

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月17日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008年～2011年

課題番号：20390525

研究課題名（和文）

歯の移動に伴う歯根吸収とセメント質関連細胞の細胞死との因果関係の解明

研究課題名（英文）

Evaluation of relationships between root resorption accompanied with orthodontic tooth movement and cell death of cementum-related cells.

研究代表者

溝口 到 (MIZOGUCHI ITARU)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：20200032

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、セメント質関連細胞の細胞死と歯根吸収との関連性を明らかにすることである。生後8週齢の雄性Wistar系ラットを用い、20gfの力で第一臼歯の頬側移動をはかる実験を行った。実験終了後、パラフィン切片を作製し、single-stranded DNA)とcleaved caspase-3の免疫染色による観察を行った。その結果、実験的歯の移動による有細胞セメント質の吸収は、先行するセメント細胞の細胞死に伴い破歯細胞によって引き起こされると推測されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to clarify the biological mechanism of root resorption caused by orthodontic tooth movement. 8-week-old Wistar rats were used as an experimental animal model. The unilateral first molar was moved buccally by a cantilever-type Ni-Ti wire (.012 inch in diameter). The initial force was adjusted to 20 gf. The results indicate that cell death of cementoblasts of acellular cementum accompanied by orthodontic tooth movement may induce resorptive activities of odontoclasts, which suggest relationship between cell death of cementoblasts and root resorption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
平成21年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成22年度	2,400,000	720,000	3,120,000
平成23年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児歯学

キーワード：歯根吸収、歯の移動、セメント芽細胞、セメント細胞、細胞死

1. 研究開始当初の背景

一般的に歯根表層に存在するセメント質は、骨組織に比べて組織活性や組織改造能が低く、吸収されにくい組織とされている。しかし、Lupi ら (1996) によると、矯正治療前における上顎4前歯の歯根吸収の発現率が15%であったのに対し、矯正治療12か月以降の発現率は73%と増加していた。矯正歯科治療と歯根吸収の因果関係は、ヒトを用いた実験的研究においても確認されており、動的矯正治療が歯根吸収の原因の一つとなりうることは明らかである。その後、歯の移動時に圧迫側歯根膜に出現する硝子様変性組織に対応した歯根表層に吸収が生じること、および変性組織の吸収過程で出現する吸収系細胞（破歯細胞）によってセメント質の吸収が起きることが明らかにされたが、その正確な発現機序に関しては不明のままである。

近年、主に整形外科領域の研究者から、骨吸収において骨細胞の細胞死(アポトーシスとネクローシス)が大きく関わっていることが報告されている。Noble らの研究グループ(1997)は、骨細胞のアポトーシスが骨改造の盛んな胎生期骨組織、成人の異所性骨、および骨関節炎周囲の osteophyte に存在することを初めて見出し、骨細胞のアポトーシスと骨吸収との関連性を指摘した。その後、同様の現象がエストロゲン欠乏、副腎皮質ホルモン投与によっても起きることが報告された(Tomkinson et al., 1997)。また、申請者ら(Hamaya et al., 2002) は、歯の移動に伴い出現する変性組織に隣接する歯槽骨・骨細胞が移動後6時間でアポトーシスを生じ、その後、二次性ネクローシスと骨小腔内壁での骨融解(osteolysis)に到ることを組織学的に明らかにし、矯正学的歯の移動における骨吸収においても骨細胞の細胞死が関与していることを示した。

従来の歯根吸収に関する研究は、吸収の主役を担う吸収系細胞およびそれに関連する硝子様変性組織を対象としたものがほとんどであり、吸収される側のセメント質やセメント質関連細胞(セメント芽細胞とセメント細胞)に着目した研究は行われていない。

一方、セメント質に目を移してみると、セメント質(正確には歯根吸収が発現しやすい歯根側に存在する有細胞セメント質)は、骨小腔および骨細管と同様の小腔・細管構造を有し、細胞間ネットワークを形成していること(Kagayama et al., 1997)、基質であるオステオネクチン、オステオポンチン、オステオカルシンなど骨細胞と共通する細胞外基質を産生すること(Kagayama et al., 1997)から、セメント質と骨組織とは極めて類似した生物学的特徴を有する。従って、矯正学的歯の移動時の歯槽骨における骨細胞のアポトーシスと骨吸収との関係を、セメント質関連細胞の細胞死と歯根吸収との関係にも適用できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、強い矯正力が歯根膜に負荷された際に血流障害を起こし、セメント細胞のアポトーシスにより核の凝集と断片化が起こり、その後細胞自体が断片化し、セメント細胞の器質的变化が起こり、破歯細胞が誘導されるという仮説を立て、歯根吸収とセメント質関連細胞の細胞死との関連性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 実験動物

実験動物には、生後8週齢のWistar系雄性ラット35匹を用いた。すべての実験動物は本学動物実験センターにて飼育し、通常のラット用固形飼料と水道水を十分に与え、自由摂食させた。

2) 実験的歯の移動方法

本実験に用いた矯正装置は、ステンレススチールチューブにニッケルチタンワイヤー(直径0.012inch)を挿入した。右側第一臼歯に口蓋側から頬側方向に初期荷重20gfの矯正力が発現するように装置を調整した。また、矯正力のかからない左側第一臼歯を対照群とした。実験期間は6時間、12時間、1日、2日、4日、7日および14日間とし、各実験期間で5匹ずつを用いた。

3) 試料の作製

実験的歯の移動終了後、ラットは4%パラホルムアルデヒドを用いて、灌流固定を行った。その後、4°C 下で10% EDTA 脱灰液で4週間脱灰後、通法に従い脱水処置しパラフィンに包埋した。試料から臼歯部咬合平面に平行に厚さ7 μmの連続切片を作製した。

5) 観察部位

観察部位は、歯の実験群において根尖側1/2 から1/3の硝子様変性組織が出現する第一臼歯近心根の圧迫側セメント質とした。

6) TUNEL 法によるアポトーシスの観察

TUNEL 法は、In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa; MK500) を用いて行った。反応後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) 反応液を室温で2分反応させた。3% メチルグリーンで核染色を行った後、脱水・透徹・封入を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。

7) Single-stranded DNA と activated caspase 3 との免疫二重染色

一次抗体として anti-ssDNA antibody (10 μg/ml; Enzo) と anti-activated caspase 3 antibody を用いて二重染色を行った。

8) 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色

TRAP 染色は Acid Phosphatase Leukocyte Kit (SIGMA; 387A) を用いて行った。

4. 研究成果

1) TUNEL 法によるアポトーシスの観察

矯正力が負荷された部位は対照群 (図1a) と比較して、セメント質や歯根膜において6時間後から全てのラットで TUNEL 陽性細胞 (図1; 矢印) が認められた (図1b)。その後、2日後まで陽性細胞は増加傾向が続いた (図1c)。また、2日後では陽性細胞はセメント質表層に多くみられ、セメント質の表層で TUNEL 陽性細胞が多く認められた。4日後以降は経時的に TUNEL 陽性細胞は減少傾向を示した (図1d, e)。

2) 免疫二重染色によるアポトーシスの観察

実験群では、荷重負荷12時間後から変性部位の直下のセメント質の表層と歯根膜で赤色蛍光の single-stranded DNA と緑色蛍光 activated caspase 3 の反応がわずかに認められた (図2b)。1日後では、変性部位の直下

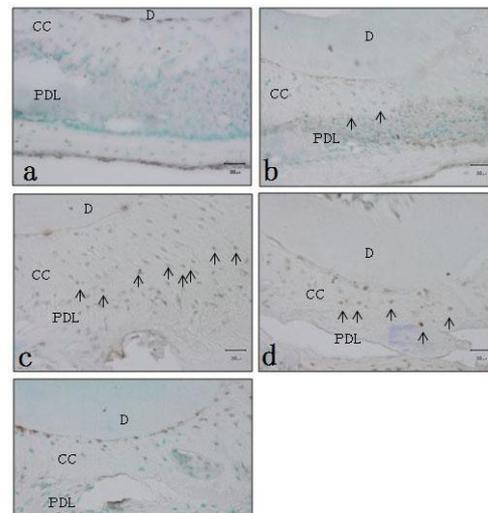


図1. TUNEL 染色法によるアポトーシスの観察

a: 対照群、b: 荷重負荷6時間後、c: 荷重負荷2日後、d: 荷重負荷4日後、e: 荷重負荷14日後。

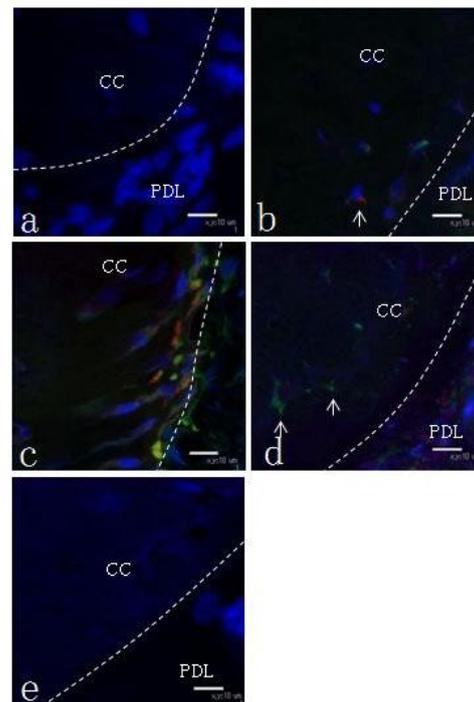


図2. Single-stranded DNA と activated caspase 3 の二重免疫染色

a: 対照群、b: 荷重負荷12時間後、c: 荷重負荷1日後、d: 荷重負荷2日後、e: 荷重負荷4日後。

のセメント質の表層・歯根膜で多くのアポトーシスの反応（赤色蛍光と緑色蛍光の反応）が認められ、その範囲も拡大していた（図 2c）。2 日後にはセメント質や歯根膜でのアポトーシスの反応が減少していた（図 2d,e）。

これらの染色像からアポトーシスの反応は 1 日後がピークであり、その後は経時的に減少することが確認された。

3) TRAP 染色による破歯細胞と破骨細胞の観察

荷重負荷 6 時間と 12 時間後では、セメント質や歯根膜、歯槽骨において TRAP 陽性細胞は認められなかった（図 3a, b）。1 日と 2 日および 4 日後で変性部位に隣接した歯槽骨表層において褐色に染まった TRAP 陽性細胞の出現が確認された（図 3c, d, e; 矢頭）。7 日後では硝子様変性組織の周囲においてセメント質表層に破歯細胞の出現が認められた（図 3f; 矢印）。さらに 14 日後には破歯細胞の数が増加し、その出現部位は硝子様変性が強く出ていたと思われる部位の直下において顕著であり、セメント質の広範な吸収が認められた（図 3g; 矢印）。

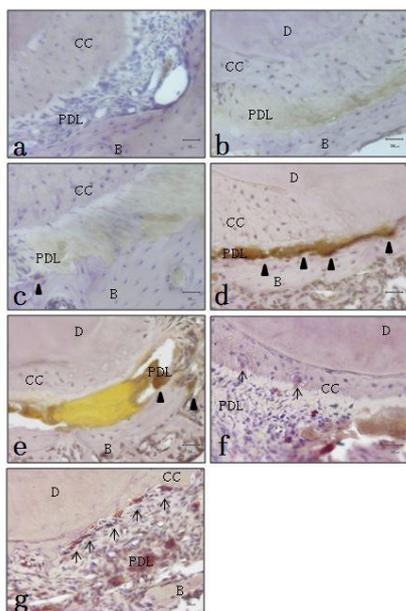


図 3. TRAP 染色

a :荷重負荷 6 時間後、b : 荷重負荷 12 時間後、c : 荷重負荷 1 日後、d : 荷重付荷 2 日後、e : 荷重負荷 4 日後、f : 荷重負荷 7 日後、g : 荷重負荷 14 日後。

（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 38 件）

1. Okayama M, Shitara A, Arakawa Y, Takuma T, Tajima Y, Mizoguchi I, SNARE proteins are not excessive for the formation of post-Golgi SNARE complexes in HeLa cells、*Mol Cell Biochem* (on line)、2012、DOI 10.1007/s11010-012-1293-z
2. Hayashi K, Saitoh S, Mizoguchi I, Morphological analysis of the skeletal remains of Japanese females from the Ikenohata-Shichikencho site. *Eur J Orthod*、査読有、2011、(PubMed PMID: 21745827)
3. Morita T, Tanimura A, Shitara A, Suzuki Y, Nezu A, Takuma T, Tojyo Y, Expression of functional Stim1-mKO1 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector. *Arch Oral Biol*、査読有、2011、(PubMed PMID: 21718965)
4. Arakawa T, Ohta T, Abiko Y, Okayama M, Mizoguchi I, Takuma T, A polymerase chain reaction-based method for constructing a linear vector with site-specific DNA methylation. *Anal Biochem*、査読有、2011、Vol.416、pp.211-217
5. Nakamura S, Saitoh M, Yamazaki M, Nishimura M, Kurashige Y, Arakawa T, Takuma T, Kaku T, Abiko Y, Nicotine induces upregulated expression of beta defensin-2 via the p38MAPK pathway in the HaCaT human keratinocyte cell line. *Med Mol Morphol*、査読有、Vol.143、2010、pp.204-210
6. Okayama M, Arakawa T, Tanimura A, Mizoguchi I, Tajima Y, Takuma T, Role of VAMP8/endobrevin in constitutive exocytotic pathway in HeLa cells. *Cell Struct Funct*、査読有、Vol.34、2009、pp.115-125
7. Takeshima M, Saitoh M, Kusano K,

Nagayasu H, Kurashige Y, Malsantha M, Arakawa T, Takuma T, Chiba I, Kaku T, Shibata T, Abiko Y, High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med*, 査読有、Vol.37、2008、pp. 475-479

8. Kurashige Y, Saitoh M, Nishimura M, Noro D, Kaku T, Igarashi S, Takuma T, Arakawa T, Inoue T, Abiko Y, Profiling of differentially expressed genes in porcine epithelial cells derived from periodontal ligament and gingiva by DNA microarray. *Arch Oral Biol*, 査読有、Vol.53、2008、pp. 437-442
9. 甲田尚央、鳥谷奈保子、荒川俊哉、田隈泰信、溝口 到: 成長期ラット顎関節円板における proteoglycan の mRNA 発現. 北医療大歯誌、査読有、Vol.27、2008、pp. 9-18

[学会発表] (計 54 件)

1. Arakawa T, Okayama M, Obara N, Shitara A, Mizoguchi I, Takuma T: Analysis of lysophosphatidic acid signaling in periodontal ligament AADR Annual Meeting、2011 年 10 月 17-20 日、Tampa (アメリカ合衆国)
2. 岡山三紀、荒川俊哉、池田和貴、田隈泰信、溝口 到: メカニカルストレスに誘導されるヒト歯根膜細胞の遺伝子検索. 第 70 回日本矯正歯科学会大会・第 4 回国際大会、2011 年 10 月 17-20 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
3. 溝口 到: 矯正歯科診断と治療の実際. 第 203 回宮城県保険医協会歯科学術研修会、2011 年 10 月 15 日、宮城県保険医協会研修ルーム (宮城県)
4. 溝口 到: 歯並びと健康. 第 31 回北海道学校歯科保健研究大会、2011 年 10 月 14 日、北海道歯科医師会館 (北海道)
5. 田隈 泰信、設楽彰子、岡山三紀、荒川俊哉、溝口 到: ラット耳下腺調節開口分泌に関わる SNARE 複合. 第 53 回日本歯科基礎医学会学術大会、2011 年 9 月 30-10 月 2 日、長良川国際会議場 (岐阜県)
6. 荒川俊哉、岡山三紀、溝口 到、設楽彰子、田隈泰信: ヒト歯根膜細胞のメカニカルストレスによる遺伝子発現. 第 53 回日本歯科基礎医学会学術大会、2011 年 9 月 30-10 月 2 日、長良川国際会議場 (岐阜県)
7. 設楽彰子、渋井 徹、岡山三紀、荒川俊哉、溝口 到、坂倉康則、田隈泰信: ゴルジ体のリボン構造形成における VAMP4 の重要性. 第 53 回日本歯科基礎医学会学術大会、2011 年 9 月 30-10 月 2 日、長良川国際会議場 (岐阜県)
8. 荒川俊哉、岡山三紀、小原伸子、設楽彰子、柴田俊一、溝口 到、田隈泰信: ヒト歯根膜におけるリゾホスファチジン酸シグナルの解析. 日本生化学会、2011 年 9 月 21-24 日、京都国際会議場 (京都府)
9. 溝口 到: 3D Simulation of Orthognathic Surgery Using a Multimodal Image-Fusion Technique (招待講演). 日本顎変形症学会、2011 年 6 月 15 日、一橋会館 (東京都)
10. 溝口 到: 下顎骨の成長様相と下顎頭軟骨の生物学的特徴 (招待講演). 近畿東海矯正歯科学会、2011 年 6 月 5 日、大阪大学コンベンションセンター (大阪府)
11. Arakawa T, Okayama M, Abiko Y, Mizoguchi I, Shitara A, Takuma T: Gene expression by mechanical stress in human periodontal ligament cells. ADR/AADR/ CADR 89th General Session and Exhibition、2011 年 3 月 16-19 日、San Diego, アメリカ合衆国
12. 田隈 泰信、岡山 三紀、設楽 彰子、荒川 俊哉、溝口 到: 開口分泌の SNARE タンパク質は過剰に存在するか?. 第 83 回日本生化学会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
13. 荒川 俊哉、岡山 三紀、溝口 到、設楽 彰子、田隈 泰信: ヒト歯根膜細胞のメカニカルストレスによる遺伝子発現. 第 83 回日本生化学会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

14. 岡山三紀, 設楽彰子, 荒川俊哉, 溝口 到, 田隈泰信:ウミホタル・ルシフェラーゼ安定発現細胞を用いた SNARE の機能解析. 第 83 回日本生化学会, 2010 年 12 月 7-10 日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
15. 荒川俊哉, 安彦善裕, 岡山三紀, 溝口 到, 設楽 彰子, 田隈 泰信: VAMP4 ノックダウン細胞におけるゴルジ体の断片化と初期エンドソームの分散化. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 20-22 日、タワーホール船堀 (東京都)
16. 設楽彰子, 岡山三紀, 荒川俊哉, 溝口 到, 田隈泰信: VAMP4 ノックダウン細胞におけるゴルジ体の断片化と初期エンドソームの分散化. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 20-22 日、タワーホール船堀 (東京都)
17. 永坂 萌、鳥谷奈保子、敦賀英知、坂倉康則、溝口 到: 歯根膜由来線維芽細胞の伸展刺激に対する fibrillin-1 および versican の発現変化. 2010 年 9 月 28-29 日、横浜パシフィコ (神奈川県)
18. 伊藤麻衣, 岡山三紀, 荒川俊哉, 田隈泰信, 溝口 到: 重力負荷による歯根膜細胞のシグナル応答機構. 2009 年 11 月 16 日-18 日、福岡国際会議場 (福岡県)
19. 設楽彰子, 岡山三紀, 荒川俊哉, 溝口 到, 田隈泰信: W-View 光学系を用いた構成的開口分泌関連 v-SNARE の網羅的解析. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009 年 9 月 9-11 日、朱鷺 メッセ (新潟)
20. 伊藤麻衣, 荒川俊哉, 岡山三紀, 設楽彰子, 溝口 到, 田隈泰信: 歯根膜細胞の重力負荷に対するシグナル応答機構. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009 年 9 月 9-11 日、朱鷺 メッセ (新潟)
21. 甲田尚央、鳥谷奈保子、坂倉康則、荒川俊哉、笹野泰之、溝口 到: 成長期ラット顎関節円板における proteoglycan の mRNA 発現. 第 67 回日本矯正歯科学会学術大会、2008 年 9 月 16 日-18 日、幕張メッセ(千葉県)
22. 伊藤麻衣、岡山三紀、荒川俊哉、田隈泰信、溝口 到: 歯根膜におけるメカニカルストレス応答遺伝子の解析. 第 67 回日本矯正歯科学会学術大会、2008 年 9 月 16 日-18

日、幕張メッセ(千葉県)

[図書] (計 2 件)

1. 溝口 到、咀嚼障害・咬合異常 2 歯科矯正、医歯薬出版、pp41-52, 2011
2. 溝口 到、咀嚼障害・咬合異常 2 歯科矯正、医歯薬出版、pp100-104, 2011

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 到 (MIZOGUCHI ITARU)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号: 20200032

(2) 研究分担者

田隈 泰信 (TAKUMA TAISHIN)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号: 40095336

鳥谷 奈保子 (TORIYA NAKO)

研究者番号: 20433435

北海道医療大学・歯学部・助教