

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10229

研究課題名（和文）歯根吸収抑制におけるcPLA2の役割 - 硝子様変性と破歯細胞活性を標的にして -

研究課題名（英文）Role of cPLA2 in Inhibition of Root Resorption - Targeting hyalinization and Odontoclast Activity

研究代表者

佛坂 斉社（Hotokezaka, Hitoshi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・准教授

研究者番号：90199513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：cPLA2阻害剤を用いて、歯根吸収の原因である硝子様変性と破歯細胞活性化の両面から検証することを目的とした。ラットの上顎第一臼歯に矯正装置を装着した後、腹腔内にcPLA2阻害剤を投与した。実験終了後、組織標本を作製し染色した。cPLA2阻害剤の投与により硝子様変性に差異は認めなかった。また、細胞死についてもcPLA2阻害剤の投与による抑制作用を認めなかった。さらに、cPLA2阻害剤の投与によるcPLA2の発現量の差異も認めなかった。一方、歯根吸収量はcPLA2阻害剤の投与により抑制される傾向を認めた。これらの結果から、cPLA2が歯根吸収の発症に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

矯正治療の副作用である歯根吸収にcPLA2がいかに関与するかを硝子様変性（虚血性細胞死）と破歯細胞の分化・活性化機構という異なる2つの働きをターゲットにしてcPLA2の作用を評価しようという試みが学術的意義があるところである。また、将来的に臨床応用が可能になれば、矯正歯科治療時の重大な副作用である歯根吸収を克服し、より早く安全に歯を移動させることが可能になり、その臨床的意義は大きく社会的意義のあるところである。

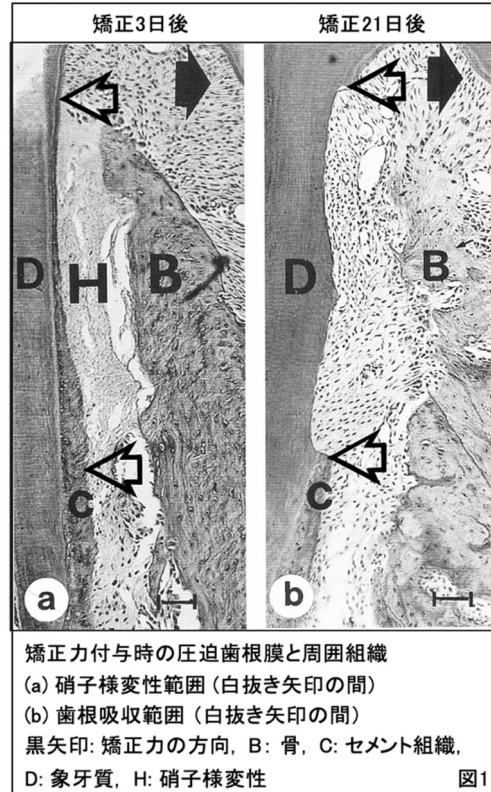
研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to examine both hyalinization and odontoclast activation as causes of root resorption using a cPLA2 inhibitor. The cPLA2 inhibitor was administered intraperitoneally after an orthodontic appliance was placed on the maxillary first molar of rats. After the experiment, tissue specimens were prepared and stained. No difference in hyalinization was observed after administration of the cPLA2 inhibitor. Cell death was also not inhibited by the administration of the cPLA2 inhibitor. Furthermore, no difference in cPLA2 expression was observed after administration of the cPLA2 inhibitor. On the other hand, root resorption was reduced by the administration of the cPLA2 inhibitor. These results suggest that cPLA2 is involved in the pathogenesis of root resorption.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：矯正歯科治療 歯根吸収 歯の移動

1. 研究開始当初の背景

矯正治療において、歯根吸収は最も頻繁に認められる副作用の一つである。一般に、歯根吸収は次の様な過程で進行すると言われている。(1) 血管が圧迫され血流の供給が減少することから、圧迫側の歯根膜組織が血行障害や低酸素環境になり、硝子様変性(虚血性細胞死)が出現する。その後、(2)それに近接した領域に炎症性サイトカインやマクロファージ細胞が出現し、(3)破骨・破歯細胞により骨吸収や歯根吸収が起こる、という過程である。我々は、ラットに矯正力を負荷する実験を行い硝子様変性と歯根吸収への関係を検討した。すると、硝子様変性(aの点線部)の場所に一致して、歯根吸収(bの点線部)が起こっていた(図1)。このことは、硝子様変性(虚血性細胞死)が歯根吸収を誘導する因子である可能性を示しているが、その成因についての詳細は不明である。



Ca²⁺依存性 cytosolic phospholipase A2 (cPLA₂) は細胞膜のリン脂質代謝調節に関わり、特にリン脂質 sn-2 結合部位を選択的に加水分解して アラキドン酸を遊離する酵素としてよく知られている。しかしながら、近年、cPLA₂ は直接的に細胞増殖や周囲環境からのストレス応答に深く関与していることが示され、cPLA₂ は細胞外からの刺激に対して、アポトーシスを誘導する役割を担っている事が明らかになった(Cao Y ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,11280-5, 2000)。また、cPLA₂ 欠損マウスを用いた研究により、化学発がん剤を投与した時、cPLA₂ 欠損マウスでは正常マウスと比較して発がん性が増強していること、さらに、がん病巣においてアポトーシスが顕著に減少していることが報告されている (Hsley JNM ら, Cancer Res. 65, 2636-2643, 2005)。これらの結果は、cPLA₂ が一種のアポトーシス促進蛋白 (proapoptotic protein) である可能性を示唆している。さらに、cPLA₂ の細胞死への関与は、脳虚血病巣においても確認されている。一過性の脳虚血を起こさせた cPLA₂ 欠損マウスは正常マウスと比較して、脳虚血により引き起こされる脳梗塞領域が有意に減少しているため、cPLA₂ は脳虚血による細胞死を助長する働きをしていると結論されている (Bonventre JV ら, Nature, 390, 622-5; 1997)。我々の研究室でも、低酸素分圧環境が惹起する細胞死において、

cPLA2 が細胞死を促進していることを示唆する結果を得ている (Tashiro S ら, J Biol Chem 279:17715-22; 2004)。

cPLA2 の破骨細胞の分化・活性化における役割についてはこれまで相反する結果が報告されている。cPLA2 欠損マウスでは、骨吸収の強い促進作用を持つ Prostaglandin E2 (PGE2) が骨芽細胞からほとんど産生されなくなり、骨髄細胞からの破骨細胞形成が認められないという Miyaura らの報告 (Miyaura C ら, J Exp Med 197:1303-1310; 2003)がある一方で、cPLA2 阻害剤を用いた実験では cPLA2 の抑制は破骨細胞の形成を促進するという Allard-Chamard 報告 (Allard-Chamard H ら, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 90, 117-123, 2014)がある。このように相反する結果がみられる要因は、これらの研究が各々特殊な条件下での実験であったことが大きいと思われる。例えば、Miyaura らの論文は薬剤により誘発された炎症反応環境下であること、Allard-Chamard らの論文は阻害剤のみを用いた *in vitro*での研究であったことがあげられる。したがって、現時点では、*in vivo*における破骨細胞の分化と活性化における cPLA2 の役割についてはまだ結論に達していない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、矯正力による歯根吸収への cPLA2 の関与を硝子様変性 (虚血性細胞死) と破骨、破歯細胞の分化・活性化機構の両面から検討し、cPLA2 阻害による歯根吸収抑制の立証とそのメカニズム解明に迫ることである。

本研究は、矯正治療における副作用である歯根吸収に対して、cPLA2 の制御という新しい観点から取り組むことが特色である。さらに、cPLA2 阻害剤を使用し、虚血性細胞死の抑制と破骨・破歯細胞の不活性化という異なる 2 つの働きを検討し、cPLA2 の作用を多角的に評価する。

3. 研究の方法

(1) 実験 1 . cPLA2 の硝子様変性帯での発現を中心に検討した。同時に、細胞死、骨の変化および歯根吸収の発症を観察した。Wistar 系ラット雄 (10 週齢) を用い、上顎第 1 臼歯-切歯間に矯正装置 (クローズドコイルスプリング) を装着し、上顎第 1 臼歯を近心に牽引した。牽引後に、組織染色、骨組織の動態検出、実験動物用マイクロ CT および走査型顕微鏡撮影を行った。組織染色については、組織標本作製し、HE 染色 (硝子様変性の同定)、TUNEL 染色 (細胞死判定) および、免疫染色 (cPLA2 発現判定) を行った。骨組織の動態検出については、組織標本をもちいて、アルカリフォスファターゼ染色 (骨芽・セメント芽細胞の動態検出) と TRAP (酒石酸耐性酸性フォスファターゼ) 染色 (破骨・破歯細胞の動態検出) を行った。また、小動物用マイクロ CT を撮影し、歯の動きや周囲骨の変化を検討した。さらに歯根を摘出し、走査型電子顕微鏡にて歯根吸収面積を、走査型レーザー顕微鏡にて歯根吸収深さを測定し、両者を乗じて歯根吸収体積を求めた。

(2) 実験2、cPLA2 阻害剤をラットに投与し、cPLA2 阻害剤の効果を解析した。実験1と同様の方法を用いて比較検討した。cPLA2 阻害剤の濃度と投与時期を変化させて腹腔内注射を行った。阻害剤は(AACOFC3 (Santa Cruz Biotechnology 社))を使用した。

4. 研究成果

Wistar系ラット(10週齢雄)を用い、上顎第1臼歯-切歯間に矯正装置(クローズドコイルスプリング)を装着し、上顎第1臼歯を近心に牽引した。牽引後経時的に、マイクロCT撮影を行った。また、組織標本を作製し、HE染色、TRAP染色、およびTUNEL染色を行った。牽引後に、歯根標本の走査型顕微鏡撮影を行った。

この実験系で以下のような結果が得られた。歯の移動量と歯槽骨(BMD, BV, BMC)については、それぞれ減少することが観察された。歯根吸収についてはその発症が認められた。また、硝子様変性については、矯正力が作用する歯根膜の圧迫部位でみられた。TUNEL陽性細胞は歯根膜の圧迫部位に認められた。さらに、TRAP陽性細胞は歯根吸収部位で顕著に認められた。

上記の確立された実験系で、cPLA2 阻害剤 AACOFC3 (Santa Cruz Biotechnology 社) をラットに腹腔内投与し、cPLA2 阻害の効果を検討した。

その結果、以下のことが分かった。

HE染色において硝子様変性の出現を評価したところ、AACOFC3投与による違いは認められなかった。また、TUNEL染色により細胞死の判定を行ったところ、AACOFC3投与による抑制効果は認められなかった。そして、免疫染色によりcPLA2の出現を観察したところ発現量は減少していた。さらに、歯根吸収量を測定したところ、AACOFC3投与により抑制される傾向が認められた。

これらの結果から、cPLA2 inhibitorであるAACOFC3投与は歯根吸収の発症を抑制する傾向が認められた。また、硝子様変性や歯根膜細胞死には関与しないことが示された。今後は、新たなcPLA2選択性阻害剤を使用して、歯根吸収における抑制とそのメカニズムを探索したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuika Ueda-Ichinose; Hitoshi Hotokezaka; Toshihiro Miyazaki; Takeshi Moriishi; Yuka Hotokezaka; Keira Arizono; Takuya Nakamura; Noriaki Yoshida.	4. 巻 92
2. 論文標題 Lithium reduces orthodontically induced root resorption by suppressing cell death, hyalinization, and odontoclast formation in rats.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angle Orthodontist	6. 最初と最後の頁 547-554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2319/072221-578.2	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 -

1. 著者名 Arizono Shimada Keira, Hotokezaka Hitoshi, Morita Yukiko, Ino Kondo Airi, Ueda Ichinose Yuika, Nashiro Yukako, Hotokezaka Yuka, Yoshimi Keiko, Kiliaridis Stavros, Yoshida Noriaki	4. 巻 49
2. 論文標題 Effect of masseter muscle mass on the rate of experimental tooth movement in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 1012 ~ 1019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/joor.13357	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 該当する

1. 著者名 Nishioka-Sakamoto Kie, Hotokezaka Hitoshi, Hotokezaka Yuka, Nashiro Yukako, Funaki Mariko, Ohba Seigo, Yoshida Noriaki	4. 巻 93
2. 論文標題 Fixation of an orthodontic anchor screw using beta-tricalcium phosphate in a screw-loosening model in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Angle Orthodontist	6. 最初と最後の頁 341 ~ 347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2319/080822-558.1	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 1件）

1. 発表者名 Takuya Nakamura, Hitoshi Hotokezaka, Yuka Hotokezaka, Takako Tajima, Ueda Yuika, Noriaki Yoshida
2. 発表標題 THRESHOLD OF THE COMPRESSION OF PERIODONTAL SPACE WHICH INDUCES ORTHODONTICALLY INDUCED ROOT RESORPTION
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress（国際学会）
4. 発表年 2020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	宮崎 敏博 (Miyazaki Toshihiro) (10174161)	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	佛坂 由可 (Hotokezaka Yuka) (10244089)	長崎大学・病院(歯学系)・講師 (17301)	
研究分担者	田代 茂樹 (Tashiro Shigeki) (20300882)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	近藤 愛理(井野愛理) (Kondo Airi) (70827633)	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
---------	---------