

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893220

研究課題名(和文) 歯根膜由来血管内皮細胞前駆細胞を利用した血管新生促進技術の確立と矯正治療への応用

研究課題名(英文) Application to establish the orthodontic treatment of pro-angiogenic technology using periodontal ligament-derived vascular endothelial precursor cells

研究代表者

吉田 茉莉子 (Yoshida, Mariko)

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号：80711217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、牽引や圧迫刺激が歯根膜由来血管内皮前駆細胞の血管新生能力を活性化するために働くキー遺伝子を同定すべく研究を開始した。牽引刺激による血管周皮細胞への分化マーカーである α -SMAの発現の上昇に伴い、血管内皮細胞への分化マーカーであるTie-2の発現の低下が認められた。一方、圧迫刺激を加える系でも、上記血管構成細胞マーカー遺伝子の発現調査を試みたところ、牽引刺激とは異なり血管周皮細胞マーカーの発現の低下とともに、血管内皮細胞マーカーの発現上昇が認められた。現在、この細胞の血管新生能力を活性化するために働くキー遺伝子の同定に向けて調査を継続中である。

研究成果の概要(英文)：We examined how contractile and suppressive forces affect the ability of periodontal ligament (PDL)-derived endothelial precursor cells (EPCs) to differentiate into endothelial cells (ECs) or pericytes. We found that contractile force against PDL-derived EPCs downregulated EC marker Tie-2 expression, but upregulated pericyte marker α -SMA expression. On the contrary, suppressive force against PDL-derived EPCs upregulated EC marker Tie-2 expression, but downregulated pericyte marker α -SMA expression. Thus, we succeeded to establish in vitro culture system by which we are able to evaluate how suppressive mechanical stress affects the multi-differentiation ability of these cells. We are trying to identify key genes to positively and negatively regulate differentiation of PDL-derived EPCs into ECs and pericytes.

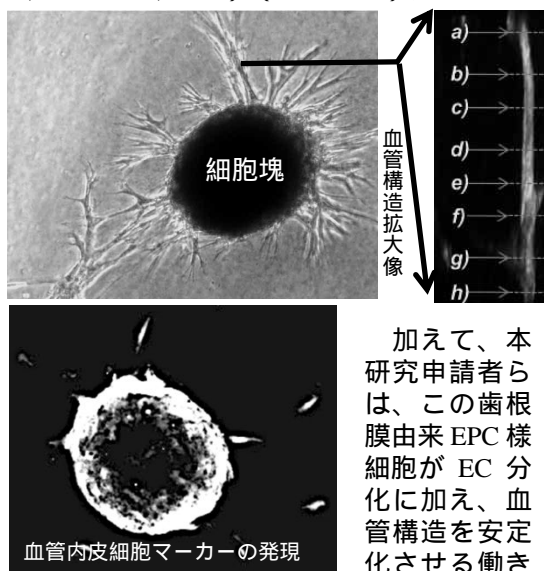
研究分野：口腔生化学

キーワード：歯根膜 血管内皮前駆細胞 血管新生 血管内皮細胞 血管周皮細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療時の効率的な歯の移動のためには、牽引側歯周組織における骨形成と圧迫側歯周組織における骨吸収がバランス良く起こることに加え、歯根膜組織のリモデリングが適切に起こることが必要である。近年、歯根膜組織中に間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) が存在し、この細胞が骨やセメント質などの硬組織や靭帯組織ならびに神経組織形成能力に加え、脂肪組織や軟骨組織形成能力を持つことが報告された (Seo et al., *Lancet*, 2004; Xu et al., *Stem Cells Dev*, 2009; Tomokiyo et al., *J Cell Physiol*, 2011)。一般的には、この MSC は骨髄組織内で増殖し、血流を介して全身の損傷組織やリモデリングが盛んな組織にホーミングした後、増殖・分化して新たな組織を形成するために働く (Ren et al., *Stem Cells Transl Med*, 2012)。一方、マクロファージ系細胞などの組織吸収性細胞は、リモデリング部位周囲の透過性の亢進した血管より浸潤して線維組織を分解したり、破骨細胞 osteoclast (OC) に分化して骨吸収を起こしたりする (Wise et al., *J Dent Res*, 2008)。このため、リモデリングの回転速度は、これらの組織形成性細胞や組織吸収性細胞の前駆細胞を運び込む局所循環の状態に大きく影響を受ける。歯の移動において必要とされる効率的な歯周組織リモデリングのためにも、牽引側ならびに圧迫側歯周組織の血流の局所循環をいかに良好に整備するかが重要なポイントになる。しかしながら、これまでは、これらのメカニカルストレスが、歯根膜中で血管形成能力を持つ MSC や血管内皮前駆細胞 endothelial progenitor cell (EPC) の増殖と血管内皮細胞 endothelial cell (EC) 分化にどのように働くのかは明らかとされていない。

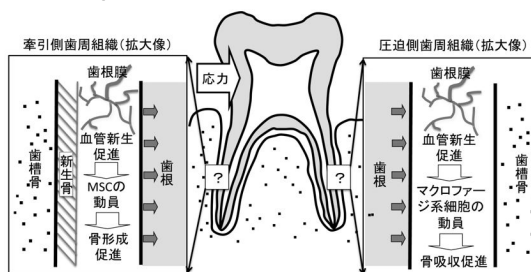
これまでに我々の研究グループは、歯根膜より EPC 様の血管形成能力を有する未分化間葉系細胞 SCDC2 を得て報告した (Okubo et al., *J Vasc Res*, 2010) (下図参照)。



を有する血管周皮細胞 (血管平滑筋様細胞) に分化する細胞内シグナル伝達機構を明らかにしている (Takahashi et al., *Int J Mol Med*, 2012; Yoshida et al., *Int J Biol Sci*, 2012)。しかしながら、この歯根膜由来 EPC 様細胞に対する牽引応力や圧迫応力が、如何なる分子メカニズム (細胞内シグナル伝達経路とそのターゲット遺伝子) を介してこの細胞の血管形成能力に影響するかについては明らかではない。

2. 研究の目的

歯科矯正治療時の歯の移動の際には、歯周組織のダイナミックなリモデリングが起きている。そのリモデリング速度を律する働きのある歯根膜由来 EPC の血管新生能力を制御するメカニズムを解明する。特に、牽引刺激と圧迫刺激の双方で、それぞれ別々の分子メカニズムにより、歯周組織での血管新生の誘導が起きることが予測されるので、持続的な牽引応力の刺激がある場合と持続的な圧迫刺激のある場合に分けて調査を進める (下図参照)。



そこで、(1) 我々が見いだした歯根膜由来 EPC 様細胞 SCDC2 に持続的な機械的応力 (牽引刺激と圧迫刺激) を加えた際に、血管構成細胞である EC ならびに血管周皮細胞マーカー遺伝子の発現を制御するために働く細胞内シグナル伝達経路ならびにそのターゲット遺伝子を捉える。(2) その牽引刺激と圧迫刺激それぞれのターゲット遺伝子の強発現系あるいはノックダウン系ベクターを作製し、マウスを利用した矯正力による歯の移動モデルにおいて歯根膜組織に *in vivo* 遺伝子導入をすることにより、牽引側と圧迫側それぞれの歯根膜組織に血管組織形成が誘導されることを確認する。(1) ~ (2) により、歯科矯正力作用時の歯根膜周囲の血管新生を自在に制御可能とし、歯周組織のリモデリングの回転速度を早めることにより、歯の移動時間の大幅な短縮化を実現する革新的技術を確立する。

歯科矯正治療は、歯の移動に要する時間が長期にわたり必要な歯科医療として知られる。その治療期間は、月間単位あるいは年間単位であり、長期の矯正治療用のワイヤやブラケットの歯への装着は、患者にとって口腔内の違和感と共に、齲蝕発生のリスクが高く、治療時間の短縮化が待ち望まれているところである。しかしながら、現在の歯科医療で

は、歯の移動の時間を短縮する具体的な方策は存在しない。今回我々が確立する「歯根膜由来 EPC を利用した血管新生促進による歯周組織のリモデリング回転速度増強技術」は、歯の移動時間の大幅な短縮を実現化する革新的技術開発であり、世界的にもこれまでに類似の例は無い。本研究により、新たな歯科矯正治療技術としての「歯の移動時間の短縮化」が可能となり、当該患者の QOL は各段に高まる。

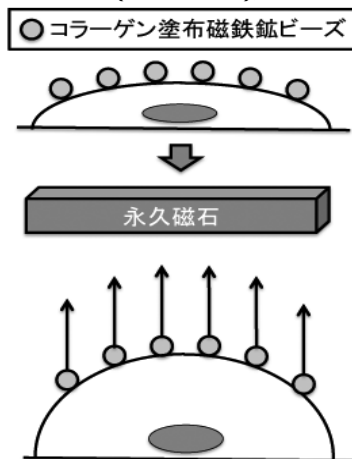
また、元来、歯根膜における血管形成性細胞を同定し、その血管形成メカニズムを遺伝子レベルで明らかにした例は他になく、今回の研究により、これまでに例のない「歯根膜由来 EPC を利用した新たな歯周組織再生医療の開発」にも繋がると大いに期待されることである。

3. 研究の方法

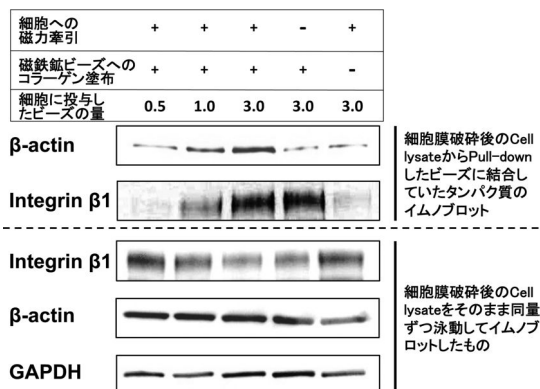
歯根膜由来 EPC への応力に応答する血管形成制御遺伝子の同定

(1) 歯根膜由来 EPC の牽引刺激に応答する血管形成制御遺伝子の同定：

歯根膜由来 EPC の牽引刺激を与える細胞培養系は、I 型コラーゲン塗布磁気マイクロビーズを用いた方法 (Chan *et al.*, *J Biol Chem*, 2010) を用いる (下図参照)。



研究代表者らは、既にこの方法を用いて予備実験を開始しているが、牽引刺激がコラーゲンから細胞接着分子インテグリンを介して、細胞骨格系に予測通り (ストレスファイバーの形成促進) に働くことを確認している (下図参照)。

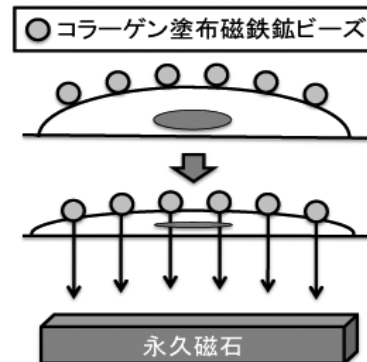


この実験系を用いて、歯根膜由来 EPC の牽引刺激時に血管構築細胞マーカーの発現と共に変化する血管形成制御遺伝子を DNA アレイやプライマーアレイを利用してピックアップする。

(1)- でピックアップした遺伝子が、EPC の血管形成能力制御遺伝子であるかどうかを上述の Chan らの牽引刺激下培養法を用いて評価する。モデル遺伝子の強発現ベクターや siRNA あるいは shRNA 発現ベクターを構築し、EPC に導入後、牽引刺激後に誘導される血管構成細胞 (EC や血管周皮細胞) の分化マーカーの発現にどのように影響するかを確認し、血管形成制御キー遺伝子を *in vitro* レベルで特定する。

(2) 歯根膜由来 EPC の圧迫刺激に応答する血管形成制御遺伝子の同定：

歯根膜由来 EPC の圧迫刺激を与える細胞培養系は、I 型コラーゲン塗布磁気マイクロビーズを用いた方法を応用して用いる。細胞への磁力のかかり方を (1) の牽引刺激の時とは反対方向から作用させ、細胞に圧迫刺激を与える。圧迫刺激が適切にこの細胞に作用しているかどうかの確認は、Wingate らの報告 (Wingate *et al.*, *Acta Biomater*, 2012) を、間葉系幹細胞に圧迫刺激を与えた際に EC および血管周皮細胞マーカーの発現が上昇することを参考にして評価する。この実験系を用いて、歯根膜由来 EPC の圧迫刺激時に血管構築細胞 (EC や血管周皮細胞) マーカーの発現と共に変化する血管形成制御モデル遺伝子を DNA アレイやプライマーアレイを利用してピックアップする (下図参照)。



(1)- と同様に、圧迫刺激作用時における血管形成制御キー遺伝子が血管構成細胞 (EC や血管周皮細胞) の分化マーカーの発現にどのように影響するかを確認し、*in vitro* レベルで特定する。

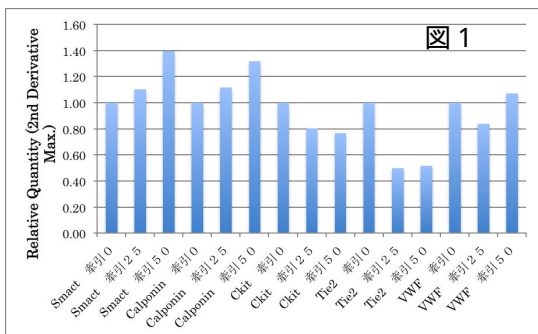
歯根膜由来 EPC への圧迫・牽引刺激に応答する血管形成制御因子の同定において、DNA アレイやプライマーアレイ等で遺伝子発現に顕著な差異が認められない場合には、応力に応答する細胞内シグナル伝達系の反応を解析する。具体的にはプロテオーム解析により細胞内タンパク質のリン酸化の変動について網羅的に調査する。プロテオーム解析によって顕著なリン酸化の差異が認められた

タンパク質を同定し、これが構成するシグナル伝達系をパスウェイ解析によって予測する。シグナル伝達系の活性化を Western blot 法により確認するとともに、最終的な転写因子の核移行については蛍光免疫染色で確認する。

4. 研究成果

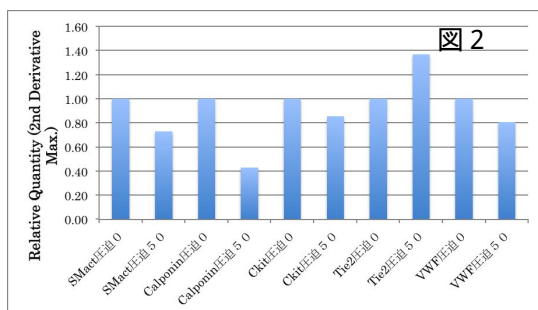
(1) 歯根膜由来 EPC への牽引応力による血管構成遺伝子の発現変化について

I 型コラーゲン塗布磁気ビーズを用いた牽引刺激による血管構成細胞マーカー遺伝子発現変化パターンの特徴について調査を進めた。その結果、たいへん興味深いことに牽引刺激による血管周皮細胞への分化マーカーである alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (図 1 レーン 1~3) や calponin (図 1 レーン 4~6) の発現の上昇 (図 1 レーン 2~3 ならびに 5~6) に伴い、EC への分化マーカーである Tie-2 (図 1 レーン 10~12) や vWF (図 1 レーン 13~15) の発現の低下 (図 1 レーン 11~12 ならびに 14) が観察され、歯根膜由来 EPC の各血管構成細胞への分化がメカニカルストレスにより制御されることが強く示唆された。加えて、造血幹細胞マーカーである c-kit (図 1 レーン 7~9) の発現も低下する (図 1 レーン 8~9) ことが判明した。



(2) 歯根膜由来 EPC への圧迫応力による血管構成遺伝子の発現変化について

圧迫刺激を加える系でも、図 1 と同様に血管構成細胞マーカー遺伝子の発現調査を試みたところ、牽引刺激とは異なり血管周皮細胞マーカー α -SMA (図 2 レーン 1~2) や calponin (図 2 レーン 3~4) の発現の低下 (レーン 2 ならびに 4) とともに、EC マーカー Tie-2 (図 2 レーン 7~8) の発現上昇 (レーン 8) が認められた。

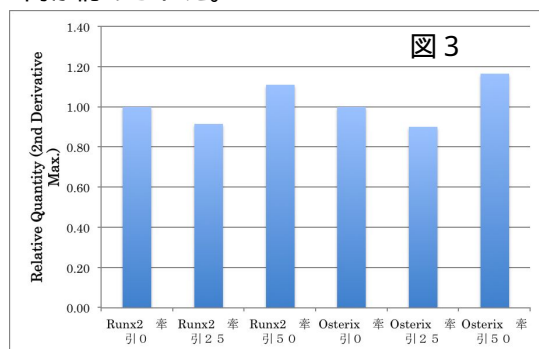


しかしながら、その他の EC マーカー vWF (図 2 レーン 9~10) や造血幹細胞マーカー c-kit (図 2 レーン 5~6) の発現はこの圧迫応力に反応して減少しており (図 2 レーン 10 ならびに 6) 本実験の目的であるメカニカルストレスに応じて発現する血管形成遺伝子の同定のためには必ずしも良好な結果と判断されない点も認められた。このため、ビーズに対する磁気応力の強度やビーズの数や大きさなどについて、今後、Chen らの方法 (Chan *et al.*, *J Biol Chem*, 2010) を一部変更する必要があることが判明した。

(3) 歯根膜由来 EPC への牽引あるいは圧迫応力によるその他の細胞分化マーカー遺伝子の発現変化について

本研究では、これまでに血管構成細胞 (EC や血管周皮細胞) あるいは造血幹細胞への分化マーカー遺伝子を中心に調査し、牽引刺激や圧迫刺激などのメカニカルストレスに応じて歯根膜中で血管形成あるいは造血に伴う局所循環に働く遺伝子同定のための実験系樹立を目標に研究を進めて来た。本来、これらの血管形成を含む局所循環を担う細胞分化マーカーの発現が上昇する際には、他の分化マーカーの発現は低下するはずであり、そのような条件設定が必要である。このため、歯根膜由来 EPC への牽引あるいは圧迫応力により骨芽細胞分化マーカーの発現がどのように変化するかどうかを調査した。

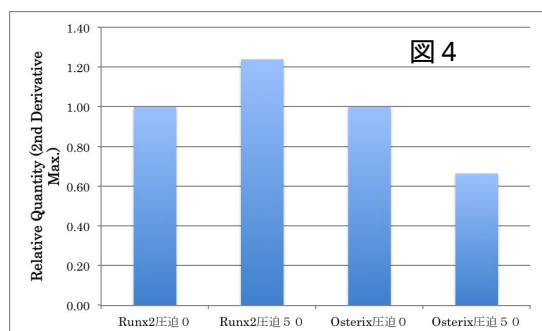
図 3 に示すように、骨芽細胞分化マーカー Runx2 (レーン 1~3) や Osterix (レーン 4~6) の発現は牽引応力が小さい時 (レーン 2 ならびに 5) には減少するが、応力が大きい時 (レーン 3 ならびに 6) には上昇する傾向が認められた。



また、図 4 に示すように圧迫応力の場合では骨芽細胞分化マーカー Runx2 (レーン 1~2) の発現は上昇する (レーン 2) が、Osterix (レーン 3~4) の発現は低下する (レーン 4) ことが判明した。

以上の結果より、今回設定した牽引応力や圧迫応力によるメカニカルストレスの強度により、骨芽細胞マーカーの発現が上昇あるいは低下することが明らかとなった (図 3、4 参照)。

このように、今後、血管構成細胞分化マーカーの上昇に伴い骨芽細胞分化マーカーが低下する応力設定条件をさらに整える必要はあるが、概ね歯根膜由来 EPC に牽引応力を



作用させると血管周非細胞マーカーの上昇が認められ(図1参照)、また、圧迫応力を作用させると EC 分化マーカーの発現が上昇する(図2参照)ことが明らかとなった。これらの結果を総合的に解釈すれば、血管構成細胞のうち、血管周皮細胞への分化を促進する遺伝子の同定は EPC 牽引モデルで探索し、ECへの分化を促進する遺伝子の同定はEPC圧迫モデルで探索すればよいが、その際に、骨芽細胞マーカー遺伝子発現を低下させる応力強度の設定が重要であるとの結論を得た。このように、未だ歯根膜中で血管構成細胞の分化を調節するキー遺伝子の同定には至っていないが、そのキー遺伝子同定のための応力作用条件は整いつつある。今後は、今回の研究成果を基盤として本研究を推進し、歯根膜由来 EPC を利用した血管新生促進技術の確立を目指したい。

また、本研究を通じて得られた新たな知見として、歯根膜由来 EPC への牽引応力あるいは圧迫応力刺激において、血管周皮細胞マーカー(α -SMA)と calponin の発現と EC マーカーTie-2 の発現が逆相関している点が興味深い。本知見については、現在論文作成中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

発表者: 樋野雅文、齋藤大嗣、客本斉子、帖佐直幸、衣斐美歩、吉田茉莉子、水城春美、石崎明、加茂政晴

発表標題: TGF- β 1 はヒト扁平上皮癌細胞株 HSC-4 細胞において MMP-10 を介した浸潤能を誘導する

学会名: 第 86 回日本生化学会大会

発表日: 平成 26 年 10 月 16 日

場所: 京都

発表者: 衣斐美歩、堀江沙和、帖佐直幸、吉田茉莉子、加茂政晴、客本斉子、大塚正人、佐原資謹、藤村 朗、石崎 明

発表標題: ファイブロサイトに注目した顎関節領域疾患発症機構の解明

学会名: 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会

発表日: 平成 26 年 9 月 26 日

場所: 福岡

発表者: 衣斐美歩、大久保直登、堀江沙和、帖佐直幸、吉田茉莉子、加茂政晴、客本斉子、大塚正人、佐原資謹、藤村 朗、石崎 明

発表標題: 顎関節炎症部位における血球系細胞の遊走と線維化メカニズムの解明

学会名: 未来医療開発プロジェクト(MIAST)シンポジウム

発表日: 平成 26 年 8 月 8 日

場所: 盛岡

発表者: 吉田茉莉子、大久保直登、石崎 明

発表標題: 歯根膜由来血管内皮前駆細胞の平滑筋細胞様超越分化における TGF- β の関与について

学会名: 岩手医科大学歯学会第 39 回総会

発表日: 平成 25 年 12 月 7 日

場所: 盛岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 茉莉子 (YOSHIDA Mariko)

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号: 80711217

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし