

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05048

研究課題名(和文) 振動付与装置の開発と効率的な歯の移動への応用に関する研究

研究課題名(英文) Development of the vibration device and application to effective tooth movement

研究代表者

山本 照子 (Yamamoto, Teruko)

東北大学・歯学研究科・名誉教授

研究者番号：00127250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ラットの歯の移動促進効果をもたらす最適な振動特性が明らかとなり、振動刺激は歯根吸収に影響を及ぼさないこと、振動刺激は実験的歯の移動中の破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞においてNF- κ Bの活性化を誘導すること、振動刺激は実験的破の移動時のPDL腔を増加すること、振動刺激は実験的歯の移動時に歯槽骨の吸収を促進することなどが明らかとなった。以上の結果は、歯の移動促進効果をもたらす振動刺激の作用メカニズムの解明および生体に安全で有効な不正咬合の治療につながるものである。

研究成果の概要(英文)：From the result of this study, we revealed the optimal conditions for effective and efficient supplemental vibration for accelerating tooth movement. Optimum-magnitude high-frequency vibration applied with static continuous force does not affect root resorption and induces NF- κ B activation in osteoclasts, osteoblasts and osteocytes and increases periodontal ligament volume via osteoclastic bone resorption and promotes bone resorption in deep alveolar bone during tooth movement. These findings contribute to a better understanding of the mechanism by which optimum-magnitude high-frequency vibration accelerates tooth movement, and may lead to novel approaches for the safe and effective treatment of malocclusion.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療は、口腔内にブラケットやワイヤーなどの装置を数年間にわたって装着するため、装置が目立つことや、口腔衛生環境の悪化に伴い、齲蝕や歯周病のリスクが高まる。さらに、治療の長期化などにより歯根吸収や歯の痛みなどの為害作用がもたらされると、肉体的、経済的のみならず、精神的にも患者の負担が増大し、QOLの低下を招くことになる。これらの問題点の多くは、矯正的な歯の移動速度を亢進させることにより、治療期間の短縮をはかることができれば、一挙に解決される。矯正的な歯の移動促進効果がある刺激としては、これまで、物理的な手段や薬理学的なコントロールの可能性が示唆されているが、研究レベルにとどまり、臨床応用にまで至っていない。現在の矯正治療では、矯正装置により歯に静荷重が負荷されて、歯の移動が行われているが、力学的な観点からは、静的な荷重のほかに、振動のような動荷重の応用も考えられる。動荷重の振動刺激については、関連の研究は殆ど進展しておらず、歯の移動に対してどのような振動刺激がどのような影響を及ぼすのかについては、解明されていない。このような背景のもと、現在の歯科矯正臨床の総合的な課題を解決するために、従来の静的な矯正力に加えて動荷重である振動刺激を併用し、歯の移動促進効果を安全に効率的に行えるように、メカニズムの解明を目指すとともに、そのエビデンスに基づいて条件付けをした振動付与機器を開発し、ヒトへの臨床応用を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、動荷重である振動刺激に着目し、これらの併用による歯の移動促進効果を安全に効率的に行うために、振動特性の最適化と有効な使用方法を検討するとともに、作

用メカニズムを細胞・分子レベルまで解析して、生体に安全で有効な歯の移動促進のための新規振動付与矯正装置を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1) ヒトに適用可能な小型の振動付与装置の試作、至適振動特性の検討と振動付与システムの確立

振動発生装置は偏芯振動モータを用いて、振動荷重、周波数、振幅などの異なる数種類の振動特性をもつ装置を試作する。次に、持続的静荷重を与える歯の移動装置に試作装置を併用し、振動特性、振動付与装置の作用時間、間隔などの振動付与方法を変化させた実験を行って、歯の移動促進効果と移動様相について検討し、至適振動付与条件を見いだす。25週齢 Wistar 系ラットを、対照群として歯の移動のみの群(TM group)と、振動付与装置を併用して歯の移動を行う実験群(TM+V group)の2群に分類する。直径 0.014 インチのニッケル-チタンワイヤーを上顎切歯に固定し、上顎右側第一臼歯を口蓋側へ移動させる。左側は非移動歯とし対照とする。振動力の付与については、振動装置を口蓋に設置し、結紮線にて移動歯に固定した状態で一定時間の振動刺激を1週間間隔で付与する。なお、1週間はラットの骨リモデリングサイクルの1回転にかかる期間である。歯の移動量の評価には移動期間中、0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 21 日目に上顎歯列の精密印象を採得後、超硬石膏により模型を作製し、歯の移動距離を計測する。

次に、移動歯の周囲の歯周組織の組織学的解析により、矯正的な歯の移動時に振動刺激を付与した際の歯周組織における歯根膜細胞、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞など各種細胞の代謝活性を最も効率よく賦活化させる条件を

見だし、有効性・安全性の高い振動特性を確定する。また、歯根吸収などの為害作用についても検討する。実験終了時に 4% パラホルムアルデヒド液にて灌流固定を行い、実験歯を含む上顎骨を摘出して 10%EDTA にて脱灰後、通法によりパラフィン包埋して厚さ $7\mu\text{m}$ の連続切片標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行う。上顎第一臼歯近心口蓋根の観察を行い、根分岐部から根尖部付近まで $70\mu\text{m}$ 間隔で採取した 9 切片について、骨形態計測学的に定量評価する。

2) 至適振動特性を持つ振動付与装置の開発、至適振動付与方法を用いた有効性・安全性の確立と作用メカニズムの解析

歯の移動が促進される至適振動特性と振動付与方法を適用して、ラットに矯正歯の移動装置と至適条件の振動付与装置を併用して、28 日まで歯の移動量の経時変化と組織変化を定量的に解析する。実験グループは 4 群とする。1) 対照群 (C 群): 振動刺激も歯の移動も行わない。2) 振動刺激群 (V 群): 振動刺激のみ。3) 歯の移動群 (TM 群): 歯の移動のみ。4) 歯の移動および振動刺激群 (TM+V 群): 歯の移動に振動刺激を加える。移動歯周囲の歯周組織を、HE、アルカリフォスファターゼ、TRAP 染色にて骨芽細胞、破骨細胞を同定し、オステオポンチン、RANKL, RANK, OPG, CTGF などの骨リモデリングに関与する蛋白質を免疫組織化学的に染色し、また、産生細胞の同定に *in situ hybridization* を行う。骨形態計測学的に定量的に解析し、歯根膜細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞に対する影響を検討し、骨リモデリング、骨吸収、骨形成に関与する種々の蛋白質の発現、遺伝子発現を定量評価する。さらに、骨細胞の Apoptosis に着目する。また、静荷重と振動刺激によるメカニカルストレスに反応する NF κ B などの転写因子を *in*

vivo にて見だし、生体中で働く転写因子を確定する。歯の移動促進に対する振動刺激作用のメカニズムを解析する。

次に、振動刺激が歯根吸収に及ぼす影響を評価するため、実験期間終了後、ラットをエーテル麻酔下で断頭屠殺し、上顎右側第一臼歯を摘出し、hypochlorite に 10 分間浸し歯根に付着した歯根膜を除去し、歯科用ダイヤモンドディスクを用いて近心頬側根、遠心頬側根を除去し、近心根、近心口蓋根、遠心口蓋根の 3 根を一塊として口蓋側方向から観察を行なう。SEM を用いて、近心根、近心口蓋根、遠心口蓋根の 3 根を一塊として口蓋側方向から撮影する。得られた画像からソフト (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて近心根、近心口蓋根、遠心口蓋根の 3 根の歯根面積、歯根吸収窩面積を計測し、3 根それぞれの歯根吸収率を算出する。

3) *in vitro* における静荷重と振動刺激の作用メカニズムの解析

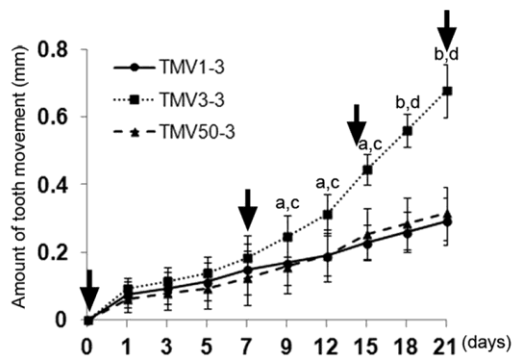
歯根膜細胞、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞の初代培養系ならびに MLO-Y4 のような細胞株の培養系を用いて、振動刺激の作用を検討する。特に、骨リモデリングにおいて、細胞性ネットワークで骨芽細胞、破骨細胞とも細胞間コミュニケーションを行っている骨細胞に着目して、骨細胞を重点的に振動効果のメカニズム解明に向けて実験を進める。歯を移動する矯正力の *in vitro* のモデルとして、マルチウェルストレッチチャンバーを用いて、細胞に伸展力あるいは圧縮力をかける。振動刺激は、*in vivo* と同じ振動特性の振動付与装置を用いて、まず、網羅的なマイクロアレイによって遺伝子プロファイルを解析し、伸展、圧縮、振動刺激によって発現する遺伝子のうち、発現促進される転写因子に着目して

実験を進め、メカニカルストレスの作用様式の違いによる応答機序の解明を目指す。リアルタイムPCR、Western blotting を行い、メカニカルストレスのシグナル伝達機序を解析する。

4. 研究成果

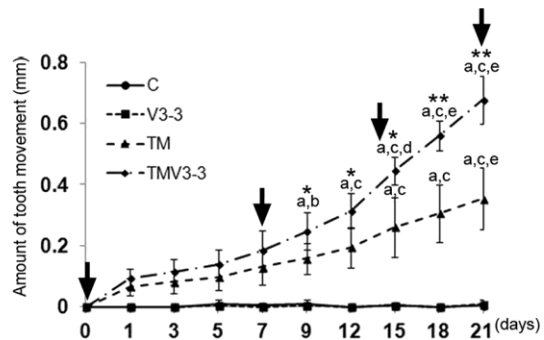
1) 歯の移動促進効果をもたらす最適な振動刺激について

振動荷重の大きさが歯の移動促進効果に及ぼす影響について検討するため、振動荷重1 gf-58 Hz (TMV1-3)、3 gf-70 Hz (TMV3-3)および50 gf-268 Hz (TMV50-3)の振動刺激を3分間、1週間おきに付与し、実験的歯の移動を21日間行ったところ、TMV3-3群はTMV1-3群およびTMV50-3群と比較して、約2倍の移動量を示した(図1)。



(図1) 振動荷重の大きさが歯の移動促進効果に及ぼす影響 (Takano-Yamamoto T et al. Sci Rep. 2017)

次に、振動付与時間が歯の移動促進効果に及ぼす影響について検討したところ、振動付与時間は歯の移動促進効果に影響しないことが示唆された。以上の結果から、ラット生体への為害作用や負担が最小限となり、矯正歯の移動促進効果をもたらす最適な振動刺激の条件として、3 gf-70 Hzの振動刺激を3分間、歯の移動開始時より1週間おきに付与することとした。この条件で、実験的歯の移動を21日間行ったところ、TMV3-3群はTM群と比較して、約2倍の移動量を示した(図2)。



(図2) 矯正歯の移動促進効果

(Takano-Yamamoto T et al. Sci Rep. 2017)

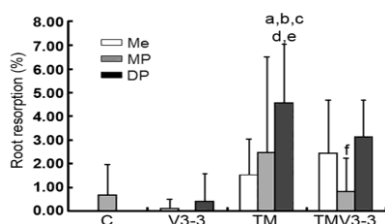
2) 振動刺激は実験的歯の移動中の破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞においてNF-κBの活性化を誘導する

実験的歯の移動中のNF-κBシグナルに対する振動刺激の効果を検討するために、歯槽骨の破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞におけるNF-κBの活性化を免疫組織化学的に検索した。歯槽骨におけるNF-κB p65は、NiTiワイヤーによる持続的歯の移動開始後7日目に3分間の振動刺激を負荷後48時間で、V3-3群で増加し、さらにTM群で増加し、TMV3-3群で最も多く発現していた。C群ではROI内の細胞の約5%がNF-κB陽性であった。V3-3群ではC群に比較してNF-κB陽性細胞が有意に増加し、TM群ではV3-3群に比較してNF-κB陽性細胞が有意に増加した。さらに、NF-κB陽性細胞はTMV3-3群で最も多く発現していた。次に、これらの細胞におけるNF-κBの活性化を調べた。核内にNF-κB p65を有している細胞を活性化NF-κB陽性細胞とし、連続切片を用いてTRAPおよびHE染色を行い破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞を同定した。C群、V3-3群では、わずかに活性化NF-κB陽性細胞が認められた。TM群では、C群に比べ有意にNF-κB陽性細胞が増加し、TMV3-3群ではさらに増加していた。しかしながら、活性化NF-κB陽性破骨細胞を総破骨細胞数で標準化すると全ての群間における有意差はみられなくなった。骨芽細胞においてもC群でわずかにNF-κB陽性の活性化を示してい

た。破骨細胞におけるNF- κ Bの活性化と同様に、骨芽細胞もV3-3群でNF- κ Bの活性化の増加傾向を示し、TM群では有意にNF- κ Bの活性化が増加した。活性化NF- κ B陽性骨芽細胞が最も多く存在していたのはTMV3-3群であった。活性化NF- κ B陽性骨芽細胞を総骨芽細胞数で標準化しても、bone volumeで標準化した場合と同様の結果が得られた。骨細胞におけるNF- κ Bの活性化もTMV3-3群で最も多く認められた。TM群でも活性化NF- κ B骨細胞数の増加傾向が認められたが、C群、V3-3群と比較して有意差は認められなかった。総骨細胞数で標準化した活性化NF- κ B骨細胞数においてもTM群はC群、V3-3群と比較して有意に増加していた。C群とV3-3群間における活性化NF- κ B骨細胞数はbone volume、総骨細胞数のいずれかで標準化しても有意差は認めなかった。

3) 振動刺激は歯根吸収に影響を及ぼさない

近心根、近心口蓋根および遠心口蓋根の歯根吸収率は、C群とV3-3群の間に有意な差はみられず、1%に満たなかった。TM群では、近心根、近心口蓋根および遠心口蓋根全てで歯根吸収率はC群と比較して増加し、特に遠心口蓋根の歯根吸収率はC群およびV3-3群のいずれの歯根よりも有意に大きい値を示した。TMV3-3群においても、近心根および遠心口蓋根で歯根吸収率は増加傾向を示したが、C群およびV3-3群のいずれに対しても有意な差は認められなかった。さらに、TMV3-3群の近心口蓋根の歯根吸収率は、TM群の遠心口蓋根よりも有意に小さかった。(図3)



(図3) 近心根 (Me)、近心口蓋根 (MP)、遠心口蓋根 (DP) の歯根吸収率 (Takano-Yamamoto T et al. Sci Rep. 2017)

4) 振動刺激は歯の移動時の PDL 腔を増加する

歯根周囲の骨吸収における振動刺激の影響を検討するために、 μ CT を用いて上顎第 1 臼歯周囲の PDL 腔を評価した。歯の移動開始後 7 日時、TM 群と TMV3-3 群の PDL 腔は C 群と比較して有意に増加していたが、TM 群と TMV3-3 群間では有意差は認めなかった。実験的歯の移動開始後 9 日、すなわち持続的歯の移動開始後 7 日目に 3 分間の振動刺激を負荷後 48 時間の振動刺激の歯の移動促進効果と一致して、TMV3-3 群の PDL 腔は TM 群より有意に増加していた。実験的歯の移動開始後 21 日では、TM 群と TMV3-3 群間の PDL 腔の有意差は消失したが、C 群よりは有意に大きかった。

5) 振動刺激は実験的歯の移動時に歯槽骨の吸収を促進する

次に、実験的歯の移動時の骨吸収における振動刺激の効果を検討するために組織学的に解析した。実験的歯の移動開始後 7 日時、TM 群の PDL は圧迫側で圧縮され、牽引側で伸展されたが、C 群、V3-3 群では PDL の幅はほぼ一定であった。TM 群と比べて、TMV3-3 群の PDL の幅は実験的歯の移動開始後 7 日に振動刺激を 3 分間付与した 48 時間後、PDL の圧迫側に不整な歯槽骨表面の形成を伴い増加した。また、TMV3-3 群は組織形態学的解析により他の 3 群と比較して bone volume の有意な減少を示した。この TMV3-3 群における bone volume の減少は marrow volume の増加を伴っていたが、歯槽骨深部における marrow number には差を認めなかった。

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 8 件)

1) Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Fatemeh G, Fukunaga T, Seiryu M, Daimaruya T, Takeshita N, Kamioka H, Adachi T, Ida H, Mayama A. Synergistic acceleration of experimental tooth movement by supplementary high-frequency vibration

applied with a static force in rats. *Sci Rep*. 2017. Oct 25;7(1).13969. 査読有. DOI: 10.1038/s41598-017-13541-7.

2) Takeshita N, Hasegawa M, Sasaki K, Seki D, Seiryu M, Miyashita S, Takano I, Oyanagi T, Miyajima Y, Takano-Yamamoto T. 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. 査読有. DOI: 10.1007/s00774-016-0737-z.

3) Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano Yamamoto T. Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 5;489(4):472-476. 査読有. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.174.

4) Takano-Yamamoto T, Fukunaga T, Takeshita N. Gene Expression Analysis of CCN Protein in Bone Under Mechanical Stress. *Methods Mol Biol*. 2017. 1489:283-308. 査読有. DOI: 10.1007/978-1-4939-6430-7_26

5) Deguchi T, Adachi R, Kamioka H, Kim DG, Fields H W, Takano-Yamamoto T, Ichikawa H, Yamashiro T. Effect of minocycline on induced glial activation by experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016. 149(6):881-888. 査読有. DOI: 10.1016/j.ajodo.2015.11.030.

6) Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C. Scleraxis and Osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. *Development*. 2015. 142:787-796. 査読有. DOI: 10.1242/dev.116228.

7) Deguchi T, Seiryu M, Daimaruya T, Garetto LP, Takano-Yamamoto T, Roberts WE. Decreased alveolar bone turnover is related to the occurrence of root resorption during experimental tooth movement in dogs. *Angle Orthod*. 2015. 85(3):386-393. 査読有. DOI: 10.2319/021714-117.1.

8) Seki D, Takeshita N, Oyanagi T, Sasaki S, Takano I, Hasegawa M, Takano-Yamamoto T. Differentiation of odontoblast-like cells from mouse induced pluripotent stem cells by Pax9 and Bmp4 transfection. *Stem Cells Transl Med*. 2015. 4(9):993-997. 査読有. DOI: 10.5966/sctm.2014-0292.

[学会発表] (計 8 件)

1) Takano-Yamamoto T. Tooth movement and mechanical stress-Role of osteocytes and osteoimmune factors. The 20th Annual Meeting of Taiwan Orthodontic Society, (招待講演)(国際学会)2017.

2) 青沼 智、福永智広、北浦英樹、竹下信郎、山城隆、山本照子. RUNK2+/-マウスの矯正歯の移動の牽引側における骨芽細胞の増殖および分化気候にRunx2/mTORC2シグナルが関与する第35回日本骨代謝学会学術集会. 2017.

3) 川津正慶、竹下信郎、吉田倫子、木村晴地、清流正弘、滝本品、宿南知佐、山本照子 牽引力負荷された歯根膜の初期反応における scleraxis の発現機序と機能の解析 第76回日本矯正歯科学会 2017.

4) 山本照子、竹下信郎、福永智宏、佐々木紀代、吉澤光弘、坂本麻由里. -メカニカルストレスとCCNファミリータンパク質-歯の移動における骨細胞の働きとCCN2/CTGFの役割. 第9回日本CCNファミリー研究会(招待講演)2017.

5) 関 大輔、竹下信郎、大柳俊仁、佐々木周太郎、高野郁子、長谷川正和、山本 照子. 遺伝子導入を応用したiPS細胞由来象牙芽細胞様細胞の新規分化誘導法の開発. 第74回日本矯正歯科学会大会. 2015年11月18日~2015年11月20日. 福岡

6) 高野 郁子、竹下信郎、関大輔、大柳俊仁、佐々木紀代、山本照子. 軟骨細胞様細胞株 ATDC5 における Odz3 の機能解析. 第74回日本矯正歯科学会大会. 2015年11月18日~2015年11月20日. 福岡

7) 大柳俊仁、千田透子、竹下信郎、関大輔、高野郁子、吉田倫子、清流正弘、山本照子. IGF-1 を添加した再生歯胚におけるサイズ増大のメカニズムの解析. 第74回日本矯正歯科学会大会. 2015年11月18日~2015年11月20日. 福岡

8) Takano-Yamamoto T. Clinical and Translational Dental Research focused on Orthodontic Tooth Movement. 2015 Goldhaber Award Memory Lecture (招待講演) (国際学会). 2015年10月26日~2015年10月28日. Boston, MA, U. S. A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 照子 (TERUKO YAMAMOTO)
東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授
研究者番号:00127250

(2) 研究分担者

福永 智広 (TOMOHIRO FUKUNAGA)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号:70362994
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
清流 正弘 (MASAHIRO SEIRYU)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号:80510023
佐々木 紀代 (KIYO SASAKI)
東北大学・大学病院・医員
研究者番号:70746958