

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593037

研究課題名(和文) 歯周病原因子と過大な機械的刺激が歯の移動の細胞シグナリング機構に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effects of periodontal pathogenic factor and excessive mechanical stress on signaling pathway of orthodontic tooth movement

研究代表者

前田 綾 (MAEDA, AYA)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10457666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞の機械的刺激によるケモカインMIP-2 とMCP-1の発現誘導には構成的なIL-1 を必要とすること、また、それがIL-1レセプターおよびTLRのアダプタータンパクであるMyD88を介することが明らかとなった。よって、MyD88を介したシグナル伝達系が、矯正治療における骨改造の初期反応に関与することが示唆された。また、IL-1 のタンパク濃度が高い状況下では、これらの反応を促進させる可能性が示唆された。臨床研究では、歯根長は咬合接触と関連し、不良な骨架橋は、早期に矯正治療を開始した場合に良好な骨架橋になる可能性が認められ、機械的刺激が歯根形成や移植骨の骨改造に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the constitutive expression of IL-1beta is essential for the induced expression for MIP-2 and MCP-1 in osteoblasts by mechanical stresses in a manner dependent on MyD88, an adaptor molecule for IL-1 receptor and TLRs. Thus, it is suggested that MyD88 signaling pathway is involved in bone remodeling in the early phase of orthodontic treatment. Our findings also indicated that high level concentrations of IL-1beta may promote inflammatory responses of osteoblasts induced by mechanical stress. In the clinical research, it was found that the dental root length was related to the loss of occlusal contact. Additionally, some of the poor bone bridges were improved by orthodontic tooth movement in the early phase after bone graft. These results suggested that the functional stress by occlusal force and mechanical stress may promote root-length formation and bone remodeling.

研究分野：矯正・小児系歯学

科研費の分科・細目：歯科矯正学

キーワード：機械的刺激 矯正治療 骨改造 炎症性反応 ケモカイン サイトカイン TLR 細胞内シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

歯に矯正力を加えると歯周組織にサイトカインなどの炎症性メディエーターが産生する。これらの反応は一般の炎症症状とは異なるため、炎症様反応とよばれ、炎症様反応がトリガーとなって歯槽骨の改造に伴う歯の移動が生じる (Davidovitch, 1991, Alhashimi et al., 2001)。しかし、歯科矯正に関わるこの炎症様反応を誘導するシグナル伝達経路の詳細は不明である。また、歯科矯正臨床では、睡眠時ブラキシズムによる過大な咬合力や歯周病など、他の要因による炎症反応が加わった状況下で矯正治療を行うことがある。しかし、複数の炎症反応を生じさせる因子が存在した場合の歯周組織において、矯正治療の機械的刺激による炎症様反応や、細胞シグナル伝達経路がどのような影響を受けるのか、十分に検討されていない。また、機械的刺激による歯根吸収や歯周組織への影響についても、未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

基礎研究として、骨芽細胞において、至適矯正力を想定した機械的刺激による各種の炎症様メディエーターの産生が、炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1 $\beta$  によってどのように変動するかを解析し、さらに、IL-1 $\beta$  に関与する細胞シグナル伝達経路、特に Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) を介したシグナル伝達経路の役割を明らかにする。また、臨床研究として、咬合力や矯正治療による機械的刺激が、歯根や骨のリモデリングにどのように関与するかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 基礎研究:

野生型 C57BL/6 新生仔マウス (WT) から骨芽細胞を単離し、圧刺激を負荷したときの、炎症性メディエーターの一種であるケモカインの発現量の動態を検討した。さらに、ケモカインの動態に関与するとされる IL-1 $\beta$  に

ついてのシグナル伝達経路を調べるため、IL-1 レセプターおよび Toll-like receptor (TLR) のアダプタータンパクである MyD88 の遺伝子欠損マウス (MyD88(-/-)) の骨芽細胞を使用し、解析した。具体的には以下の方法で実験を行った。

C57/BL6 マウスを屠殺し、頭蓋骨を無菌下で摘出後、洗浄後に骨片を細断した。細断した骨片を 37、20 分間 4 回コラゲナーゼで骨表面の軟組織を除去し、コラゲナーゼ処理後、骨片を 1~2 週間培養し、outgrowth した骨芽細胞を採取して培養実験に使用した。MyD88 (+/+) (WT) と MyD88 (+/-) および MyD88 (-/-) の C57BL/6 新生仔マウスから単離した骨芽細胞を 1 週間分化させ、遠心力により発生させた圧刺激 (10gf/cm<sup>2</sup>, 20min) を負荷した。刺激開始から 4 時間後に total RNA をトライゾールで回収し、各種ケモカイン macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 (MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -2), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) および IL-1 $\beta$  の mRNA の発現を、リアルタイム PCR で定量した。

次に、IL-1 $\beta$  の量的変動がケモカイン発現に与える影響を確認するために、IL-1 $\beta$  の中和抗体を添加した場合と、IL-1 $\beta$  のリコンビナントタンパクを添加した場合の実験を同様に行った。中和抗体もしくはリコンビナントタンパクを機械的刺激 30 分前に添加し、刺激 4 時間後にトータル RNA を回収し、mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量した。

また、圧刺激後の MAP キナーゼ (ERK, p38, JNK) のリン酸化と I $\kappa$ B $\alpha$  タンパク量を Western blot 法で解析した。

#### 臨床研究:

咬合接触が少なく、下顎下縁平面の開大し咬合力が低いことが報告されている開咬患者において、歯根歯冠比と歯根長を調べ、咬合

力による刺激と歯根の長さについて調査した。資料には、鹿児島大学矯正歯科外来に来院した不正咬合患者の矯正検査資料を用いた。15歳以上の全ての症例において、4前歯以上にわたりオーバーバイトがマイナスの値で開咬を呈している患者を開咬群、オーバージェットとオーバーバイトが共に1~4mmであり、前歯部が正常被蓋を呈している不正咬合患者を対照群とした。矯正治療の既往がある者、多数歯欠損を認める者、さらに口蓋裂などの先天異常を呈する患者は除外し、開咬群は31名、対照群は31名であった。Lindの方法に準じ、パノラマX線写真より歯冠歯根比と歯根長の測定を行った。また、セファロ分析により顎顔面形態の測定を行い、模型分析により咬合接触率を算出し、両群間の比較を行った。さらに、開咬群において、歯冠歯根比あるいは歯根長と下顎下縁平面角との関連性を調べるために、マルチレベルモデリングによる統計解析を行った。

さらに、骨移植と矯正治療を含む一貫治療が終了した片側性唇顎口蓋裂(唇顎裂)患者を対象に、骨移植後の移植骨の予後と矯正治療による機械的刺激との関連について調査した。対象は、過去30年間に当院で骨移植と矯正治療を含む一貫治療が終了し、本研究に必要な資料が全て存在する43名とした。咬合法X線写真を用いてChelsea scaleにより骨架橋を、ABG scale scoreで顎裂側の骨量を評価した。評価時期は、BG後6-12か月(T1)とMB療終了時(T2)とし、T1での骨架橋の評価により、良好群と不良群に分類し、T2における移植骨の変化とMB治療開始時期について調査した。

#### 4. 研究成果

##### 基礎研究：

・MyD88 (-/-) の骨芽細胞では、WTの骨芽細胞と比較してMIP-2とIL-1 $\beta$ の定常的な発現量が有意に低下しており、圧刺激後のMIP-2とMCP-1の発現量が少なく、MAPキナーゼのリン酸化量は減少していた。RANTESは、両骨芽細胞ともに機械的刺激によって発現

が増加した。MIP-1 $\beta$ は、両骨芽細胞において、圧刺激による発現の増加は認められなかった。MIP-1 $\alpha$ は、定常的な発現が認められなかった。

・WTの骨芽細胞にIL-1 $\beta$ のタンパク中和抗体を添加した場合の実験では、圧刺激によるMIP-2とMCP-1の発現の増加は抑制された。

・WTの骨芽細胞にIL-1 $\beta$ リコンビナントタンパクを添加した実験では、MIP-2とMCP-1の発現量と3種類のMAPキナーゼのリン酸化は増加し、圧刺激との共刺激では、MIP-2とMCP-1の発現量と3種類のMAPキナーゼのリン酸化が増加した。

・MyD88 (-/-) の骨芽細胞では、IL-1 $\beta$ のリコンビナントタンパクを添加しても、MIP-2とMCP-1の発現量と3種のMAPキナーゼのリン酸化の増加は認められなかった。

これらの結果から、骨芽細胞に機械的刺激を负荷した場合、MAPキナーゼがリン酸化し、定常的なIL-1 $\beta$ 発現によるMyD88を介する細胞シグナル伝達経路に依存してMIP-2やMCP-1のケモカイン発現が誘導されることが示唆された。また、機械的刺激とIL-1 $\beta$ タンパクの共刺激により、MAPキナーゼのリン酸化が増加し、MIP-2やMCP-1の発現誘導が増加したが、MyD88を介したシグナル伝達が遮断された場合には、IL-1 $\beta$ のタンパクを添加してもこれらの変化は認められなかった。従って、骨芽細胞の機械的刺激によるケモカインの発現誘導には、一般的な炎症反応のシグナル伝達経路であるMyD88を必要とすることが明らかとなり、MyD88を介したシグナル伝達系が、矯正治療における骨改造の初期反応に関与することが示唆された。また、IL-1 $\beta$ のタンパク濃度が高い状況下では、これらの反応を促進させる可能性が示唆された。

以上の内容の一部を、第72回日本矯正歯科学会大会(平成25年10月7日-9日 長野)で報告した。

## 臨床研究：

開咬群は、切歯から小臼歯までが小さな歯冠歯根比と短根を呈しており、開咬群は対照群と比較して同部位の咬合接触の割合が小さかったことから、短根と咬合接触が関連していることが示唆された。また、開咬患者において、下顎下縁平面角の開大は小さな歯冠歯根比や短根と関連していたことから、開咬患者は切歯から小臼歯までが短根で、短根の原因としては、少ない咬合接触や下顎下縁平面の開大と関連する弱い咬合力などの咬合刺激や先天的な原因が考えられた。これらの内容を国際誌で報告した。

また、口唇口蓋裂患者の骨移植の変化に関する研究では、良好群は不良群と比較して、ABG score は T1 で中切歯側が、T2 で両顎裂側が有意に高かった。T1 における骨架橋の評価が T2 で変化する割合は、不良群で有意に高かった。不良群において、骨架橋が改善した症例では、1 年以内に矯正治療による歯の移動を行っている症例が多かった。また、良好群における中切歯側の ABG score は、T1 と比較して T2 で有意に低かった。これらの結果から、BG 後 6-12 か月での骨架橋の評価は、中切歯側の骨量に依存しており、また、良好な骨架橋でも、矯正治療後に中切歯側の骨量が減少したことから、犬歯側と比較して中切歯側で骨量が減少しやすいことが示唆された。また、骨架橋が不良な症例でも、矯正治療による 1 年以内の歯の移動により、良好な骨架橋へ変化する可能性が示唆されたことから、機械的刺激により、移植骨の骨架橋が改善する可能性が示唆された。これらの内容を、国際誌で報告した。

## 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7件)

1. Nishihara K, Nozoe E, Maeda A, Hirahara N, Okawachi T, Miyawaki S, Nakamura N. Outcome following secondary autogenous bone grafting before and after canine eruption in

patients with complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J* 2014; 51:165-171. 査読有 .

2. Nakao J, Fujii Y, Kusuyama J, Bandow K, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T., Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4-MyD88 dissociation., *Bone*, 2014; 58: 17-25. 査読有 .

3. Kusuyama J, Bandow K, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T., Low Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Influences the Multilineage Differentiation of Mesenchymal Stem and Progenitor Cell Lines through ROCK-Cot/Tpl2-MEK-ERK Signaling Pathway., *J Biol Chem*, 2014; 289:10330-10344. 査読有 .

4. Maeda A, Uehara S, Suga M, Nishihara K, Nakamura N, Miyawaki S. Changes in Grafted Autogenous Bone during Edgewise Treatment in Patients with Unilateral Cleft lip/palate or Alveolus. *Cleft Palate Craniofac J*. 2013 in press, 査読有 .

5. Maeda A, Sakoguchi Y, Miyawaki S. Patient with oligodontia treated with a miniscrew for unilateral mesial movement of maxillary molars and alignment of an impacted third molar. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;144(3):430-440. 査読有 .

6. Uehara S, Maeda A, Tomonari H, Miyawaki S. Relationships between the root-crown ratio and the loss of occlusal contact and high mandibular plane angle in patients with open bite. *Angle Orthod* 2013; 83: 36-42. 査読有 .

7. Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T., LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages., *FEBS Lett* 2012 ; 586: 1540-1546. 査読有 .

[学会発表](計6件)

1. 前田 綾, 坂東健二郎, 宮脇正一, 松口徹也. 自然免疫に重要な MyD88 と I L -1 $\beta$  は機械的刺激による骨芽細胞のケモカインの発現誘導に關与する. 第 72 回日本矯正歯科学会大会 学術展示 平成 25 年 10 月 7 日-9 日 長野 .

2. 高田寛子, 前田 綾, 迫口陽子, 兼松恭子, 宮脇正一. 下顎片側小臼歯の抜歯により改善した下顎歯列正中の著しい偏位と叢生を伴うアングル 級症例. 第 72 回日本矯正歯科学会大会 症例展示 平成 25 年 10 月 7

日-9日 長野 .

3 . 福重雅美, 帆北友紀, 前田 綾, 植田紘貴, 上原沢子, 下田平貴子, 宮脇正一 . 唇顎口蓋裂を伴う矯正患者の保護者における心理状態と関心事 . 第 8 回日本歯科衛生学会学術大会 平成 25 年 9 月 15 - 16 日 神戸 .

4 . 前田 綾, 上原沢子, 菅 真有, 西原一秀, 中村典史, 宮脇正一 . 片側性唇口蓋裂患者の骨移植と歯科矯正治療後の骨架橋と切歯の評価 . 第 36 回日本口蓋裂学会総会・学術集会 一般演題 (示説) 平成 24 年 5 月 24 - 25 日 京都 .

5 . 上原沢子, 前田綾, 友成博, 宮脇正一 . 開咬患者における歯冠歯根比と咬合接触について . 第 70 回日本矯正歯科学会 学術展示 平成 23 年 10 月 17 日-20 日、名古屋 .

6 . 八木孝和, 前田綾, 植田紘貴, 菅真有, 宮脇正一 . 歯周病原性因子存在下の培養ヒト歯根膜線維芽細胞への物理的刺激による細胞内シグナル伝達系の動態検討 . 第 70 回日本矯正歯科学会 学術展示 平成 23 年 10 月 17 日-20 日、名古屋 .

〔図書〕(計 2 件)

1 . 宮脇正一, 植田紘貴, 前田 綾 . 酸蝕症とブラキシズム. 小児歯科臨床 2014 年 5 月 1 日発行; 19(5): 38-42.

2 . 福重雅美, 前田 綾, 植田紘貴, 上原沢子, 帆北友紀, 下田平貴子, 宮脇正一 . 矯正治療を受けている唇顎口蓋裂を伴う児童の保護者の心理状態と関心事の解明. かごしま口腔保健協会会報 平成 25 年 8 月発行 31: 6-7.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

前田 綾 (MAEDA AYA)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号 : 10457666

### (2)研究分担者

宮脇 正一 (MIYAWAKI SHOICHI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 80295807

八木 孝和 (YAGI TAKAKAZU)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号 : 10346166

友成 博 (TOMONARI HIROSHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号 : 70398288

松口 徹也 (MATSUGUCHI TETSUYA)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 10303629