

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09837

研究課題名(和文) 神経ペプチド・オキシトシンが破骨細胞および矯正学的歯の移動に与える影響の解明

研究課題名(英文) Effect of neuropeptide oxytocin on osteoclast and orthodontic tooth movement

研究代表者

小原 悠 (Kohara, Haruka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：70623825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの破骨細胞前駆細胞にオキシトシンを加えて破骨細胞形成への影響を検討した。破骨細胞出現数はオキシトシン添加培養細胞にて有意に増加することはなかった。続いてマウスの上顎第一臼歯に矯正力をかけオキシトシンを投与したが影響は認められなかった。さらに、矯正力を加えた際の破骨細胞の破骨細胞分化マーカーのmRNAを定量した。その結果、オキシトシン投与によって有意差を認めるマーカーはなかった。これらのことからオキシトシンが破骨細胞分化と矯正力による破骨細胞分化に影響しない可能性が示唆された。しかしながら歯周病や骨粗しょう症などの病理学的環境下では影響を及ぼす可能性があると考えてさらに研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オキシトシンは下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンであり、これまでに骨量の維持に寄与し破骨細胞分化形成に影響することなどが報告された。しかし、オキシトシンが矯正力による歯の移動に与える影響についてはわかっていなかった。本研究結果において、オキシトシンは破骨細胞分化形成に直接的に与える影響は認められなかった。また矯正力による歯の移動にも影響を認めなかった。これらのことからオキシトシンは直接的に矯正治療に及ぼす影響はないものと思われる。オキシトシンは精神性ストレスと関連するといわれるホルモンであるので、ストレス因子の一つが矯正治療に影響しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effect of oxytocin on osteoclastogenesis was examined by adding oxytocin to mouse osteoclast progenitor cells. The number of osteoclasts was not increased significantly by oxytocin. Oxytocin was then applied to the mice whose maxillary first molar was applied with an orthodontic force, but no effect was observed. In addition, mRNA for osteoclast differentiation markers was quantified in osteoclasts when orthodontic force was applied. The results showed that no marker was significantly different by oxytocin administration. These results suggest that oxytocin may not affect osteoclast differentiation induced by orthodontic force. However, we believe that it may have an effect in pathological settings such as periodontal disease and osteoporosis, and we plan to further study osteoclastogenesis under such conditions.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：下垂体ペプチドホルモン オキシトシン 矯正歯科治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正治療は骨リモデリングを利用した治療法であることから、骨の代謝に関連する因子についての研究が重要である。オキシトシンは下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンであり、これまでに骨量の維持に寄与し破骨細胞分化形成に影響することなどが報告された。しかし、オキシトシンが矯正力による歯の移動に与える影響についてはわかっていない。そこでその関係を調べて下垂体ペプチドホルモンが矯正力による歯の移動へ与える影響を調べることは重要である。本研究は、オキシトシンが破骨細胞分化形成に与える影響およびメカニズムの解明を目指す基礎的研究であるとともに、矯正治療の新たな治療戦略の構築に寄与することが期待される。

2. 研究の目的

下垂体ペプチドホルモンであるオキシトシンが矯正力による歯の移動への影響について調べることである。

3. 研究の方法

(1) C57BL6/J, 8週齢雄マウス骨髄由来の初代破骨細胞は以下のように培養した。骨髄を脛骨と大腿骨から流し、赤血球溶解バッファー(150mM 塩化アンモニウム、10mM 炭酸水素カリウム、0.1mM エチレンジアミン四酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) pH7.4)で処理し、100mm ディッシュで37℃、M-CSF、5%FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含む MEM で一夜培養した。翌日、浮遊細胞を回収し、マルチウェル組織培養プレートに10万細胞/cm²の密度で再プレートした。残った非接着細胞は、播種から48時間後に廃棄した。その後、付着した骨髄マクロファージを20ng/mL RANKLで4日間刺激し、成熟破骨細胞を生成させた。細胞増殖培地は2日おきに交換した。6日目に、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP)染色を行い、破骨細胞の同定を行った。染色液はNaftol AS-MX phosphate(Sigma, St Louis, Mo)、N,N-ジメチルホルムアミド、0.2M 酢酸バッファーおよび酒石酸ナトリウム二水和物に蒸留水を加えて攪拌し、濾過したものを使用した。核はヘマトキシリンで染色した。

(2) 実験動物として、11週齢の雄のC57BK/6Jマウス(SLC静岡、日本、体重:26.1±0.8g)を使用した。マウスはコロニールーム内のプラスチックケージに収容し、標準的なペレット食と水を自由に摂取させた。すべての処置は、0.75-mg/kg メデトミジン(ドミツール、ゼノアック、福島、日本)、4-mg/kg ミダゾラム(サンド、東京、日本)および5-mg/kg 酒石酸ブトルファンール(明治製菓、東京、日本)を腹腔内投与して全身麻酔下で実施された。マウスの上顎第一臼歯-切歯間にコイルスプリングを装着して、矯正力による歯の移動実験モデルを使用した。オキシトシンを腹腔内投与し、上顎第一臼歯に矯正力をかけた。3, 7, 14日にマイクロCT(リガクル_mCT, 60 kV, 100 mA, 2 min, 解像度20 μm)を撮影し、i-view(モリタ製作所)で撮像し、歯の移動量を計測した。

(3) オキシトシン(Anygen Co., Ltd.和光純薬)10 nMを200 μlの生理食塩水に溶解し、ツベルクリン用注射器(1ml テルモシリッジ、26G)で腹腔内投与し、その後7日間上顎第一臼歯に矯正力をかけた。歯の移動後、上顎第一臼歯部周辺組織より採取した組織を液体窒素で凍結し、ステンレス乳鉢で粉碎後、全RNAを精製しqRT-PCRを行い破骨細胞分化因子のmRNAを定量した。調べた因子はTRAP、NFATc1(Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)およびDC-STAMP(Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein)である。プライマーはTRAPの順鎖が5'-CACTCCCACCCTGAGATTTGT-3、逆鎖が5'-CATCGTCTGCACGGTCTCG-3を用いて、NFATc1は順鎖に5'-GGGTCAGTGTGACCGAAGAT-3、逆鎖に5'-GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA-3、DC-STAMPには順鎖に5'-TCCTCCATGAACAAACAGTTCCAA-3、逆鎖に5'-AGACGTGGTTTAGGAATGCAGCTC-3、コントロールのハウスキーピング遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)の順鎖に5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3、逆鎖に5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3を用いた。GAPDHをもとに各値を標準化した。

4. 研究成果

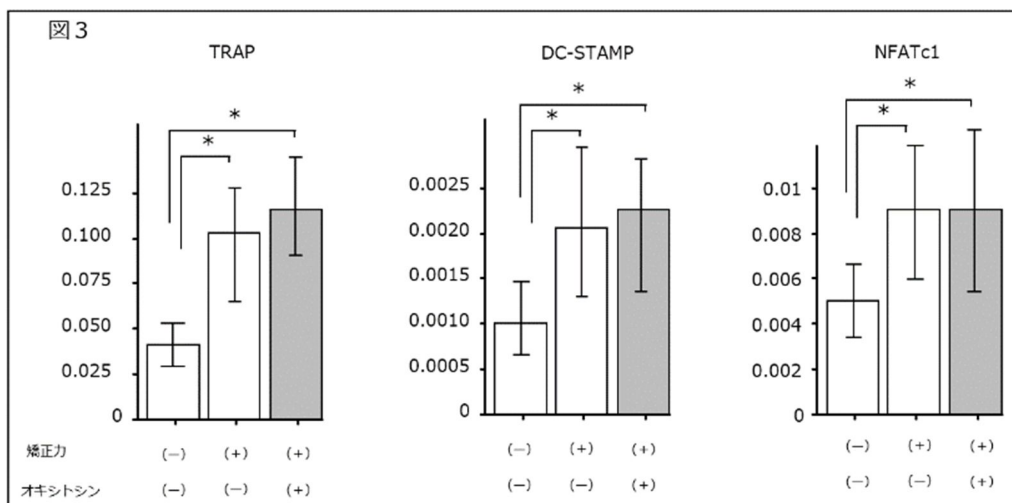
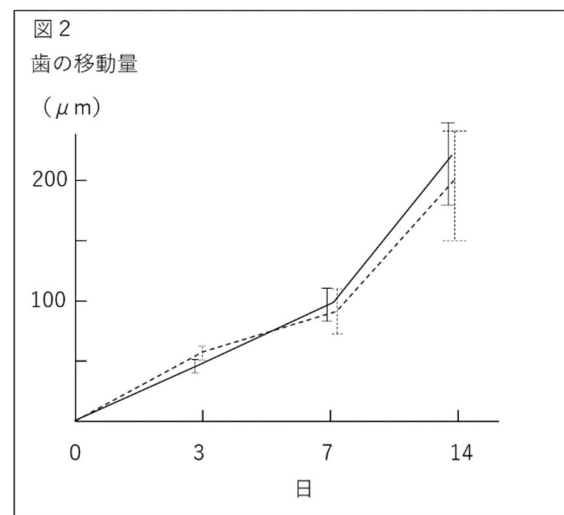
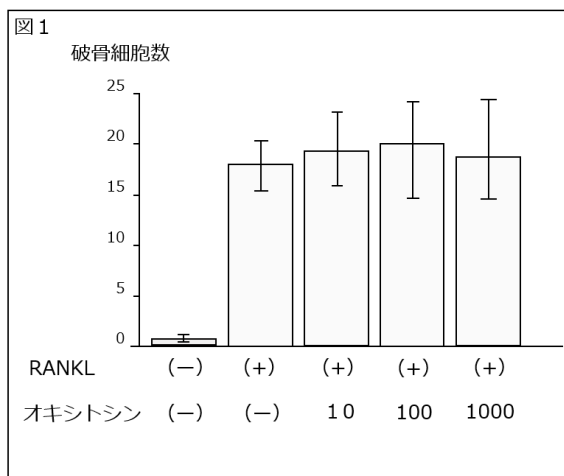
(1) 培養細胞実験において破骨細胞形成に対するオキシトシンの直接作用の解析を行った。骨髄マクロファージを20ng/mL RANKLで4日間刺激し、成熟破骨細胞を誘導した。細胞増殖培地は2日おきに交換し、6日目に、TRAP染色を行い、破骨細胞の同定を行った。この培養液中に1 μM, 10 μM, および100 μMのオキシトシンを添加し影響をみた。その結果、RANKL刺激によりTRAP陽性多角細胞(破骨細胞)は17.5±3.5個/視野みられた。それに対しオキシトシン添加培養細胞における破骨細胞数は、1 μMにおいて18.3±4.6個/視野、10 μMにおいて19.2±5.5個/視野、および100 μMにおいて17.5±3.5個/視野であった。オキシトシン非添加の

コントロールに比較して、オキシトシンを添加したときの破骨細胞数は有意に増加することはなかった(図1)

(2) オキシトシンが矯正力による歯の移動に与える影響を解析した。マウスの上顎第一臼歯 - 切歯間に 10 cN の Ni-Ti 超弾性クローズドコイルスプリングを装着して、矯正力による歯の移動実験モデルとした。200 μ l の生理食塩水に溶解したオキシトシン 10、100、1000 μ M/kg を腹腔内に毎日投与した。3、7、14 日にマイクロ CT を撮影し歯の移動量を計測した。その結果、3 日においてコントロールで $54 \pm 5.8 \mu\text{m}$ であり、実験群において $45 \pm 5.9 \mu\text{m}$ であった。7 日においてコントロールで $84 \pm 14.5 \mu\text{m}$ であり、実験群において $95 \pm 9.3 \mu\text{m}$ であった。12 日においてコントロールで $184 \pm 58 \mu\text{m}$ であり、実験群において $195 \pm 79 \mu\text{m}$ であった。両群ともに経時的な歯の移動量の増加が認められたが、両群の間に有意差を認めなかった(図2、点線：コントロール群、実線：実験群)

(3) さらに、オキシトシンが矯正力を与えた歯周組織で発現する因子を調べた。オキシトシン 1000 μ M/kg (1007 mg/kg) を毎日腹腔内投与し、7 日間上顎第一臼歯に 10g の矯正力をかけた。歯の移動後、上顎第一臼歯部周辺組織より採取した組織を凍結・粉碎後、total RNA を精製し qRT-PCR を行い mRNA を定量した。破骨細胞の分化因子である NFATc1、TRAP、および DC-STAMP をプライマーとして用いた。その結果、オキシトシン投与群において矯正力を負荷することにより各因子は有意な増加傾向を認めた。矯正力非負荷群に比較して、TRAP においてオキシトシン非添加群(対照群)で 2.3 ± 0.4 倍の増加を認め、オキシトシン添加群(実験群)において 2.6 ± 0.5 倍の増加を認めたが、両群の間に有意差を認めなかった。DC-STAMP については、オキシトシン非添加群で 2.0 ± 0.6 倍の増加を認め、オキシトシン添加群において 2.2 ± 0.5 倍の増加を認めたが、両群の間に有意差を認めなかった。さらに NFATc1 においては、オキシトシン非添加群で 2.3 ± 0.4 倍の増加を認め、オキシトシン添加群において 2.6 ± 0.5 倍の増加を認めたが、両群の間に有意差を認めなかった(図3)

本研究で用いた方法は、骨髄細胞を M-CSF と RANKL で破骨細胞を誘導するという一般的な方法である。また、マウスの矯正治療モデルについても一般的な方法である。両方とも比較的生理的な条件下での実験モデルといえる。そこにオキシトシンを投与しても影響を及ぼすことがなかったのは、生理的な条件下であったことが要因かもしれない。病理学的な条件下である炎症や骨粗しょう症などの条件下では影響を及ぼす可能性があると考えて、さらに研究を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Moriuchi E, Hamanaka R, Koga Y, Fujishita A, Yoshimi T, Yasuda G, Kohara H, Yoshida N	4. 巻 18
2. 論文標題 Development and evaluation of a jaw-tracking system for mice: reconstruction of three-dimensional movement trajectories on an arbitrary point on the mandible	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Engineering Online	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12938-019-0672-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yuika Ueda, Hitoshi Hotokezaka, Toshihiro Miyazaki, Takeshi Moriishi, Keira Arizono, Noriaki Yoshida
2. 発表標題 Effect of lithium on orthodontically induced root resorption and the surrounding tissue in the rats
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kie Nishioka, Hitoshi Hotokezaka, Yuka Hotokezaka, Shinsuke Ohba, Noriaki Yoshida
2. 発表標題 Effect of helioxanthin analog TH4 on morphology of mandibular condyle
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Nakamura, Hitoshi Hotokezaka, Yuka Hotokezaka, Yuika Ueda, Kie Nishioka, Noriaki Yoshida
2. 発表標題 The influence of narrowing of the periodontal space thickness on orthodontically induced root resorption
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keira Arizono Shimada, Hitoshi Hotokezaka, Yukiko Morita, Yuika Ueda, Kie Nishioka, Stavros Kiliaridis, Noriaki Yoshida
2. 発表標題 The Effect of Masseter Muscle Hypofunction by Botulinum neurotoxin type A on Orthodontic Tooth Movement in Rats
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田豪, 山田佳奈, 森内絵美, 吉見知子, 藤下あゆみ, 濱中僚, 小原悠, 古賀義之, 吉田教明
2. 発表標題 モーションキャプチャーを用いた6自由度顎運動と筋電図の同期計測による顎口腔機能解析
3. 学会等名 日本顎口腔機能学会第62回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有園ケイラ, 佛坂育祉, 森田幸子, 吉見知子, 上田悠依華, 吉見圭子, 吉田教明
2. 発表標題 咬合力低下が歯の移動量に与える影響 - ラット実験モデル -
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佛坂育祉, 有園ケイラ, 佛坂由可, 小原悠
2. 発表標題 矯正力負荷時における歯根周囲骨代謝への塩化リチウムの影響
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤下あゆみ、山田佳奈、安田豪、森内絵美、吉見知子、小原悠、濱中僚、古賀義之、吉田教明
2. 発表標題 6自由度顎運動システムを用いた異なる性状の食品咀嚼時のマウス顎運動解析
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会第7回日韓ジョイントミーティング
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佛坂 斉社 (Hotokezaka Hitoshi) (90199513)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	北浦 英樹 (Kitaura Hideki) (60295087)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	吉松 昌子 (Yoshimatsu Masako) (20420630)	長崎大学・病院(歯学系)・助教 (17301)	
研究分担者	藤村 裕治 (Fujimura Yuji) (70448504)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------