

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：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593044

研究課題名(和文) 矯正治療に伴う歯根吸収部の破歯細胞形成を誘導するセメント細胞アポトーシスの関与

研究課題名(英文) Involvement of apoptosis of cementoblast in orthodontic root resorption

研究代表者

葛西 一貴 (KASAI, KAZUTAKA)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：30169396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：In vivoにおいて、圧迫側歯根膜組織にTNF- α 陽性細胞の発現が認められた。また、caspase 8陽性細胞およびTUNEL陽性細胞の増加を認めた。In vitroにおいては、compression force群の歯根膜細胞の細胞内にROS発現が認められた。またフローサイトメトリーにおいて、細胞周期のG1アレスト、アポトーシス細胞の増加が認められた。

以上の結果から、歯根膜組織は至適矯正力によりTNF- α 、caspase 8の発現と、ROS産生、細胞周期のG1アレストを通じアポトーシス細胞が発現することにより、矯正学的歯の移動時において、歯根膜組織の恒常性の維持に關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effect of compression force on periodontal ligament (PDL) plays a critical role in orthodontic tooth movement. However, little is known about this effect on apoptosis and the underlying reactive mechanisms in PDL cells. This study focuses on the application of compression force associated with reactive oxygen

species (ROS)-induced apoptosis in PDL cells. The cell cycle and apoptosis were assessed in compression force-treated PDL cells using flow cytometry. In vivo study revealed an increased number of terminal transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and caspase 8-positive cells in the orthodontic force group. In our in vitro study model, the compression force increased the G1 phase and apoptotic cells. A large increase in the intracellular ROS levels in human (h) PDL cells was observed in the compression force group. These results provide new information on compression force-induced G1 arrest and apoptosis in hPDL cells.

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：歯根吸収 アポトーシス 破歯細胞 セメント細胞 歯根膜細胞

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正学的歯の移動中における歯根吸収は偶発症のひとつで、平均 1.5mm の歯根吸収もしくは上顎 4 前歯以上の歯根吸収が研究対象患者の 4.1%、2 mm 以上の歯根吸収もしくは上顎 4 前歯に 1 本以上の歯根吸収が 15.5% の頻度で発生する。歯根吸収は矯正力における炎症プロセスに基づき、矯正力により骨吸収性サイトカインの産生が増大し、破歯細胞が誘導されることが歯根吸収の原因の 1 つであることが示唆されている。当講座では、歯根吸収発生のメカニズムの解明をメインテーマとして研究してきており、今までに以下のことを報告した。

(1) ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDL cells) に持続的圧迫力 (compression force) を与えると RANKL 産生が増加することを明らかにした。Nishijima Y. *Orthod Craniofac Res*, 2006.

(2) 重度歯根吸収患者由来の HPDL cells に compression force を負荷したとき RANKL が多量に増加することを明らかにした。Yamaguchi M. *J Dent Res*, 2006.

(3) ラットに過度の矯正力を加えて歯根吸収を惹起させた時に、破骨細胞、破歯細胞、歯根膜線維芽細胞に RANKL の発現を認めることを明らかにした。Nakano Y. *Eur J Orthod*, in press.

(4) HPDL cells に compression force を与えると IL-8, MIP-1 産生が増加すること、およびラットに過度の矯正力を加えて歯根吸収を惹起させた時に、破骨細胞、破歯細胞、歯根膜線維芽細胞に CINK, MIP-1 の発現を認めることを明らかにした。Asano M. *Oral Diseases*, in press.

以上のことから歯根吸収の発症に、過大な矯正力によって歯根膜(細胞)から産生された RANKL, IL-8, MIP-1 が関与することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は矯正治療時の歯根吸収発生メカニズムの解明の一環として、破歯細胞形成・誘導にセメント細胞のアポトーシスが関与しているという仮説を基に、ラットを用いた実験的歯根吸収モデルにて、破歯細胞形成部にセメント細胞のアポトーシスが起きているか観察する。さらに、破歯細胞形成とセメント細胞アポトーシスの関係を解明するために in vitro で三次元歯根膜線維芽細胞・骨髄細胞・骨細胞共培養系に対する加圧刺激によるアポトーシスが破歯(骨)細胞形成を促進するかを検討する。

3. 研究の方法

平成 23 年度: in vivo ではラットを用いた実験的歯根吸収モデルにて、免疫組織化学染色法で CICEB, PYCARD, BAK-1, TNFRSF, BCL-2 の発現を検討し、さらに骨細胞選択的除去マウスを用いた実験的歯根吸収モデルにてこれらの因子が歯根吸収の発生に関与しているか、検討を行う。

平成 24 年度以降: 三次元培養系を用いた骨髄細胞・骨細胞共培養系に compression force を加え、RANKL とケモカイン (IL-8, MIP-1, MCP-1) の産生量と遺伝子発現量を検討する。

さらに、骨細胞に紫外線照射を行い人為的にアポトーシスを起こし、破骨細胞形成について検討する。次に、CICEB, PYCARD, BAK-1, TNFRSF, BCL-2 および caspase 3 の発現を検討する。

アポトーシス阻害剤であるカスパーゼ 3 (caspase3) 阻害剤を上記の培養系に添加し、骨細胞のアポトーシスと骨吸収が抑制されるかを検討する。

骨髄細胞上に歯根膜線維芽細胞を培養し、過度の compression force を加え、セメント細胞にアポトーシスが起きるか、検討する。さらに、CICEB, PYCARD, BAK-1, TNFRSF, BCL-2, caspase 3 の発現を検討する。

4. 研究成果

In vivo において、圧迫側歯根膜組織に炎症性サイトカインである TNF- 陽性細胞の発現が認められた。また、caspase 8 陽性細胞および TUNEL 陽性細胞の増加を認めた。In vitro においては、compression force 群の歯根膜細胞の細胞内に ROS 発現が認められた。またフローサイトメトリーにおいて、細胞周期の G1 アレスト、アポトーシス細胞の増加が認められた。ヘキスト 33258 染色では核の断片化などの形態変化が認められた。以上の結果から、歯根膜組織は至適矯正力により TNF-、caspase 8 の発現と、ROS 産生、細胞周期の G1 アレストを通じアポトーシス細胞が発現することにより、矯正学的歯の移動時において、歯根膜組織の恒常性の維持に関与する可能性が示唆された。次に、歯根吸収では vivo において、矯正力を加えたマウスの圧迫側歯根表面には吸収窩が認められ、その周囲に TNF- および RANKL 陽性細胞の増加を認めた。さらに、in vitro において、CF を負荷した hPDL cells の TNF- および RANKL の発現が有意に増加し、破骨細胞培養系においても CF 群および TNF-、RANKL が存在する群で TRAP 陽性細胞が増加した。このことから TNF- は破骨細胞の分化を増強する効果があることが明らかとなった。さらに、興味深いことに、RANKL 非存在下において TNF-

単独でも破骨細胞分化は微弱に起こった。しかしその効果は、RANKL のみの破骨細胞発現と比較し、5 分の 1 程と非常に弱いものであった。一方、TNF- と RANKL の共存下では RANKL のみの場合と比較すると約 2.1 倍となり、RANKL 依存性破骨細胞発現は TNF- の共存により著明に増加することが明らかとなった。このことから、TNF- は単独では破骨細胞分化の能力は弱い、RANKL の存在下では破骨細胞分化を促す効果は非常に強

いことが明らかとなった。加えて、破骨細胞の吸収能を検討するために行った pit formation assay においても TRAP 染色の結果と同様に、TNF- は RANKL 依存性の破骨細胞の活性化を著明に促した。しかし TNF- 単独での吸収活性は全く見られなかった。TNF- 単独の作用については、弱い分化能を示すが、吸収能においては単独では活性化に至らないことが明らかとなった。

以上のことから、TNF- は単独では矯正治療中の歯根吸収を惹起する可能性は低いが、RANKL との共存により歯根吸収が発症する。そしてその作用は RANKL 単独の際よりも劇的であ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 10 件)

1. Yoshino T, Yamaguchi M, Shimizu M, Yamada K, Kasai K. TNF- aggravates The Progression of OIRR in The Presence of RANKL. J Hard Tissue Biol, 23(2), 155-162, 2014. (査読あり)
2. Kojima T, Yamaguchi M, Yoshino T, Shimizu M, Yamada K, Goseki T, Kasai K. TNF- and RANKL facilitates the development of orthodontically-induced inflammatory root resorption. Open Journal of Stomatology, 3, 52-58, 2013. (査読あり)
3. Kunii R, Yamaguchi M, Tanimoto Y, Asano M, Yamada K, Goseki K, Kasai K. Levels of IL-6 in gingival crevicular fluid obtained from patients with severe orthodontic root resorption and effect of compression force on IL-6 production in vitro. Korean J Orthod, Dec;43(6):294-301, 2013. (査読あり)
4. Yamada K, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Kobayashi R, Kasai K. Th17 cells induced by heavy force stimulates root resorption in a mouse model of atopic dermatitis. Oral Dis. 19(7):683-93, 2013. (査読あり)
5. Shimizu M, Yamaguchi M, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Interleukin-17/T-helper 17 cells in an atopic dermatitis mouse model aggravate orthodontic root resorption in dental pulp. Eur J Oral Sci. 121(2):101-10, 2013. (査読あり)
6. Aihara N, Yamaguchi M, Yamada K, Yoshino T, Goseki T, Kasai K. Levels of IL-17, RANKL and OPG in gingival crevicular fluid obtained from patients with severe orthodontic root resorption, Int J Oral-Med Sci,12(1), 54-60, 2013. (査読あり)
7. Funakoshi M, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Kasai K. Effect of Compression Force on Apoptosis in Human Periodontal Ligament Cells. p.41-50, J Hard Tissue Biol. 22(1): 41-50, 2013. (査読あり)
8. Yamaguchi M, Yamada K, Asano M, Fujita S, Yamamoto H, Kasai K. Immunohistochemical localization of T-helper 17 cells, IL-17, and RANKL during root resorption induced by excessive orthodontic force in the mouse model of T cell-mediated autoimmune disease.

- Int J Oral -Med Sci, 12(4):249-260, 2012. (査読あり)
9. Funakoshi M, Yamaguchi M, Fujita S, Kasai K. Localization of TNF- and macrophages in the periodontal ligament during orthodontic tooth movement. International Journal of Oral-Medical Sciences, 12(3):182-189, 2012. (査読あり)
10. Shimizu M, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasa K. Orthodontic root resorption was associated with the secretion of IL-6 and IL-8 stimulated by IL-17 in dental pulp cells. International Journal of Oral-Medical Sciences, 12(3):172-181, 2012. (査読あり)

[学会発表](計 11 件)

1. 吉野智一、山口 大、清水真美、山田邦彦、菊田 純、葛西一貴. TNF- は RANKL と相乗的に歯根吸収を増悪させる. 第 72 日本矯正歯科学会大会, 2013年10月9日, 松本.
2. 菊田 純、山口 大、清水真美、菊田 純、葛西一貴. 根吸収は Notch シグナルを介した IL-6、RANKL 発現によって誘発される. 第 72 日本矯正歯科学会大会, 2013年10月9日, 松本.
3. 疋田拓史、山口 大、安藤 淳、清水真美、船越麻里、山田邦彦、吉野智一、菊田 純、葛西一貴. 実験的歯の移動におけるジグリングおよび強い矯正力による歯根吸収の比較. 第 72 日本矯正歯科学会大会, 2013年10月9日, 松本.
4. Yoshino T, Yamaguchi M, Yamada K, Shimizu M, Kasai K. Tumor necrosis factor- α aggravates orthodontically root resorption. , Cytokines 2013: From Molecular Mechanisms to Human Disease San Francisco, California, USA, Sep29-Oct3, 2013.
5. Kikuta J, Yamaguchi M, Yamada K, Shimizu M, Funakoshi M, Kasai K. Compression force induces inflammatory cytokines via notch signaling in periodontal ligament cells. Cytokines 2013: From Molecular Mechanisms to Human Disease San Francisco, California, USA, Sep29-Oct3, 2013.
6. Yamaguchi M, Yamada K, Shimizu M, Yoshino T, Kikuta J, Kasai K. Th17-production IL-17 on periodontal ligament induced root resorption in mouse models of rheumatoid arthritis and atopic dermatitis. Cytokines 2013: From Molecular Mechanisms to Human Disease San Francisco, California, USA, Sep29-Oct3, 2013.
7. 船越 麻理、山口 大、小林良喜、浅野正貴、葛西一貴. メカニカルストレスがヒト歯根膜線維芽細胞の細胞死に与える影響, 第 71 回 日本矯正歯科学会大会, 2012年9月28日, 盛岡.
8. 菊田 純、山口 大、山田邦彦、吉野智一、葛西一貴. 持続的圧迫力がヒト歯根膜線維芽細胞の Notch

シグナルに及ぼす影響. 第 71 回
日本矯正歯科学会大会, 2012 年 9
月 28 日, 盛岡.

9. 吉野智一、山口 大、菊田 純、
葛西一貴. TNF- が矯正学的歯の
移動時に生じる歯根吸収に及ぼす
影響, 71 回 日本矯正歯科学会大
会, 2012 年 9 月 28 日, 盛岡.

10. 清水真美、山口 大、浅野
正貴、葛西一貴. ヒト歯髄組織中の
IL-17 が炎症性サイトカイン産生
および歯根吸収に及ぼす影響, 71
回 日本矯正歯科学会大会, 2012
年 9 月 28 日, 盛岡.

11. 山田邦彦、山口 大、小林
良喜、浅野正貴、安藤 淳、宇都
宮忠彦、山本正文、山本浩嗣、葛
西一貴. アレルギーは矯正学的歯
の移動時に生じる歯根吸収を増悪
する, 71 回 日本矯正歯科学会大
会, 2012 年 9 月 28 日, 盛岡.

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

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)

なし

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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西一貴 (KASAI KAZUTAKA)

研究者番号: 30169396

日本大学・松戸歯学部・教授

(2) 研究分担者

山口 大 (YAMAGUCHI MASARU)

研究者番号: 60333100

日本大学・松戸歯学部・准教授

(3) 連携研究者

なし