

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17154

研究課題名（和文）歯根膜線維の力の伝達特性からアプローチする歯槽骨リモデリング

研究課題名（英文）Analyses of the mechanism underlying alveolar bone remodeling from the viewpoint of mechanobiology of the periodontal ligament

研究代表者

小野 岳人 (Ono, Takehito)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40772471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：矯正学的歯の移動では、歯根周囲の歯槽骨で骨リモデリングが起こる。歯根と歯槽骨の間には歯根膜が介在するが、この線維性結合組織の機能には不明な点が多い。本研究では、矯正学的歯の移動における歯根膜の機能の解析に取り組んだ。その結果、矯正力の付加に伴いIL-6の発現が上昇することを見出した。阻害剤や抗体を用いたloss-of-functionの実験により、IL-6は破骨細胞の形成を促進することで歯の移動を促進することが示された。さらに、IL-6は矯正に伴う疼痛も誘導することが見出された。以上より、矯正歯科治療時の歯の移動と疼痛発生においてIL-6は重要な役割を果たす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

本研究により、矯正歯科治療における歯の移動と疼痛発生のメカニズムの一端が示された。矯正歯科治療においては、矯正力により移動させる歯とは別の歯には反力が発生する。この力により移動すべきでない歯が移動しないよう固定する必要がある。矯正時に産生されるIL-6が歯の移動を惹起することから、薬物の局所投与によりこれを阻害することで固定の強化が可能になると考えられる。同時に、固定歯に生じる疼痛も抑制できる。矯正治療における歯の移動はもっぱら矯正装置の設計によるフォースシステムに依存しているが、薬物療法の併用により矯正歯科治療の効率化が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In orthodontic tooth movement (OTM), bone remodeling occurs in the alveolar bone surrounding the tooth roots. The roots are connected to the alveolar bone by the periodontal ligament (PDL), functions of which during OTM remains largely elusive. This study aimed to elucidate the functions of the PDL in OTM. IL-6 expression was found to be increased upon the application of orthodontic force. Loss-of-function experiments using inhibitors or antibodies demonstrated that IL-6 promotes tooth movement by enhancing osteoclast formation on the alveolar bone. Furthermore, IL-6 was found to induce orthodontic pain. Thus, IL-6 plays a significant role in both tooth movement and pain induction during orthodontic treatment.

研究分野：骨免疫学

キーワード：歯科矯正学 骨免疫学 運動器科学 骨芽細胞 破骨細胞 骨細胞 歯根膜細胞

## 1. 研究開始当初の背景

「歯は力を加えられた方に移動する」ことは紀元前には既に発見されている。また、矯正力により圧迫側では歯槽骨の吸収が、牽引側では形成がおこることが19世紀末には見出され、今日まで浸透している (**Green, Dent. Nursing 2014**)。矯正学的歯の移動における歯槽骨の吸収時には、体の他の部位の場合と同様に、骨面に破骨細胞が形成される。破骨細胞の分化には、骨細胞により産生される **receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)** が重要であることが分かっている (**Shoji-Matsunaga, Sci. Rep., 2017**)。しかし、矯正学的歯の移動の過程で **RANKL** が誘導され破骨細胞分化が誘導されるメカニズムは不明である。

四肢や体幹では運動により力が加わると、骨の形成は促進、吸収は抑制されるのが一般的であり、「力が加わることによる骨吸収」は歯槽骨特有の例外的な現象である。四肢や体幹では運動負荷は直接骨に伝達される一方、矯正力は歯根膜線維を介して間接的に歯槽骨に伝達される。このことから、申請者は歯根膜線維の存在が骨代謝制御の違いにつながると考えた。

歯根膜線維は、歯根膜線維芽細胞により産生される線維性結合組織で歯根と歯槽骨をつないでいる。線維には配向が異なる複数の線維群が存在し、咬合力に対するクッションとして機能する。また、辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎においては免疫応答の場として機能する。このように、歯根膜の重要性は現象レベルではよく知られていることであるが、細胞メカニズムや分子メカニズムの詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、矯正学的歯の移動における歯槽骨リモデリングの特殊性の解明である。申請者は、体の他の部位と異なり顎骨には歯根膜が存在することに着目し、特に歯根膜の機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 矯正学的歯の移動モデルマウスにおける歯根膜の解析

矯正学的歯の移動時に歯根膜に起こる変化を解析するために、矯正学的歯の移動モデルマウスの歯根膜を組織学的に解析した。通法 (**Shoji-Matsunaga, Sci. Rep., 2017**) に従いマウスに歯の移動を誘導した後に顎骨を摘出しパラフィン切片を作成した。ピクロシリウスレッド染色法により歯根膜の有無や配向を解析した。また、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (**TRAP**) 染色法により破骨細胞を染色し、骨吸収部位の歯根膜を評価した。

### (2) 歯根膜消失モデルマウスの作出

歯根膜腔に薬物を投与する系を確立した。この方法により、歯根膜特異的にジフテリア毒素受容体を発現するマウス (**PDL-DTR** マウス) に対してジフテリア毒素 **A (DTA)** を投与した。投与部位における歯根膜線維の消失をピクロシリウスレッド染色法により評価した。さらに、**TRAP** 染色法により歯根膜線維の消失部位と骨吸収部位の位置関係を解析した。

**PDL-DTR** マウスに対して **DTA** を投与したのちに矯正力を付加し、マイクロ **CT** により歯の移動量を評価した。

### (3) 歯根膜由来の骨代謝制御因子の探索

矯正力の付加に伴い歯根膜で起こる変化を解析するために、矯正力を付加したマウスの歯根膜における遺伝子発現を **qRT-PCR** 法で解析し、解析の対象とする候補分子を抽出した。実際の矯正歯科治療においては歯根膜に炎症が惹起されることから、特に炎症性サイトカインに注目して解析を行った。また、免疫組織学的解析により、歯根膜に存在する細胞内のシグナルの解析を行った。

### (4) 歯根膜由来分子による破骨細胞分化制御の検討

解析対象の歯根膜由来分子が破骨細胞分化に与える影響を解析するために、培養細胞を用いた検討を行った。骨髄細胞から純度の高い破骨細胞前駆細胞を得るために、セルソーティング法により **CD11** 陽性細胞をポジティブセレクションした。この細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (**M-CSF**) と **receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)** を用いて破骨細胞に分化させた。ここに歯根膜由来分子を添加し、破骨細胞分化に与える影響を解析した。**TRAP** 陽性多核巨細胞数や破骨細胞分化にかかわる遺伝子発現を解析した。

### (5) 歯根膜注射法による歯根膜由来分子の阻害実験

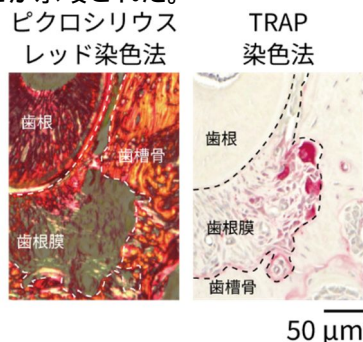
歯根膜注射法により、歯根膜由来分子やその下流シグナルの阻害を行った。この状態で矯正力を付加した。マイクロ **CT** により歯の移動量を、組織染色法により破骨細胞数を計測した。さらに、解析対象の歯根膜由来分子が矯正学的歯の移動における骨代謝だけでなく疼痛発生に関与する可能性も検証した。ビデオカメラを用いた行動観察により疼痛関連行動を評価した。矯正学

の歯の移動に際しての疼痛発現の制御機構を明らかにするために、三叉神経節を免疫組織学的に解析した。また、神経炎症や疼痛にかかわる遺伝子の発現を **qRT-PCR** 法により解析した。

#### 4. 研究成果

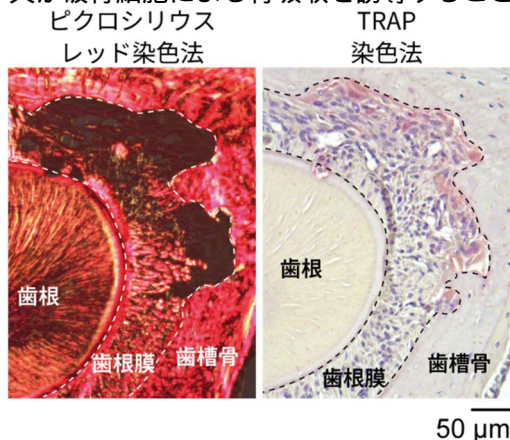
##### (1) 歯の移動モデルマウスにおける歯根膜の解析

矯正学的歯の移動モデルマウスにおいて、歯槽骨吸収が起きている部位では歯根膜線維が消失していることが確認された。このことから、歯根膜線維が破骨細胞の形成の制御にかかわることが示唆された。



##### (2) 歯根膜消失モデルマウスの作出

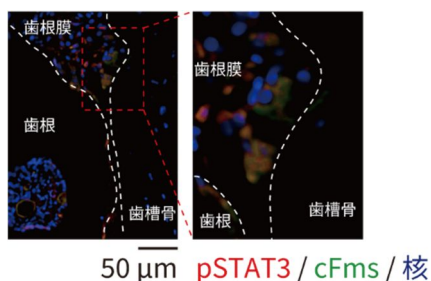
**PDL-DTR** マウスに **DTA** を投与したところ、歯根膜線維の消失が確認できた。この部位では破骨細胞の形成が認められた。そこで、このマウスに対して矯正力を付加したところ、歯根膜消失個体では対象群の個体と比べて歯の移動量が大きい傾向が見出された。以上より、歯根膜の消失が破骨細胞による骨吸収を誘導することが示された。



##### (3) 歯根膜由来の骨代謝制御因子の探索

遺伝子発現の網羅解析の公共データベースより力学刺激を付加した培養ヒト歯根膜細胞の遺伝子発現プロファイルを取得し、炎症性サイトカインの発現を解析した。その結果、力学刺激の付加による **IL-6** ファミリーサイトカインの上昇を認めた。矯正学的歯の移動モデルマウスの歯根膜における同ファミリー分子の遺伝子発現を解析したところ、矯正力付加に伴う **IL6** 遺伝子の発現上昇が認められた。このことから、**IL-6** およびその下流シグナルを解析の標的に設定した。

**IL-6** ファミリーサイトカインは共通受容体の **gp130** を介してシグナル伝達を行うことが知られており、その下流では **STAT3** がリン酸化される。そこで、矯正学的歯の移動マウスの歯根膜中の **STAT3** の活性をリン酸化を指標に評価した。その結果、矯正学的歯の移動に伴い **cFms** 陽性の破骨細胞前駆細胞でリン酸化 **STAT3 (pSTAT3)** が検出された。以上より、矯正学的歯の移動時に生じた **IL-6** は破骨細胞分化に影響する可能性が示唆された。



#### (4) 歯根膜由来分子による破骨細胞分化制御の検討

マウスの骨髄細胞からセルソーティング法により **CD11b** 陽性細胞をポジティブセレクションした。これらの細胞を **M-CSF** 存在下で 2 日間培養し、次いで **M-CSF** および **RANKL** 存在下で 4 日間刺激した。2 日間の前培養の期間に **IL-6 / IL-6R $\alpha$**  で刺激した場合、非刺激時と比較してより多くの破骨細胞前駆細胞および成熟破骨細胞が認められた。遺伝子発現解析により、**IL-6** シグナルは破骨細胞前駆細胞の **M-CSF** 受容体や **RANKL** 受容体の発現を上昇させ、生存を促進することが明らかになった。以上より、矯正学的歯の移動において **IL-6** は歯根膜腔の破骨細胞を増加させることで歯槽骨吸収を促進し、歯を移動させると考えられた。

#### (5) 歯根膜注射法による歯根膜由来分子の阻害実験

**IL-6** およびそのシグナルが実際に矯正学的歯の移動を制御する可能性を検証するために、薬物の歯根膜注射による阻害実験を行った。**IL-6** ファミリー分子の共通受容体でシグナル伝達に寄与する **gp130** に対する阻害薬 **SC144** を投与したところ、歯根膜におけるリン酸化 **STAT3** が減少した。これに伴い、破骨細胞の形成が抑制され矯正学的歯の移動量が減少した。

**IL-6** は炎症性疼痛に寄与することから、矯正力付加に伴う疼痛様行動の評価をおこなった。その結果、**SC144** の歯根膜注射により摂食量低下などの疼痛様行動の減少が認められた。そこで、口腔領域の疼痛を受容する三叉神経節を免疫組織学的解析した。同神経節の神経細胞では矯正力付加によってリン酸化 **STAT3** が増加することと **SC144** によりその増加がみられなくなった。さらに、遺伝子発現の解析により、矯正力付加は三叉神経節に *Tnfa* など炎症性サイトカインおよび各種 **TRP** チャネルなどの発現上昇をもたらすことが明らかになった。この炎症性疼痛を示唆する所見は **SC144** の歯根膜注射によって消失した。

同様に、抗 **IL-6** 中和抗体を歯根膜注射し、矯正力付加に伴う歯の移動と疼痛を評価した。その結果、**IL-6** 阻害による歯の移動量の減少と疼痛様行動の減少が認められた。以上より、**IL-6** は **gp130** や **STAT3** を介して矯正歯科治療に伴う歯の移動や疼痛を制御することが示された。

#### (6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

歯科医学に関わる臨床医や研究者の多くは矯正学的歯の移動において歯根膜が何らかの役割を果たすと考えている。網羅解析を通じて歯根膜が様々なサイトカインを産生しうることが明らかになってきたが、矯正学的歯の移動における歯根膜機能の詳細は不明である。本研究によって、矯正力の付加に伴い歯根膜では **IL-6** が産生され、これが破骨細胞の形成を促進しさらには疼痛制御にもかかわることが示された。

**IL-6** は破骨細胞分化の制御にかかわることが多くの研究で示されている。しかし、使用する細胞などの条件の違いから破骨細胞分化の促進と抑制の両方が報告されており、**IL-6** の破骨細胞への影響には不明な点が多かった。特に、骨髄細胞を用いた場合は混入する骨髄間葉系細胞を介した間接的な応答も存在するため実験結果の解釈が困難であった。本研究で純度の高い前駆細胞を用いた検討を行うことにより、**IL-6** の破骨細胞前駆細胞への直接作用を解析することができた。その結果、このサイトカインが **M-CSF** や **RANKL** といった破骨細胞分化に重要なサイトカインに対する応答性を高めることが明らかになった。

矯正歯科治療の臨床において、疼痛コントロールは患者満足度につながる極めて重要な要素であるが、これに関する基礎研究は進んでいなかった。本研究により、矯正学的歯の移動は三叉神経節の神経細胞における **IL-6** シグナルを駆動し、それが炎症性疼痛を惹起することが示された。矯正歯科治療における疼痛制御の基礎研究の基盤となりうる知見を提示することができ、今後、疼痛の治療や予防に関する基礎研究が活発化することが期待される。

#### (7) 今後の展望

本研究によって、**IL-6** が歯の移動を促進することが示された。矯正歯科治療においては、積極的に動かすべき歯だけでなく、動かしてはならない歯も存在する。これらの歯の固定の強化に **IL-6** の阻害が有効である可能性が示唆された。現行の矯正歯科治療では、歯を動かす/動かさない、動かす歯をどう動かすかはもっぱら矯正装置の設計によるフォースシステムに依存しているが、**IL-6** の局所的阻害という薬物療法を併用することで、治療が効率化される症例も存在すると考えられる。

矯正歯科治療に伴う疼痛は、咀嚼が困難となるなど患者の生活に大きく支障をきたす。上記のように **IL-6** を固定歯の局所で阻害することで、その歯における疼痛が軽減されると考えられる。固定には第一大臼歯が頻繁に用いられるが、この歯は咀嚼に最も重要であることから、疼痛が減弱されることにより、矯正歯科治療中の患者の食事摂取が大きく改善すると考えられる。

以上より、本研究は矯正歯科治療における歯の移動と疼痛の制御メカニズムに関して重要な知見を提供し、それらは歯科臨床にも大きく貢献することが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toyama Naomi, Ono Takehito, Ono Takashi, Nakashima Tomoki	4. 巻 684
2. 論文標題 The interleukin-6 signal regulates orthodontic tooth movement and pain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149068 ~ 149068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.09.096	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 Ono Takehito, Denda Ryosuke, Tsukahara Yuta, Nakamura Takashi, Okamoto Kazuo, Takayanagi Hiroshi, Nakashima Tomoki	4. 巻 10
2. 論文標題 Simultaneous augmentation of muscle and bone by locomimeticism through calcium-PGC-1 signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41413-022-00225-w	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 小野 岳人, 中島 友紀	4. 巻 81
2. 論文標題 骨粗鬆症における骨代謝回転	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 58-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小野 岳人, 中島 友紀	4. 巻 38
2. 論文標題 骨のメカノバイオロジー	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 21-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Takehito	4. 巻 158
2. 論文標題 歯科矯正治療における力学刺激と骨リモデリング	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 258 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.22110	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Takehito, Nakashima Tomoki	4. 巻 64
2. 論文標題 Oral bone biology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 8 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Lin, Koike Hiroyuki, Ono Takehito, Hayashi Shinichiro, Kudo Fujimi, Kaneda Atsushi, Kagechika Hiroyuki, Manabe Ichiro, Nakashima Tomoki, Oishi Yumiko	4. 巻 118
2. 論文標題 Identification of a KLF5-dependent program and drug development for skeletal muscle atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2102895118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2102895118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小野 岳人, 中島 友紀	4. 巻 25
2. 論文標題 【フレイル対策;骨と骨格筋からの心身の健康】骨による心身の健康の維持	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FOOD Style 21	6. 最初と最後の頁 34-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 外山 奈緒美 , 小野 岳人 , 小野 卓史 , 中島 友紀
2. 発表標題 IL-6シグナルは矯正歯科治療における歯の動きと痛みを制御する
3. 学会等名 第88回口腔病学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takehito Ono , Naomi Toyama , Takashi Ono , Tomoki Nakashima
2. 発表標題 IL-6 regulates orthodontic tooth movement and pain
3. 学会等名 The 71st Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 外山 奈緒美 , 小野 岳人 , 中島 友紀 , 小野 卓史
2. 発表標題 IL-6シグナルは矯正歯科治療における歯の動きと痛みを制御する
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takehito Ono
2. 発表標題 Augmentation of musculoskeletal tissues by locomimeticism
3. 学会等名 The 19th Bone Biology Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野 岳人
2. 発表標題 骨や筋の強化を介した全身の健康の向上の可能性
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野 岳人
2. 発表標題 骨が心を守るメカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Terashima Asuka, Yin Wengqiang, Okamoto Kazuo, Ono Takehito, Takayanagi Hiroshi
2. 発表標題 Analysis of the mechanism of heterotopic ossification and immune response in fibrodysplasia ossificans progressiva(FOP)
3. 学会等名 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野 岳人, 傳田 良亮, 塚原 悠太, 中村 貴, 岡本 一男, 高柳 広, 中島 友紀
2. 発表標題 運動模倣薬LAMZによる筋と骨の強化
3. 学会等名 第8回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 尹 文強, 寺島 明日香, 岡本 一男, 小野 岳人, 高柳 広
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) における異所性骨化発生メカニズムの解析
3. 学会等名 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野 岳人
2. 発表標題 Osteocyte RANKL and Mechanical Stress
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022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