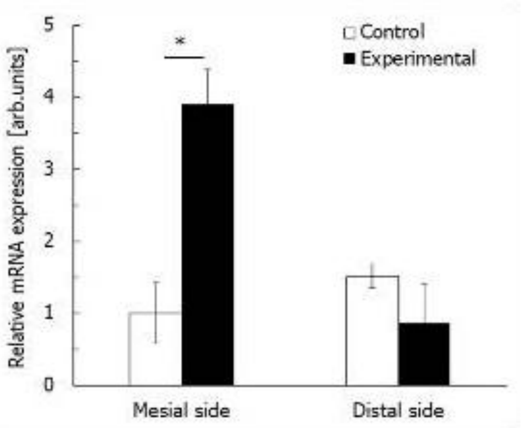


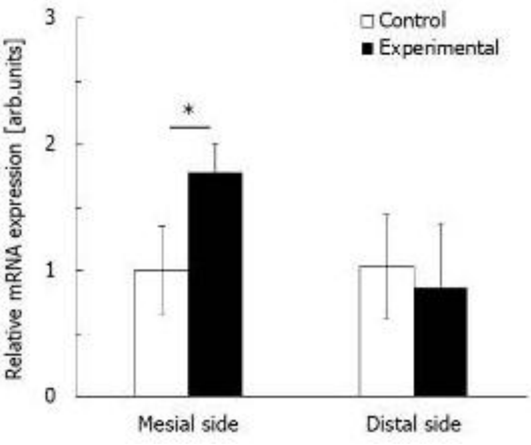
(B,歯槽骨;P,歯根膜;R,歯髄)

図 4．移動 3 日後 M1 遠心側歯根膜免疫染色像

実験開始 7 日後では RM1 における Ki67 と RUNX2 の発現は、ともに減少した。

（３）定量 PCR 法により、Ki67 および RUNX2 の mRNA レベルは、実験開始 3 日後では遠心側歯根膜と対照的に、近心側歯根膜において発現が上昇した。





□対照群　■実験群　*p ＜ 0.05

図 5．移動 3 日後歯根膜を対象とした定量 PCR 解析結果（上,Ki67；下,RUNX2）

（４）結論として、矯正学的な歯の移動の早期において、歯根膜内における細胞増殖関連マーカーKi67およびLGR5の発現は増加した。さらに、Ki67 の発現部位は、骨芽細胞分化マーカーRUNX2 と共局在することが認められた。

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 件）
① Kasahara Y, Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Kaneko S, Ishida Y, Shibutani N, Shimizu Y, Okito A, Oishi S, Kuma Y, Yamaguchi H, Ono T. Low-intensity pulsed ultrasound reduces periodontal atrophy in occlusal hypofunctional teeth. Angle Orthod. 査読有. Epub ahead of print. 2017.
doi: 10.2319/121216-893.1.

〔学会発表〕（計 1 件）
① Jun Hosomichi, Takumi Suzuki, Naoki Shibutani, Kasumi Hatano, Hiroyuki Yamaguchi, Yo-ichiro Kuma, Sawa Kaneko, Takashi Ono. Distribution of Ki67 and LGR5-positive Periodontal Cells During Tooth Movement. 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. 2017 年 3 月 22 日-25 日. サンフランシスコ（アメリカ合衆国).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
金香　佐和（KANEKO, Sawa）
東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：80372449

(2)研究分担者
細道　純（HOSOMICHI, Jun）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号： 00420258

石田　雄之（ISHIDA, Yuji）
東京医科歯科大学・学内共同利用施設等・特任助教
研究者番号：00516297

清水　康広（SHIMIZU, Yasuhiro）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師
研究者番号： 60631968

臼見　莉沙（USUMI, Risa）
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号： 90706946