

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463104

研究課題名(和文) 歯周組織リモデリングの分子調節機構解明と再生修復促進

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of the periodontal tissue repair

研究代表者

中野 敬介 (Nakano, Keisuke)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10325095

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)：本研究課題で以下の結果を得た。

1. 骨髄幹細胞が歯根膜構成細胞および歯髓細胞に分化することを確認した。2. 骨髄由来幹細胞はリモデリングの盛んな部位に生着することを示した。3. 傷害性刺激を加えた歯根膜組織では骨髄由来細胞とHSPや神経内分泌関連因子とが密接に関連していた。4. 歯科矯正治療法の改良や新手法の開発、外傷の効果的な治療法につながる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the following results in this study.

1. Bone marrow stem cells have a potential to differentiate into dental pulp cells and periodontal ligament cells. 2. Bone marrow stem cells engraft in the active remodeling tissues. 3. There were close relations in the expression of HSPs and Neuroendocrine-related factors and bone marrow derived cell in the periodontal ligament under injurious stimuli. 4. These results can be applied to development of new orthodontic treatment and the effective treatment of the injury.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯根膜 骨髄幹細胞 歯周組織 歯髓組織 メカニカルストレス 歯科矯正学 リモデリング

### 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臨床応用研究が始まっており、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、骨髄幹細胞を用いた再生医療研究は骨組織の再建等限られた領域で報告があるのみであり、今後の発展が見込まれる。歯内・歯周病学と歯科矯正学領域は、歯牙と骨組織が密接に関連した組織を対象としており特に期待される分野である。歯科矯正治療時には、牽引側表面に骨芽細胞、圧迫側に破骨細胞が出現し、骨組織の吸収と添加の結果「歯の移動」が起こる。この過程には骨髄幹細胞が関与していると推察される。また、顎骨の骨折、抜歯創の治療、粘膜損傷の治療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過程には骨髄幹細胞が関与すると考えられる。これらの場合における局所の骨髄幹細胞の振る舞いについて検討した報告は殆ど無く、いかにして必要な場所に骨髄幹細胞を定着させるかも不明である。従って、骨髄幹細胞の機能解明を行う生物学的意義は非常に大きい。骨髄幹細胞の機能解明により、歯周疾患や外傷に対する効果的な再建修復療法や歯科矯正学的治療法の開発に繋がるのみならず、様々な臓器組織の再生修復療法に必須な根幹技術が得られる。

### 2. 研究の目的

骨髄幹細胞を用い、歯周組織の修復とリモデリングを促進的に生じさせると共に、骨髄幹細胞の動態および機能の全貌を明らかにし、骨髄幹細胞を用いた新規の歯周組織再建修復法、歯科矯正学的治療法の開発を行う。また、末梢血中に存在する骨髄幹細胞の効果的な局所誘導と幹細胞分化誘導および分化抑制法について検討する。

### 3. 研究の方法

(1) GFP 骨髄細胞移植マウス・ラットを用いて歯周組織損傷モデル動物、歯科矯正学的牽引モデル動物の作成を行う。また同動物の組織学的解析を行い、歯周組織修復時およびリモデリング時の骨髄幹細胞の動態・機能について解析する。

(2) 骨髄幹細胞由来の歯周組織構成細胞の初代培養、生化学的解析を行い、骨髄幹細胞の同構成細胞への分化機構を明らかにする。なお、骨髄幹細胞と歯周組織を構成する通常細胞との共生培養実験を行い、分化干渉作用

について解析する。

(3) 創傷治癒モデルマウス、骨折治癒モデルマウス、抜歯創治癒モデルマウス、矯正学的歯の移動モデルマウスに、骨髄幹細胞の組織生着率を促進させる条件を局所的に付加し、その効果について検討する。

### 4. 研究成果

歯科矯正学的牽引モデル動物および歯周組織損傷モデル動物の作製を行い、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。歯科矯正学的牽引時における歯周組織の変化において、歯根膜組織への力学的刺激が引き起こす骨芽細胞の分化を免疫組織化学的に詳細に検討した。また、歯周組織損傷モデル動物では、歯周組織の恒常性維持やリモデリング、組織修復、細胞分化に HSPs や神経内分泌関連因子が関与していることを示した。骨髄幹細胞の歯牙および歯周組織細胞への分化能に関する研究では、骨髄幹細胞が骨芽細胞、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ているが、これらの前駆細胞となる骨髄幹細胞は、組織により生着の度合いが異なり、主にリモデリングが盛んな組織や再生修復過程にある組織で生着しやすい事を示した。また、この際に末梢神経と骨髄由来幹細胞の間に密接な関係があることを示した。この結果は、歯科矯正学的牽引モデル動物を用いた実験において示された、メカニカルストレスを受け、リモデリングが盛んな歯根膜組織に骨髄幹細胞由来の細胞が多数存在していることとも一致する。これら一連の研究結果により、人為的に骨髄由来幹細胞を所定の場所へ供給することが可能であることが示された。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歯周組織に加えることにより、効率的な幹細胞の局所への誘導、歯周組織リモデリングや修復の促進、および効率的な矯正学的歯の移動が可能になると考えられ、幹細胞の実験的局所誘導というアプローチを通じて技術的にもその可能性が強く示された。これらの結果は骨髄幹細胞を用いた組織再生や修復を効果的に行う治療法開発に具体的実現性を提供するものとなった。

### 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13件)

Sakai K, Nakano K, Matsuda S,

Tsujigiwa H, Ochiai T, Shoumura M, Osuga N, Hasegawa H and Kawakami T. Pathological Analysis of Cell Differentiation in Cholesterol Granulomas Experimentally Induced in Mice. *Int J Med Sci* 13 (3): 220-224, 2016. 査読有, doi: 10.7150/ijms.13853

Mimura H, Takaya T, Matsuda S, Nakano K, Muraoka R, Tomida M, Okafuji N, Fujii T, and Kawakami T. Functional Role of HSP47 in the Periodontal Ligament Subjected to Occlusal Overload in Mice. *Int J Med Sci* 13 (4): 248-254, 2016. 査読有, doi: 10.7150/ijms.14129

Matsuda S, Shoumura M, Osuga N, Tsujigiwa H, Nakano K, Okafuji N, Ochiai T, Hasegawa H and Kawakami T. Migration and Differentiation of GFP-transplanted Bone Marrow-derived Cells into Experimentally Induced Periodontal Polyp in Mice. *Int J Med Sci* 13 (7): 500-506, 2016. 査読有, doi: 10.7150/ijms.15671

Matsuda S, Nakano K, Tsujigiwa H, Takabatake K, Okafuji N, Shoumura M, Osuga N, Nagatsuka H and Kawakami T. Overview of Cytological Dynamics of Periodontal Ligament Inflammatory Lesions. *Int J Dent Oral Sci* S9: 001, 1-7, 2016. 査読有, doi: dx. Doi. Org/10.19070/2377-8075-SI09001

Takaya T, Mimura H, Matsuda S, Nakano K, Tsujigiwa H, Tomida M, Okafuji N, Fujii T and Kawakami T. Cytological kinetics of periodontal ligament in an experimental occlusal trauma model. *Int J Med Sci* 2015; 12(7): 544-551. 査読有, doi: 10.7150/ijms.12217

Kaneko K, Matsuda S, Muraoka R, Nakano K, Iwasaki T, Tomida M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H and Kawakami T. Histological evaluation of periodontal ligament in response to orthodontic mechanical stress in mice. *Int J Med Sci* 2015; 12(9): 689-694. 査読有, doi: 10.7150/ijms.12883

Takamine K, Ueda Y, Nakano K, Ochiai T, Sugita Y, Kubo K, Maeda H, Hasegawa H and Kawakami T. Notch as a possible cell differentiation factor in

pleomorphic adenomas. *Int J Med Sci* 2015; 12(10): 759-763. 査読有, doi: 10.7150/ijms.12882

Matsuda S, Yokoi Y, Moriyama K, Shoumura M, Osuga N, Nakano K and Kawakami T. Pathological examination of experimentally induced periodontal polyp in mice. *J Hard Tissue Biol* 24: 307-400, 2015. 査読有, doi: 10.7150/jhtb.24.397

Naruse K, Udagawa N, Gard A, Nakamura M and Nakano K. Vertical ridge augmentation using allograft and synthetic hydroxyapatites after strategic extraction. *Clin Adv Periodontics* 4:81-87, 2014. 査読有, doi: 10.1902/cap.2012.120055

Alam MK, Qamruddin I, Muraoka R, Nakano K, Okafuji N. Validity of W Angle and YEN Angle in a Sample from Pakistani and Bangladeshi Populations. *J Hard Tissue Biol* **23**: 351-6. 2014. 査読有, doi: 10.2485/jhtb.23.351

Fujii T, Takaya T, Mimura H, Osuga N, Matsuda S, Nakano K. Experimental model of occlusal trauma in mouse periodontal tissues. *J Hard Tissue Biol* **23**: 377-80. 2014. 査読有, doi: 10.2485/jhtb.23.377

Shahid F, Alam MK, Khamis MF, Muraoka R, Nakano K, Okafuji N. Validity and reliability of digital model measurements: A digital stereomicroscopic study. *J Hard Tissue Biol* **23**: 439-44. 2014. 査読有, doi: 10.2485/jhtb.23.439

外傷性ストレスに対する歯周組織に関する実験的歯間分離モデルによる検討．岡藤範正，中野敬介，鍋山篤史，山木貴子，魚住智子，安東信行，横井由紀子，大須賀直人，西川康博．日外傷歯誌 10(1): 27-33. 2014. 査読有

〔学会発表〕(計26件)  
American (45th) and Canadian (40th) Association for Dental Research, 2016年3月18日 Los Angeles, CA, USA

1) Muraoka R, Nakano K, Yamada K, Kawakami T. HSP70 expression as recovery reaction in the mouse periodontal tissues. (Abstract #1429; Web Abstract: <https://aadr2016.zerista.com/poster/membe>

r/56320;

硬組織再生生物学会総会(25回)2016年8月20日,東京

2) 松田紗衣佳, 中野敬介, 正村正仁, 大須賀直人, 落合隆永, 辻極秀次, 長塚 仁, 長谷川博雅, 川上敏行. コレステリン肉芽腫における骨髄由来の血管内皮細胞の増殖. J Hard Tissue Biol 25: 400, 2016; プログラム抄録集 p43.

日本口腔科学会中部地方部会(59回)2016年9月11日, 塩尻

3) 金子 圭子, 松田 紗衣佳, 村岡 理奈, 中野 敬介, 富田 美穂子, 辻極 秀次, 長塚 仁, 川上敏行. 歯科矯正学的メカニカルストレスによる歯周組織の改造. プログラム・抄録集 p25.

4) 村岡理奈, 中野敬介, 山田一尋, 川上敏行. メカニカルストレスが惹起するマウス歯根膜の傷害と回復における HSP70 の発現推移. プログラム・抄録集 p25.

5) 三村泰亮, 高谷達夫, 中野敬介, 松田紗依佳, 富田美穂子, 岡藤範正, 藤井健男, 川上敏行. 実験的咬合性外傷部の歯根膜組織における HSP47 の発現推移. プログラム・抄録集 p26.

6) 高谷達夫, 三村泰亮, 松田 紗依佳, 中野敬介, 辻極秀次, 富田 美穂子, 岡藤範正, 藤井健男, 川上敏行. 実験的咬合性外傷の歯根膜部における創傷と治癒. プログラム・抄録集 p27.

7) 斉藤進之介, 鍋山篤史, 中野敬介, 岡藤範正, 川上敏行. 歯髄における傷害反応とその回復における HSP の発現. プログラム・抄録集 p28.

8) 松田紗衣佳, 中野敬介, 正村正仁, 大須賀直人, 落合隆永, 辻極秀次, 長塚 仁, 長谷川博雅, 川上敏行. 骨髄間葉細胞由来の血管内皮細胞の実験的コレステリン肉芽腫における増殖. プログラム・抄録集 p28.

European Association of Oral Medicine (13th)2016年9月15-17日, トリノ, イタリア

9) Matsuda S, Shoumura M, Osuga N, Tsujigiwa H, Nakano K, Okafuji N, Ochiai T, Hasegawa H and Kawakami T. Cell migration and differentiation of BMDCs into periodontal polyp. A07; Oral Dis 22 (S2): 11, 2016.

10) Muraoka R, Nakano K, Yamada K and Kawakami T. HSP70 in recovery of the mouse PDL by mechanical stress. A12; Oral Dis 22 (S2): 12, 2016.

日本矯正歯科学会大会(第75回)2016年11月7~9日(徳島)

11) 村岡理奈, 中野敬介, 川上敏行, 山田一尋. 歯科矯正学的メカニカルストレスが引き起こすマウス歯根膜における HSP70 の免疫組織化学的発現推移. プログラム・抄録集 p187.

Asia Pacific Dental Congress (37th) 2015年4月2-5日(Singapore)

12) Kawakami T, Nakano K, Sugita Y, Kubo K, Maeda H and Hasegawa H: Heat shock protein 27 as a promoting factor of squamous metaplasia in ameloblastomas. (プログラム P. 66)

日本臨床口腔病理学会総会(第26回)2015年7月29-31日北海道大学, 札幌

13) 金子圭子, 松田紗衣佳, 辻極秀次, 中野敬介, 長塚 仁, 川上敏行: 歯科矯正学的メカニカルストレスによるマウス歯周組織改造における細胞動態. プログラム・抄録集 p107, 2015

14) 松田紗衣佳, 中野敬介, 落合隆永, 辻極秀次, 長塚 仁, 長谷川博雅, 川上敏行: マウスにおける実験的コレステリン肉芽腫の細胞動態に関する検討. プログラム・抄録集 p108, 2015

硬組織再生生物学会(第23回)2015年8月22日大阪歯科大学, 大阪

15) 三村泰亮, 高谷達夫, 中野敬介, 松田紗衣佳, 富田美穂子, 岡藤範正, 藤井健男, 川上敏行. 実験的咬合性外傷における歯根膜中の HSP47 の発現推移. (プログラム・抄録集 p41; J Hard Tissue Biol 24: 490, 2015)

16) 村岡理奈, 松田浩和, 山田一尋, 中野敬介, 川上敏行. メカニカルストレスが惹起するマウス歯根膜における HSP70 の免疫組織化学的発現推移. (プログラム・抄録集 p42; J Hard Tissue Biol 24: 409, 2015)

17) 高谷達夫, 三村泰亮, 松田紗依佳, 中野敬介, 辻極秀次, 富田美穂子, 岡藤範正, 藤井健男, 川上敏行. 実験的咬合性外傷における歯周組織変化. (プログラム・抄

録集 p 43 ; J Hard Tissue Biol 24: 409, 2015)

18) 松田紗衣佳, 中野敬介, 正村正仁, 大須賀直人, 落合隆永, 辻極秀次, 長塚 仁, 長谷川博雅, 川上敏行. 実験的コレステリン肉芽腫における骨髄間葉細胞由来の血管内皮細胞. (プログラム・抄録集 p 48 ; J Hard Tissue Biol 24: 410, 2015)

The 46th International Congress of the Italian Society of Orthodontics, Milano, Italy, October, 2015 October 13-15

19) Muraoka R, Kurata K, Nakano K, Yamada K, Kawakami T. HSP27 expression as a possible molecular chaperone in the periodontal ligament cells due to orthodontic mechanical stress.

日本矯正歯科学会大会 (第 74 回) 2015 年 11 月 18-20 日

20) 村岡理奈, 倉田和之, 松田浩和, 中野敬介, 川上敏行, 山田一尋. 歯科矯正力が惹起するマウス歯根膜細胞における HSP47 の免疫組織化学的発現推移. (プログラム・抄録集 p 187)

日本外傷歯学会総会・学術大会 (第 14 回) 2014 年 7 月

21) 岡藤 範正, 中野敬介, 魚住 智子, 山木貴子, 安東 信行, 鍋山 篤史, 横井由紀子, 大須賀直人, 西川康弘. 外傷ストレスを負荷した歯周組織変化 実験的歯間分離による検討 .

硬組織再生生物学会 (第 22 回) / The 7th Asian science seminar in Taiwan 2014 年 8 月

22) 辻極秀次, 村岡理奈, 中野敬介, 富田美穂子, 高畠清文, 玉村 亮, 長塚 仁, 川上敏行. 移植骨髄由来細胞の歯周組織への移動と細胞分化. (プログラム抄録集 p30; J Hard Tissue Biol **23**: 470, 2014)

23) 中野敬介, 藤田宗輝, 落合隆永, 杉田好彦, 久保勝俊, 前田初彦, 長谷川博雅, 川上敏行. HSP27のエナメル上皮腫における細胞分化の分子シャペロンとしての可能性. (プログラム抄録集p39; J Hard Tissue Biol **23**: 472-3, 2014)

24) 松田紗衣佳, 中野敬介, 正村正仁, 大須賀直人, 辻極秀次, 川上敏行. マウス

に惹起させた歯根膜息肉の病理学的検討. (プログラム抄録集p41; J Hard Tissue Biol **23**: 473, 2014)

25) 村岡理奈, 金子圭子, 中野敬介, 山田一尋, 川上敏行. 歯科矯正学的メカニカルストレスによる歯周組織の改造現象. (プログラム抄録集p42; J Hard Tissue Biol **23**: 473, 2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

中野 敬介 (NAKANO, Keisuke)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・  
准教授  
研究者番号: 10325095

### (2) 研究分担者

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

村岡 理奈 (MURAOKA, Rina)  
松本歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 20549430

辻極 秀次 (TSUJIGIWA, Hidetugu)  
岡山理科大学・理学部・教授  
研究者番号: 70335628

### (3) 研究協力者

長塚 仁 (NAGATSUKA, Hitoshi)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・  
教授  
研究者番号: 70237535