

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 5 月 21 日現在

機関番号：47131

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791927

研究課題名（和文）咬合性外傷モデルマウスを用いたケモカイン発現と顎骨吸収との相関関係

研究課題名（英文）Correlation between the expression of chemokines and alveolar bone resorption using hyperocclusion model mice

研究代表者

後藤 加寿子（GOTO-T KAZUKO）

福岡医療短期大学・歯科衛生学科・准教授

研究者番号：60389418

研究成果の概要（和文）：本研究は①マウス及びラットを用いて臼歯に過剰な咬合力が加わる *in vivo* 咬合性外傷モデルを確立して歯槽骨及び歯周組織における形態的、免疫化学的な解析を骨リモデリングに関連する調節因子、特に歯槽骨の吸収促進因子の探索②ヒト抜去歯より歯根膜細胞を単離し *in vitro* 過剰機械的伸展刺激モデルを用いて *in vivo* マウスモデルで明らかになった歯槽骨吸収促進因子の探索とそのシグナル伝達について解析③遺伝子改変モデルマウスを用いこの吸収促進因子及びその受容体 KO マウスを用いてこの咬合性外傷におけるケモカインの重要性を確立した。

研究成果の概要（英文）：Excessive mechanical stress (MS) during hyperocclusion is known to result in disappearance of the alveolar hard line, enlargement of the periodontal ligament (PDL) space, and destruction of alveolar bone, leading to occlusal traumatism. We hypothesized that MS induces expression of osteoclastogenesis-associated chemokines in PDL tissue, resulting in chemotaxis and osteoclastogenesis during occlusal traumatism. We examined the effect of MS on relationships between chemokine expression and osteoclastogenesis using *in vivo* and *in vitro* hyperocclusion models. Using an *in vitro* model, intermittent stretching-induced MS was shown to upregulate the expression of CC chemokine ligand (CCL)2, CCL3 and CCL5 in PDL cells. The expression levels of CCL2 in PDL tissues, its receptor CCR2 in preosteoclasts, and tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells in alveolar bone were significantly upregulated 4–7 days after excessive MS during hyperocclusion in *in vivo* rodent models. Hyperocclusion predominantly induced CCL2 expression in PDL tissues and promoted chemotaxis and osteoclastogenesis, leading to MS-dependent alveolar bone destruction during occlusal traumatism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、補綴系歯学

キーワード：ケモカイン・咬合性外傷・メカニカルストレス・CCL2・CCL3・CCL5、
歯槽骨吸収、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周組織の恒常的な維持には適度な強さの咬合力の付与が不可欠であることが知られている。一方、過剰な咬合によるメカニカルストレスは歯の動揺や歯槽骨の吸収を誘発し、逆に過小の場合、歯根膜組織の廃用性萎縮を引き起こすことが既に知られている。咬合性外傷は過剰な咬合力により誘発され、健全な歯周組織においては動揺度の増加を招くものの付着組織の消失は引き起こさない。しかしながら、炎症を起こした歯周組織では咬合性外傷は根尖側方向により深く早く炎症が拡大し、より多くの歯槽骨を吸収・消失させる。

現在までに、矯正治療における歯の移動を行う際に負荷されたメカニカルストレスにより歯槽骨の圧迫側においては骨吸収、牽引側では骨添加が生じ、骨リモデリングにより歯の移動が行われることが多く報告されている。これらの矯正による歯の移動には歯周組織におけるケモカインの発現が伴うことが知られているが、過剰咬合におけるケモカインの発現、特に破骨細胞形成に関連する分子については全く明らかになっていない。そこで、本研究ではこの *in vivo* 過剰咬合モデルラット及びマウスの作成の確立及これらを用いた過剰なメカニカルストレスによる顎骨代謝、特に骨吸収に関連のケモカイン関与を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

過剰な咬合力によるメカニカルストレスに対する顎骨吸収に関与するケモカインの動態を特定して咬合性外傷を生化学的側面から解析して、最終的には臨床における顎骨吸収抑制のための方法の一つの応用へ結びつけることを目的とする。

3. 研究方法

①齧歯類の上顎大白歯咬合面にワイヤーを接着し、早期接触による咬合性外傷モデルを作成し、これらの条件について確立した。中でも、顎骨の形態及び免疫染色に関しては顎骨リモデリングに関連する調節因子、特に歯槽骨の吸収促進因子を探索した。

②ヒト抜去歯より単離した歯根膜細胞に過剰な伸展機械的刺激を与えた *in vitro* モデルを確立し、*in vivo* 咬合性外傷モデルマウスで明らかになった顎骨吸収促進因子の発現と変化及びこの下流シグナル伝達について解析した。

③ジャクソンラボよりケモカイン及びその受容体 KO マウスを・購入してこれらのマウスを用いて *in vivo* と *in vitro* 過剰咬合モデルマウスを作成し野生型と比較して解析を行った。

4. 研究成果

1)咬合性外傷モデルラット用いた解析

In vivo 咬合性外傷モデルラットを作成し、最長7日間過剰咬合によるメカニカルストレス(MS)を与え、経時的に顎骨標本を採取した。

各々の組織切片を用いて①HE 染色による歯根膜腔と骨性状観察②TRAP 染色による破骨細胞の出現の確認③免疫染色法による骨吸収因子の発現について局在性も含め検討を行った。外傷モデルラットの臼歯部歯根分岐部と根尖部の歯根側周囲にケモカイン特に CCL2 (MCP-1) 陽性細胞が認められた。同時にその周囲の歯根膜組織の歯槽骨側には TRAP 陽性細胞が出現していた。これらの発現はメカニカルストレス (MS) 刺激後 4 日目までに最大に達し、その後減少した。以上より、歯牙への過剰咬合による MS は刺激部位周囲の歯根膜細胞にケモカイン、特に CCL2 発現を上昇させ、破骨前駆細胞の遊走やリクルートを促進し外傷性の歯槽骨吸収を誘導することが示唆された。

2) ヒト歯根膜細胞の伸展刺激による解析

ヒト歯根膜細胞に持続的伸展刺激を与える *in vitro* 咬合性外傷モデルを用いて過剰咬合による MS に対する顎骨吸収時のケモカインの動態について検討した。間欠的な伸展刺激による MS を与えた場合、ヒト歯根膜細胞においても、ケモカインの発現上昇が認められた。中でも、破骨細胞形成に関連する CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP- α) 及び CCL5 (RANTES) の mRNA の刺激時間依存性の増加が認められた。さらに、これらのケモカインのタンパク質の発現を Western blot 法と ELISA 法を用いて調べた結果、すべて刺激依存性の発現上昇が認められたが、特に CCL2 の発現及び分泌量が増加することが明らかになった。以上のことより間欠的な過剰なメカニカルはヒト及びラット歯根膜細胞に破骨細胞形成に関連しているケモカイン類、特に CCL2 の発現を増加させ、破骨前駆細胞の遊走やリクルートを促進し、非炎症性の歯槽骨吸収を誘導することが示唆された。従って、歯根膜組織での過剰咬合によるメカニカル

ストレスによる CCL2 の発現が咬合性外傷の歯槽骨吸収の誘発要因の 1 つと考えられた。

3) CCL2 シグナル欠損マウスを用いた解析

過剰咬合による MS で発現が最も顕著であった CCL2 の遺伝子欠損マウス (CCL2 (-/-)) とその受容体欠損マウス (CCR2 (-/-)) を用い、*in vivo* 及び *in vitro* 過剰咬合モデルを作成し、野生型マウスと比較した。野生型マウスに過剰咬合による MS を与えると歯槽骨において TRAP 陽性細胞が激時間依存性に増加すると共に、歯根膜組織に CCL2 と CCL3 の発現、特に CCL2 の発現が有意に増加した。一方、CCL2 (-/-) と CCR2 (-/-) マウスの歯槽骨では、MS 刺激がない状態にも関わらず、既に TRAP 陽性細胞の発現がわずかに認められた。さらに、野生型と比較すると、歯根膜組織に CCL3 の発現が補償的に上昇していた。これら CCL2 シグナル欠損マウスにおいても TRAP 陽性多核細胞と CCL3 の発現は共に刺激依存性に増加した。以上の結果より CCL2 は過剰なメカニカル刺激依存性に発現し TRAP 陽性細胞の誘導に関連することが解った。さらに、CCL2 シグナル欠損により CCL3 がこの働きを補償的に担うことより、過剰咬合性メカニカルストレスにより CCL2 と CCL3 は協調して咬合性外傷を誘発することが示唆された。

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 2 件)

- 1) Goto-T K, Kajiya H*, Nemoto T, Tsutumi T, Tsuzuki T, Sato H, Okabe K (2011) Hyperocclusion stimulated osteoclastogenesis via CCL2 expression. *J Dent Res* 90:793-798 (査読有)
- 2) Kajiya H*, Okamoto F, Nemoto T, Kimachi K, Goto-T K, Nakayana S, Okabe K (2010) RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. *Cell Calcium* 48:260-269. (査読有)

〔学会発表〕（計2件）

後藤加寿子、咬合性外傷モデルにおける歯槽骨吸収とケモカインの動態、第27回日本骨代謝学会学術集会、2009年7月24日、大阪国際会議場

後藤加寿子、Hyper-occlusion Stimulated Osteoclast Recruitment Through Chemokines Expression、第33回アメリカ骨代謝学会（ASBMR）、2010年10月17日、カナダ（トロント）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 加寿子 (GOTO-T KAZUKO)

福岡医療短期大学・歯科衛生学科・准教授

研究者番号：60389418

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：