

## 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25年 6月10日現在

機関番号：30110
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2012
課題番号：22792065
研究課題名（和文）DNAチップを用いたヒト歯周組織から誘導される歯根吸収遺伝子の網羅的解析と同定
（英文）DNA chip analysis and identification of the genes induced in human periodontal ligament to cause tooth root resorption.
研究代表者
岡山 三紀（OKAYAMA MIKI）
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：30382500

研究成果の概要（和文）：メカニカルストレスモデルとして、ヒト歯根膜細胞に遠心力により重力を負荷する実験系を用いて、ID1（転写因子）、EGR1（転写因子）、SGK1（ストレス応答セリン/スレオニンキナーゼ）、DUSP1（ストレス応答非受容体型チロシンキナーゼ）などの強い遺伝子発現上昇が見られた。また、MEKの阻害剤であるU0126添加すると、遺伝子発現上昇が抑制された。遺伝子群はp-ERKによって調節されていることが確認された。メカニカルストレスは歯根膜組織においても、マトリックス分解系と協調して歯周組織の改造および歯根吸収をコントロールしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：ID1 (Inhibitor of DNA binding 1), EGR1 (Early growth response 1), SGK1 (Regulator of G-protein signaling 2) and DUSP1 (Dual specificity phosphatase 1) were upregulated in 2 hours by 7G-loading in human PDL cells. U0126, MEK inhibitor diminished up-regulation and phosphorylation of these genes. Thus, the phosphorylation of ERK had crucial rule in genes induced by mechanical stress. It was also suggested that the mechanical stress controlled remodeling of periodontal tissues and tooth root resorption through extracellular matrix degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3000,000	900,000	3900,000

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

キーワード：メカニカルストレス、歯根膜、歯の移動、歯根吸収

## 1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療における歯の移動は、歯と歯槽骨ならびに歯根膜などの歯周組織に加わる力学的負荷（メカニカルストレス）を、断続的、持続的および間欠的に負荷することに起因す

る。その際、圧迫側では歯槽骨が吸収され、牽引側では歯槽骨が形成される骨のリモデリングが起きている。歯に適切な矯正力を加えた場合、歯槽骨が吸収され、歯根は過度（重

度)に吸収されることはない。しかしながら、過度の矯正力を負荷すると、歯根が吸収されるという問題点も残されている。したがって、矯正歯科治療において、歯根吸収を伴うことなく、より迅速に歯を移動させるためには、歯根吸収を抑制する手段が必要であり、歯根吸収の抑制は良い矯正歯科治療をもたらすものと考えられる。

硬組織の吸収は破骨細胞によって行われる。破骨細胞の硬組織の融解は、硬組織の硬度が高いほど起こりにくいことが知られている。歯周組織の硬度は石灰化度に依存しており、石灰化度を比較すると、エナメル質が97%で圧倒的に高く、骨、セメント質、象牙質は、60~70%で類似している。したがって、破骨細胞による融解では、骨、セメント質、象牙質の三者間に大きな違いが生ずることは無いように思われる。しかしながら実際には、適切な矯正力を加えると、歯槽骨が吸収され歯根は過度に吸収されずに残存する。したがって、矯正力というメカニカルストレスによって、圧迫歯根表側に何らかの因子が誘導され、歯根吸収抑制に働いているように見受けられる。矯正歯科治療において矯正力が負荷される組織には、歯周組織（歯根膜、セメント質、歯肉、歯槽骨）と歯髄がある。この中で歯根膜は、歯周組織への栄養供給を行うと同時に、力学的負荷に対する緩衝材としての役割も担い、さらにメカニカルストレスを感知するセンサーとして機能しているのではないかと考えられている。我々はこれまで、ヒトから採取した歯根膜細胞にメカニカルストレスを負荷し、ストレスに応答するシグナルを検討してきた。その結果、ストレスに応答して、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IGF-I、TGF- $\beta$ 、cyclooxygenase-2 (COX-2)、osteopontin、PTH-Rなどが誘導されることを見いだした（未発表データ）。また、他のグループによ

る歯根膜細胞にメカニカルストレスを負荷した研究でも同様な結果が報告されており、in vivo 実験ではIL-1 $\beta$ 、c-fos、IGF-I、PGE2、TGF- $\beta$ などが、培養細胞実験ではcAMP、NO、Ca<sup>++</sup>、COX-2、osteopontin、type-I collagen、TIMP-1、TIMP-2、Actinなどが誘導されている。したがって、歯周組織、特に歯根膜は、メカニカルストレスを負荷されることで、何らかのシグナルを歯槽骨や歯根表面に伝達し、歯槽骨を吸収させ、歯根を維持させるメカニズムによって、歯の移動をコントロールしているのではないかと思われた。

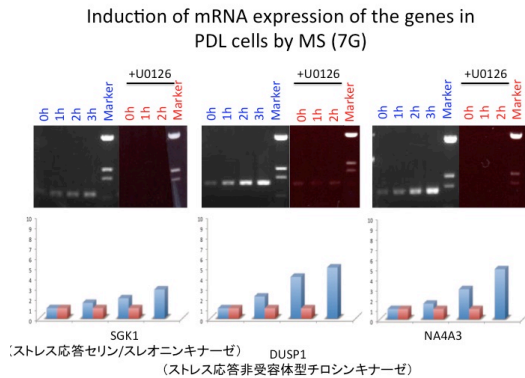
そこで、本研究は、歯根吸収関連因子を矯正治療に応用するために、歯根膜を中心とした歯周・歯髄組織からの歯根吸収シグナルを同定し、その作用メカニズムを解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、メカニカルストレスによって誘導される歯根吸収関連因子を同定し、その機能を解析することである。適切な矯正治療によって歯を移動させると、歯槽骨は吸収されるが、歯根は過度に吸収されることはない。破骨細胞による、骨、セメント質、象牙質の吸収力には大きな違いがないことから、メカニカルストレスが歯周組織（歯根膜、セメント質）や歯髄に負荷される際に、歯根吸収をコントロールするメカニズムが働き、歯周組織や歯髄から何らかの吸収関連因子が誘導されている可能性がある。本研究では、この歯根吸収関連因子をヒト歯周組織・歯髄組織を用いて同定・単離し、その機能を解析する。さらに、この吸収因子を矯正歯科治療に応用するための動物を用いた基礎実験を行う。

## 3. 研究の方法





#### ・考察および結論

DNA マクロアレイ解析を行ったところ、メカニカルストレスによって ID1 (転写因子)、EGR1 (転写因子)、SGK1 (ストレス応答セリン/スレオニンキナーゼ)、DUSP1 (ストレス応答非受容体型チロシンキナーゼ) などの強い遺伝子発現上昇が見られ、PCR 法においても同様の結果であった。

また、抜去歯根膜組織でもこれらの遺伝子群の恒常的な発現がみられ、さらに骨基質分解に関与する MMP-9 やアグリカンの分解および組織改造に関与する MMP-19 などのマトリックスメタロプロテアーゼの発現も、培養 hPDL cells に比較して顕著に認められた。

メカニカルストレスは歯根膜細胞において、転写因子群 (ID1, EGR1) やリン酸のシグナル伝達に関与する遺伝子群 (SGK1, DUSP1) など、様々な遺伝子を誘導し、圧迫側歯根膜に関連する遺伝子発現を制御していると考えられた。

したがって、メカニカルストレスは歯根膜組織においても、マトリックス分解系と協調して歯周組織の改造および歯根吸収をコントロールしてい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 5 件)

1. Ito M, Arakawa T, Okayama M, Shitara A, Mizoguchi I, Takuma T. Gravity loading induces ATP release and ERK phosphorylation in human periodontal ligament cells. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. (in pres) (査読有り)

2. Masaru Murata, Toshiyuki Akazawa, Toshihiro Yuasa, Miki Okayama, Junichi Tazaki, Takao Hanawa, Makoto Arisue, Itaru Mizoguchi. Quantitative analysis on

orientation of human bone integrated with midpalatal implant by micro X-ray diffractometer. *Applied Surface Science*. Volume 262, (1 December 2012) Pages 222-226. (査読有り)

3. Miki Okayama, Akiko Shitara, Toshiya Arakawa, Yoshifumi Tajima, Itaru Mizoguchi, Taishin Takuma. SNARE proteins are not excessive for the formation of post-Golgi SNARE complexes in HeLa cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012. April. 03. (査読有り)

4. Toshiya Arakawa, Toru Ohta, Yoshihiro Abiko, Miki Okayama, Itaru Mizoguchi and Taishin Takuma. A PCR-based method for constructing a linear vector with site-specific DNA methylation. *Analytical Biochemistry*. 416 (2011) 211-217 (査読有り)

5. 村井茂、齋藤貞政、湯浅壽大、水上和博、鳥谷奈保子、岡山三紀、飯嶋雅弘、溝口到. 唇顎口蓋裂患者のアンケート調査. *北海道医療大学歯学雑誌* Vol. 29, NO. 1(91-99), JUNE, 2010 (査読有り)

〔学会発表〕(計 16 件)

ポスター発表

1. 荒川 俊哉, 岡山三紀, 設楽 彰子, 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の合成およびシグナル経路の解析. 第 85 回日本生化学会. 2012. 12. 14 ~16 福岡市

2. 岡山三紀, 荒川 俊哉, 池田 和貴, 田隈 泰信, 溝口 到. ヒト歯根膜細胞におけるリゾホスファチジン酸シグナルの解析. 第 71 回日本矯正歯科学会学術大会. 2012. 10. 17~20 岩手県 盛岡市.

3. 荒川 俊哉, 岡山三紀, 小原 伸子, 設楽 彰子, 入江 一元, 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. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会. 2012. 9. 14~16 福島県 郡山市.

4. 岡山三紀, 村田 勝, 田崎 純一, 溝口到. 口蓋インプラントを用いた上顎前突非対称抜歯症例. 第 70 回日本矯正歯科学会学術大会 2011. 10. 17~20 名古屋国際会議場.

5. 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学術大会.  
2011. 10. 17~20 名古屋国際会議場.

6. 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における VAMP 4 の重要性. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会. 2011. 9. 30~10. 2 岐阜県 長良川国際会議場.

7. 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. 第 84 回日本生化学会 2011. 9. 21~24 京都国際会議場.

8. T. ARAKAWA, M. OKAYAMA, Y. ABIKO, I. MIZOGUCHI, A. SHITARA, and T. TAKUMA. Gene expression by mechanical stress in human periodontal ligament cells. IADR/AADR/CADR 89th General Session and Exhibition. March 16-19, 2011 San Diego, CA USA.

9. 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. 12. 7~10 神戸市.

10. 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. 12. 7~10 神戸市.

11. 岡山 三紀、村田 勝、田崎 純一、溝口 到. 口蓋インプラントを用いて上下顎歯列弓遠心移動を行った下顎前突症例. 第 69 回日本矯正歯科学会学術大会. 2010. 9. 27~29 横浜市.

12. 岡山 三紀、村田 勝、田崎 純一、溝口 到. 口蓋インプラントにおける植立部位の骨質と骨結合率評価. 第 69 回日本矯正歯科学会学術大会. 2010. 9. 27~29 横浜市.

13. 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. 9. 20~22 東京都 船堀.

口演発表

14. 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 回歯科基礎医学会学術大会. 2011. 9. 30~10. 2 岐阜県

長良川国際会議場.

15. 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 回歯科基礎医学会学術大会. 2011. 9. 30~10. 2 岐阜県 長良川国際会議場.

16. 岡山三紀、溝口到. 北海道医療大学矯正歯科外来における矯正用口蓋インプラントの臨床統計. 北海道矯正学会. 2010. 6. 20 北海道 札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 三紀 (OKAYAMA MIKI)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号 : 30382500