

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 3 月 27 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21792106

研究課題名（和文） 骨のカップリング機構を応用した

薬理学的歯の移動のコントロール

研究課題名（英文） A control of tooth movement by pharmacologic agent using the coupling mechanism on bone.

研究代表者 田淵 雅子

(TABUCHI MASAKO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：30418925

研究成果の概要（和文）：

本研究では、破骨細胞活性の特異的抑制剤であるリベロマイシンAを用いて、薬理的な歯の移動のコントロールが可能であるか検討を行った。また、このリベロマイシンAとビスホスホネートを用いてOPG遺伝子欠損（OPG -/-）マウスにおける破骨細胞の亢進を抑制した場合の骨芽細胞への影響について検討した。その結果、リベロマイシンAにおいて、破骨細胞の活性を調整することにより、歯の移動をコントロールすることが可能となり、また、骨芽細胞の活性にも影響があることが示唆された。これらのことから、破骨細胞から骨芽細胞への何らかのシグナルがある可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, Reveromycin A (RM-A) was administered to compare and evaluate bone turnover and response of the surrounding bony tissue including osteoblasts. The ability of RM-A to control tooth movement was evaluated. Reveromycin A administration in OPG -/- mice inhibited bone resorption and normalized bone formation. As a result, normal bone turnover was obtained. Moreover, by inhibiting the promoted osteoclastic activity of OPG-/- mice using reveromycin A, excessive osteoblast activity was also inhibited. It is suggested that osteoblast activity was inhibited because some negative factors from osteoclasts to osteoblasts functioned after inhibition of osteoclast activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究経過としては、平成13年より、破骨細胞の活性が亢進しているOPG遺伝子欠損マウスに部分精製の骨形成因子（BMPs）を移植し、形成された新生骨の観察を行った。また、破骨細胞の活性を抑制する薬剤の一つであるビスホスホネートを、OPG遺伝子欠損マウスに投与することによる新生骨形成の影響についても実験してきた。その結果、骨吸収関連蛋白質や薬剤の投与によって骨代謝のコントロールが可能であるという結果を得ることができた。また、新生骨形成量と新生骨誘導の代謝回転を決定する因子として破骨細胞が非常に重要な関わりを持っていることが示唆された。

一般的に、歯科矯正治療において、『固定』の概念は非常に重要であり、移動が必要な歯だけではなく、移動してはいけない歯までもが動いてしまうことは少なくない。近年、絶対的な固定源として、スケルタルアンカレッジが用いられるようになってきた。このスケルタルアンカレッジの発展は、確実な固定源の確保から、治療目標の高度化や治療期間の短縮など、飛躍的に矯正臨床の技術向上につながっている。しかし、スケルタルアンカレッジの最大の欠点として、外科的侵襲を避けることができないのが現状である。そこで、極力外科的侵襲を排除しながら、確実な固定源の確保がおこなえる方法を発案し、本研究の発想に至った。

そこで、上記の研究結果より、骨代謝に重要な関わりを持っていると考えられる破骨細胞に注目し、破骨細胞の活性を抑制させることで、骨代謝自体をコントロールし、歯の移動量や移動速度ならびに移動方向が制

御可能になるのではないかと考え、矯正学的歯の移動時における骨代謝の解明ならびに、骨代謝のコントロールによる歯の移動実験を行うこととした。平成18年度から20年度までの間、科学研究費（若手B）の補助を受け、ビスホスホネートを用いた歯の移動実験を行ってきた。その結果、ビスホスホネートを用いることによって、歯の移動を制御できることを確認した。

2. 研究の目的

上記の結果から、ビスホスホネートを用いることによって、歯の移動を制御できることを確認したが、ビスホスホネートは、我々の過去の実験から骨基質に長期にわたり沈着してしまう欠点が考えられ、一度骨組織に沈着させると、再び移動させたいときに困難になってしまうと考えられる。現実的に、歯科臨床においては、同一歯においても、固定しておきたい時には歯の移動を抑制し、その後移動させたいときには歯の移動を促進させることが必要である。そこで、本研究では、上記の研究に引き続き、近年、破骨細胞のみに特異的に作用し、骨基質に沈着せず、薬効の期間のみ、活性化した破骨細胞だけに特異的に作用するという利点を備えた、破骨細胞活性の抑制剤であるリベロマイシンAに着目して、それを実験的歯の移動のツールとして用いることを本研究の目的とした。

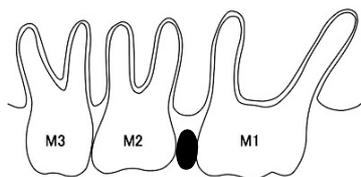
さらに、現在、骨芽細胞から破骨細胞への調節機構は解明されているのに対し、破骨細胞から骨芽細胞への調節機構に関しては明らかとなっていない。そこで我々は、破骨細胞前駆細胞と成熟破骨細胞に対して選択的に働き、それらの細胞をアポトーシスさせ、破骨細胞骨格の破壊ならびに骨吸収機能を

抑制する作用を持つビスホスホネートとリベロマイシンAをOPG^{-/-}マウスに投与し、破骨細胞の亢進を抑制した場合の骨組織の反応と、骨芽細胞への影響について検討することで、破骨細胞から骨芽細胞への何らかのシグナルが存在する可能性について確認することを本実験の目的とした。

2. 研究の方法

(1) 動物および試薬

本研究の実験動物には、遺伝子的にOPG遺伝子を欠損させ、生後8週齢の雄性のOPG^{-/-}マウスを用いた。さらにこのマウスは、破骨細胞の活性が著しく亢進しているため高回転型骨粗鬆症や歯周病患者のような歯周組織が脆弱した状態のモデルとして用いた。また、対照群としては、WTマウス(C57BL/6J)を使用した。試薬は、ビスホスホネート(アレンドロネート (Teijin Pharma, Tokyo, Japan)) とリベロマイシンA (ReveromycinA 3Na salt) を用いた。歯の実験的移動は、上顎左側第1臼歯(M1)、第2臼歯(M2)間に矯正用エラスティック(3M Unitek, Tokyo, Japan)を挿入しM1の矯正学的移動実験を行った(図1)。



(図1)

(2) 薬剤の投与

8週齢のOPG^{-/-}マウスならびにWTマウスに、ビスホスホネート(1.25mg/kg of weight)をWaldo法施術5日前より1日に1回腹腔内投与した。また、RM-A(15mg/kg of weight)はWaldo法施術3日前より1日に2回腹腔内投与し、対照群には同量の生理食塩水を投与

した。

(3) マイクロCT撮影

歯の実験的移動2時間後、12時間後、1日後、3日後に上顎骨を採取し、マイクロCTにて検体を撮影した。その後、移動距離計測を解析ソフトで行った。

(4) 病理組織学的観察

上顎骨を歯の実験的非移動時(0日)、実験的移動2時間後、12時間後、1日後、3日後に摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。次に、10%EDTA(pH7.2)で約4週間、4°Cの条件下で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋を行い、5μmの水平断方向の連続組織切片を作製した。組織観察部位は根分岐部から根尖までを3等分した根分岐部より1/3部位を観察した。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色(H-E染色)、TRAP(酒石酸耐性酸ホスファターゼ)染色をACID PHOSPHATASE, LEUKOCYTE KIT(SIGMA Diagnostic, St. Louis, MO)を用いて行い、TRAP染色を施した後の破骨細胞数計測に関しては、上顎第一臼歯遠心口蓋根(M1DP)周囲の歯槽骨表面の破骨細胞数(N.Oc/BS)を計測した。さらに局所における骨芽細胞の活性を評価するために、Runx2免疫組織染色を施行した。免疫組織染色における濃度の判定は、Wuらの方法を参考にし、免疫抗体染色を行った組織切片をコンピューター上でPHOTOSHOPを用い、グレースケールに変換した後、免疫抗体染色に陽性であった歯根膜の範囲(P)と陰性であった歯根膜の範囲(N)との256階調での濃度の比をN/Pで表した。免疫組織染色における面積の判定は、Kimmel and Jeeらの方法に従い、グリットを用いてpoint-hit法にて計測し面積比をP/Nで表した。さらに、H-E染色を施した後、上顎第一

臼歯遠心口蓋根 (M1DP) 周囲の歯槽骨表面の骨芽細胞を測定し、その骨芽細胞面 (Ob. S/BS) を骨形成パラメーターとした。

(5) 血清骨代謝マーカーの測定

血清アルカリフォスファターゼ活性と血中 TRAP 濃度の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞活性をビスホスホネートにて抑制し、骨代謝回転および骨芽細胞に及ぼす影響を、歯周組織の変化を通して観察・検討を行い、以下の結果を得た。

① OPG-/-マウスと WT マウスについて

- 1) OPG-/-マウス群は WT マウス群に比較し、歯の移動距離が大きかった。
- 2) OPG-/-マウス群は WT マウス群に比較し、歯の矯正力というメカニカルストレスによる歯槽骨吸収が著しかった。
- 3) OPG-/-マウス群は WT マウス群に比較し、根周囲歯槽骨における破骨細胞数が多かった。(表 1)
- 4) OPG-/-マウス群は WT マウス群に比較し、歯の矯正力というメカニカルストレスに対する骨芽細胞の反応が早く、強かった。(図 2)
- 5) 骨形成パラメーターは、OPG-/-マウス群が WT マウス群に比較し亢進していた。

② OPG-/-マウスへのビスホスホネート投与について

- 1) BP 投与群における歯の移動距離は非投与群と比較し、小さかった。
- 2) BP 投与によって、歯の矯正力というメカニカルストレスによる歯槽骨吸収が抑制された。
- 3) BP 投与群における根周囲歯槽骨に

おける破骨細胞数は非投与群と比較し、減少していた。(表 1)

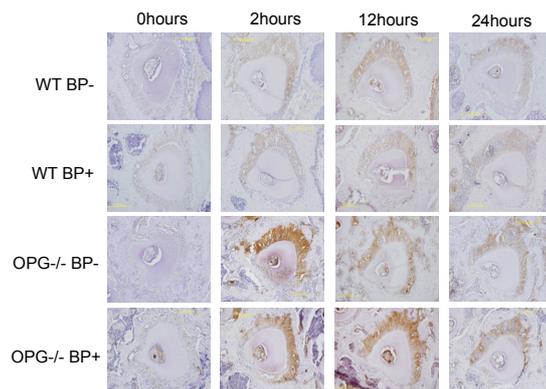
4) BP 投与群における歯の矯正力というメカニカルストレスに対する骨芽細胞の反応は、非投与群と比較し遅延した。(図 2)

5) BP 投与によって、骨形成パラメーターは非投与群と比較し減少していた。

OC.N/mm	-5Days	0Days	1Day	3Days
WT BP-	0.23 ± 0.14	0.08 ± 0.08	0.44 ± 0.18	1.86 ± 0.34
WT BP+	0.28 ± 0.16	0.18 ± 0.18	0.36 ± 0.18	1.26 ± 0.37
OPG-/- BP-	2.27 ± 0.21	2.33 ± 0.88	3.58 ± 0.53	9.61 ± 0.75
OPG-/- BP+	2.27 ± 0.24	0.17 ± 0.17	0.57 ± 0.34	2.63 ± 0.61

Significance markers: N.S. (not significant), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001). Brackets indicate comparisons between groups at the same time point and between OPG-/- BP- and OPG-/- BP+ groups at 1Day and 3Days.

(表 1) (N.S.: not significant. * : p < 0.05; ** : p < 0.01; *** : p < 0.001)



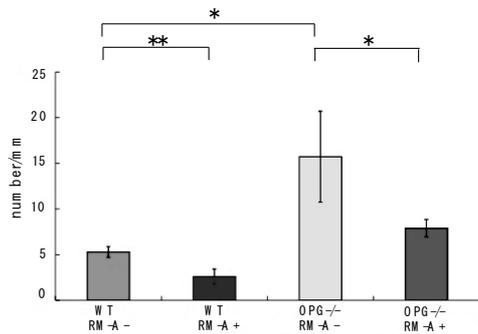
(図 2) Runx2 免疫抗体組織染色所見 (M1 遠心口蓋根)

(2) 破骨細胞活性をリベロマイシン A にて抑制し、骨代謝回転および骨芽細胞に及ぼす影響を、歯周組織の変化を通して観察・検討を行い、以下の結果を得た。

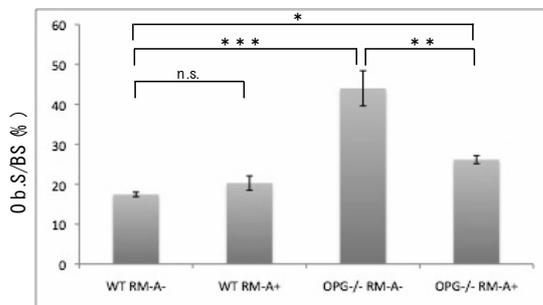
① OPG-/-マウスへのリベロマイシン A 投与について

- 1) リベロマイシン A 投与群における歯の移動距離は非投与群と比較し有意に減少し、WT 群の移動距離に近似していた。

- 2) リベロマイシン A 投与によって、歯の矯正力というメカニカルストレスによる歯槽骨吸収が抑制され、骨梁が維持されていた。
- 3) リベロマイシン A 投与群における根周囲歯槽骨の破骨細胞数は非投与群と比較し、減少していた。(図 3)
- 4) リベロマイシン A 投与群における根周囲歯槽骨の骨形成パラメーター(骨芽細胞面)は非投与群と比較し、減少していた。(図 4)
- 5) リベロマイシン A 投与群における歯の矯正力というメカニカルストレスに対する骨芽細胞の反応(Runx2)は、非投与群と比較し遅延し、WT 群の正常な反応に近似した。(図 5)
- 6) リベロマイシン A 投与によって、血中 TRAP、血清 ALP は非投与群と比較し減少していた。

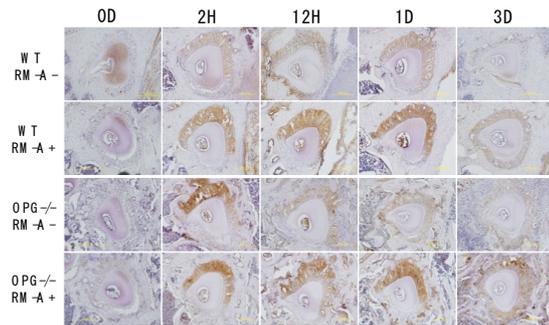


(図 3) 破骨細胞数 (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$)



(図 4) 骨形成パラメーター(骨芽細胞面)

の変動 (N.S.:not significant. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$)



(図 5) Runx2 免疫抗体組織染色所見 (M1 遠心口蓋根)

以上の結果より、高回転型骨粗鬆症や歯周病患者のような歯周組織が脆弱した状態において歯の矯正力を加えた場合、根周囲歯槽骨の著しい骨吸収によって著しい歯の移動がおこったが、ビスホスホネートと同様に、リベロマイシン A 投与により亢進している破骨細胞活性を抑制させた結果、根周囲歯槽骨は維持され、破骨細胞活性のみならず骨芽細胞活性も抑制され、骨代謝が正常化されたことが示された。これらのことから、高回転型骨粗鬆症や歯周病のような歯周組織が脆弱した患者の歯科矯正治療を行う際、ビスホスホネートのみならず、リベロマイシン A を投与することは、全身的のみならず、局所的な骨代謝をコントロールすることが可能であり、著明な歯槽骨吸収を予防しながら歯の移動ができる有効な薬剤であることが示唆された。すなわち、このリベロマイシン A には、ビスホスホネートとは異なり、骨に長期間蓄積するという副作用を持ち合わせていないため、矯正治療時に、薬理的に移動を抑制した歯を再度、動かすことも十分可能となると考えられ、現在の矯正臨床の既成概念とは異なった新たな矯正治療の確立につながると思われる。

さらに、破骨細胞から骨芽細胞へのなんらかの負のシグナルが存在する可能性が示唆

され、今後この因子について明らかにすることは、代謝のメカニズムや、様々な骨疾患の治療法の解明に貢献するものではないかと推察している。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 田中美由紀、宮澤 健、田渕雅子、藪本貴洋、門田愛実、吉廻 守、山根千里、川谷 誠、長田裕之、後藤滋巳. 持続的矯正力による歯の移動に対する破骨細胞特異的薬剤(リベロマイシンA)の効果. 第70回日本矯正歯科学会大会. 2011.9.17-20. 名古屋
- (2) 藪本貴洋、宮澤健、田渕雅子、庄司さつき、田中美由紀、門田愛実、川谷誠、長田裕之、後藤滋巳. 破骨細胞特異的薬剤(Reveromycin A)が実験歯の移動に及ぼす影響. 第69回日本矯正歯科学会大会. 2010.9.27-29. 横浜
- (3) Masako Tabuchi, Satsuki Shoji, Ken Miyazawa, Takahiro Yabumoto, Miyuki Tanaka, Shigemi Goto. Bisphosphonate treatment decreases the loss of alveolar bone during experimental tooth movement in OPG -/-mice. 7th International Orthodontic Congress. 2010.2.6-9. Sydney, Australia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田渕 雅子 (TABUCHI MASAKO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：30418925