

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19304

研究課題名(和文) 矯正学的歯の移動時に歯根膜で発現するMMP12による血管新生の制御

研究課題名(英文) Regulation of angiogenesis by MMP12 expressed in periodontal ligament during orthodontic tooth movement

研究代表者

成宮 毅 (Narimiya, Tsuyoshi)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00803074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で歯の移動時に出現する牽引側歯根膜線維芽細胞は、伸展刺激負荷時にマトリックスメタロプロテアーゼ12(MMP12)を発現し血管の基底膜の主成分であるコラーゲンタイプIVを分解することで血管新生に関与することを明らかにした。しかし、伸展刺激負荷時に伸展刺激負荷時に発現するMMP12の制御機構は不明な点が多い。今回の研究では、伸展刺激負荷時に歯根膜線維芽細胞が発現するMMP12はERKシグナル経路でERK2ではなくERK1が関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

矯正歯科治療における歯の移動では、移動方向の歯根膜が圧迫され、反対側の歯根膜は牽引される。これまでの研究では、歯の移動時の牽引側歯根膜では歯根膜繊維の再構成、骨添加などの組織リモデリングが起こることが想定されるが、報告は少なく不明な点が多い。組織リモデリングには栄養供給源として新たな血管すなわち血管新生を必要とするが牽引側歯根膜における血管新生の報告は限定的であり、明らかになっていない。牽引側歯根膜の血管新生メカニズムの解明は、血管制御を通して、組織リモデリングの制御を可能とする。医療分野において、組織リモデリング制御が可能になれば、体の部位に限らず損傷治癒治療の治療期間の短縮をもたらす。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the orthodontic tensile strain upregulates MMP12 expression in periodontal ligament cells and induces angiogenesis via degradation of Col-IV in the vascular endothelial basement membrane. However, it remains unknown the molecular regulatory mechanism of MMP12 worked in periodontal ligament cells by tensile strain. This study has clarified that human periodontal ligament cells upregulate MMP12 expression via ERK1, cell signaling molecule, by tensile strain.

研究分野：血管

キーワード：MMP12 血管 歯根膜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療は、歯に力を加えることで歯を移動させ不正咬合から正常咬合を構築する治療である。目的の歯の歯冠部に近遠心方向へ矯正力を負荷すると、歯根の根尖 1/3 を支点として歯が傾斜移動する。また歯根の適切な位置に力を負荷すると、歯が平行に移動する歯体移動が起こる。傾斜移動では、移動側の歯冠側歯根膜および反対側根尖歯根膜に圧迫側、反対側の歯冠側歯根膜および根尖移動側に牽引側が生じる。歯体移動では、移動側の歯根膜に圧迫側、反対側の歯根膜には牽引側が出現する。圧迫側歯根膜では、血管の破壊や破骨細胞による骨吸収などの組織リモデリングが多数報告されている。一方の牽引側歯根膜では、歯根膜繊維の再配列や骨添加などの組織リモデリングが起こることが報告されているが、圧迫側と比較して報告数はすくなく不明な点が多いのが現状である。

牽引側歯根膜で起こる歯根膜繊維の再配列や骨添加などの組織リモデリングには、新たな栄養供給源として血管が必要となり血管新生が起こると考えられる。これまでの研究で我々は牽引側歯根膜の網羅的遺伝子解析によりマトリックスメタロプロテアーゼ 12(MMP12)が高発現することを発見した。また、伸展負荷刺激により歯根膜線維芽細胞が MMP12 を発現し、血管新生に必要な血管の基底膜の主成分である IV 型コラーゲンを分解することで、牽引側歯根膜での血管新生に関与することを明らかにしている。しかし、伸展刺激負荷時の歯根膜線維芽細胞が発現する MMP12 の詳細な発現メカニズムは不明である。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で、歯科矯正治療における歯の移動時に出現する牽引側歯根膜の歯根膜線維芽細胞は、伸展刺激負荷時に MMP12 を発現し、血管新生に必要な血管の基底膜の主成分である IV 型コラーゲンを分解することで血管新生に関与することが明らかにした。しかし、歯科矯正治療時に矯正力を負荷した歯に出現する牽引側歯根膜で発現する MMP12 の発現経路は未解明である。本研究の目的は、牽引側歯根膜で起こる伸展刺激負荷時に歯根膜線維芽細胞から発現する MMP12 の発現経路を解明することである。

### 3. 研究の方法

これまでの研究で、24 時間持続的伸展刺激負荷時のヒト歯根膜線維芽細胞で、MMP12 の発現上昇を遺伝子およびタンパクレベルで確認している。一般的なメカニカルストレス負荷時に変動する細胞内シグナル分子として、伸展刺激感受性イオンチャンネル (SAC)、タンパクキナーゼ C (PKC)、接着斑キナーゼ (FAC)、MAPK 経路などが知られている。過去に伸展刺激負荷時の歯根膜線維細胞で、ERK、p38 および JNK などの MAPK 経路を介したアルカリフォスファターゼの発現や活性制御、JNK および ERK 経路を介した I 型コラーゲンおよび MMP1 発現制御、FAK-ERK 経路を介したオステオポンチンの発現制御が報告されており、これらの経路が伸展刺激負荷時に発現する MMP12 を制御している可能性が考えられる。以上を踏まえ以下の研究方法を計画した。

- (1) 伸展刺激負荷時のヒト歯根膜線維芽細胞に細胞シグナル分子 p38、ERK、Akt および JNK の阻害剤を用いて MMP12 の発現変化をリアルタイム RT-PCR 法、western blotting 法、ELISA 法にて調べる。また下流の転写因子である NF- $\kappa$ B の関与を調べるため NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いて同様に MMP12 の発現変化を遺伝子レベルではリアルタイム RT-PCR 法、タンパクレベルでは western blotting 法および ELISA 法にて確認する。変動がみられる分子のリコンビナントタンパク質を使用し、トランスフェクション法を用いてヒト歯根膜線維芽細胞に導入し、MMP12 発現への影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて遺伝子レベルで調べる。ERK には ERK1 および ERK2 が知られているため、ERK1 および ERK2 のリコンビナントタンパク質を用いる。
- (2) 持続的伸展刺激負荷によるヒト歯根膜線維芽細胞の細胞シグナル分子 p38、ERK、Akt および JNK の動態を確認するため、western blotting 法を用いて、リン酸化タンパク質の経時的変化を調べ、MMP12 発現上昇の時期との関連を調べる。

### 4. 研究成果

細胞シグナル分子 p38、ERK、Akt および JNK の阻害剤を投与した 24 時間伸展刺激負荷後のヒト歯根膜線維芽細胞で発現する MMP12 のリアルタイム RT-PCR 法の結果は、対照群である非 ERK 阻害剤投与群と比較して ERK 阻害剤添加群では MMP12 の発現低下が認められた。これによりヒト歯根膜線維芽細胞で伸展負荷時に発現する MMP12 は、ERK 経路を阻害すると遺伝子レベルで MMP12 の発現が低下することが明らかになった。またヒト歯根膜線維芽細胞における MMP12 の細胞内タンパクの解析を行うため western blotting 法で MMP12 のタンパクレベルでの解析を行ったところ、非 ERK 阻害剤投与群と比較して ERK 阻害剤添加群で MMP12 のタンパクレベルでの発現低下が認められた。MMP12 は分泌タンパクであるため、細胞外への分泌を考慮してヒト歯根膜線維芽細胞の培養液の上清を ELISA 法でそれぞれ調べた結果でも、有意に ERK 阻害剤群で MMP12 のタンパクレベルでの発現低下が確認された。次に、MAPK 経路の下流経路を調べるため NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた実験群ではリアルタイム RT-PCR 法を用いた MMP12 の遺伝子解析および western

blotting 法を用いたタンパクレベル解析においても MMP12 の発現に変化はみられなかった。MMP12 の発現には NF- $\kappa$ B と AP-1 の関与が知られているが、伸展刺激負荷時のヒト歯根膜線維芽細胞においては NF- $\kappa$ B でなく、AP-1 が関与する可能性が示唆される結果となった。

ERK1 および ERK2 のリコンビナントタンパク質をトランスフェクション法にてヒト歯根膜線維芽細胞に導入し、24 時間後の MMP12 の発現変化をリアルタイム RT-PCR 法を用いた結果では、ERK1 タンパク導入群で対照群である非投与群と比較して MMP12 の遺伝子レベルでの有意な発現上昇がみられたが、ERK2 タンパク導入群では MMP12 の遺伝子レベルでの発現上昇は見られなかった。ヒト歯根膜線維芽細胞への伸展刺激負荷時に発現する MMP12 は ERK2 でなく ERK1 が関与している可能性が示唆された。

ヒト歯根膜線維芽細胞が伸展負荷刺激に発現するリン酸化 ERK の継時的変化を確認するため western blotting 法にて細胞内タンパク質を確認したところ、伸展刺激負荷 5 分後から ERK のリン酸化がみられ、30 分後までリン酸化 ERK は増加した。その後、時間経過とともにリン酸化 ERK は減少していった。MMP12 の発現量はこれまでに伸展刺激負荷 24 時間後に最大化することを考慮すると、直接的経路以外に間接的経路の存在の可能性を示唆する結果となった。

以上の結果により伸展刺激負荷時にヒト歯根膜線維芽細胞で発現する MMP12 は ERK 経路 (ERK1) を介して NF- $\kappa$ B でなく AP-1 を制御することで、MMP12 の発現を制御している可能性が示唆された (図 1)。

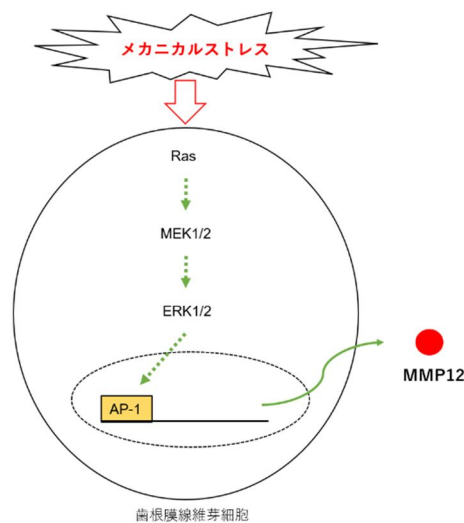


図1. MMP12の発現メカニズム

#### <引用文献>

Narimiya T, Wada S, Kanzaki H, Ishikawa M, Tsuge A, Yamaguchi Y, Nakamura Y. Orthodontic tensile strain induces angiogenesis via type IV collagen degradation by matrix metalloproteinase-12. *J Periodontal Res.* 2017 Oct;52(5):842-852.

Konstantonis D, papadopoulou A, Makou M, Eliades T, Basdra E, Kletsas D. The role of cellular senescence on the cyclic stretching-mediated activation of MAPK and ALP expression and activity in human periodontal ligament fibroblasts. *Experimental Gerontology* 2014 Sep;57:175-180.

Kook SH, Jang YS, Lee JC. Involvement of JNK-AP-1 and ERK-NF- $\kappa$ B signaling in tension-stimulated expression of type I collagen and MMP-1 in human periodontal ligament fibroblasts. *J.Appl.Physiol.*2011 Dec;111(6):1575-1583.

Hong SY, Jeon YM, Lee HJ, Kim JG, Baek JA, Lee JC. Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts. *Mol. Cell Biochem.* 2010 Feb;335(1-2):263-272.

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 Tsuyoshi Narimiya, Hiroyuki Kanzaki, Yuki Yamaguchi, Satoshi Wada, Yuta Katsumata, Ken Tanaka, Hiroshi Tomonari	4. 巻 11
2. 論文標題 Nrf2 activation in osteoblasts suppresses osteoclastogenesis via inhibiting IL-6 expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone Reports	6. 最初と最後の頁 100228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bonr.2019.100228	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 成宮 毅、菅崎弘幸、和田悟史、友成 博
2. 発表標題 MMP12は矯正学的歯の移動時の牽引側歯根膜組織における出芽を伴う血管新生を促進する
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------