

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 17日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究B

研究期間：2011～2012

課題番号：23792449

研究課題名（和文） IL-17-RANKL が矯正治療中の歯根吸収に及ぼす影響について

研究課題名（英文） The effects of IL-17-RANKL on root resorption during orthodontic tooth movement

研究代表者

藤田 祥仁 (FUJITA SHOJI)

日本大学・松戸歯学部・兼任講師

研究者番号：80547688

研究成果の概要（和文）：hPDL cells とアトピー性皮膚炎患者の CD4⁺T 細胞を共培養し、CF を付与した群は、他群と比較し IL-6, RANKL の mRNA 発現と IL-17, IL-6, RANKL タンパク発現が有意に増加した。以上の結果は、Th17 細胞の歯根吸収への関与を示唆しており、強い矯正力を作用させた場合、アトピー性皮膚炎患者は健常者よりも歯根吸収を惹起しやすいことを示していた。

研究成果の概要（英文）：The immunoreactivities for TRAP, IL-17, IL-6, and RANKL in the atopic dermatitis (atopic dermatitis: AD) group were found to be significantly increased. The double-immunofluorescence analysis for IL-17/CD4 detected immunoreaction. The secretion of IL-17, IL-6 and RANKL, and the mRNA levels of IL-6 and RANKL in the AD patients were increased compared with those in healthy individuals. **Conclusion:** Th17 cells may therefore be associated with the deterioration of root resorption of AD mice, and may explain why AD patients are more susceptible to root resorption than healthy individuals when the heavy OF is applied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正, 歯根吸収, IL-17-RANKL

1. 研究開始当初の背景

近年、関節リウマチ(RA)や歯周病などの疾患において、免疫系による骨代謝制御の重要性が認められ、RAにおける炎症性骨破壊は、T細胞による骨代謝制御の異常に起因する。T細胞の活性化は、receptor activator of NFκB ligand (RANKL)の過剰発現を介して破骨細胞を誘導し、骨破壊を惹き起こす。最近、Takayanagiらのグループによって骨破壊を起こすヘルパーT細胞がTh17細胞であることが明らかにされた。一方、申請者は重度歯根吸収者由来歯根膜細胞と歯髓細胞に持続的圧縮力および

Substance Pを加え、RANKL産生能と骨吸収能の増加を報告した (J Dent Res, 2006; Am J Orthod Dento Orthop, 2008)。また、ラットに過度の矯正力を加え、吸収した歯根周囲組織にIL-17とRANKLが発現することを報告した。Nishiokaら⁵⁾は日本人の重度歯根吸収者は喘息とアレルギー患者に多いことを見出し、矯正治療中の歯根吸収の発生に免疫システムが関与していることを示唆している。さらに、歯周病の進行にTh17細胞が産生するIL-17, RANKLが関与し⁶⁾、根尖病巣組織の骨吸収にIL-17が関与していること⁷⁾など多く

報告されている。しかしながら、矯正治療時の歯根吸収の発生メカニズムについて骨免疫学的なアプローチはされていない。以上のことから、矯正治療中の歯根吸収の発生に免疫システムが関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は矯正治療後の歯根吸収発生メカニズムに対して骨免疫学に焦点を当て、アレルギーマウスから採取した interleukin-17(IL-17)産生ヘルパーT細胞(Th17細胞)が IL-17-RANKL (receptor activator of NFkappaB ligand)産生および骨吸収に及ぼす影響を細胞生物学的・病理組織学的に検討し、矯正治療後の歯根吸収発生メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

平成 23 年度：アレルギーマウスに人為的に歯根吸収を起こし、その吸収組織周辺の IL-17, RANKL, RANK, OPG の発現を免疫組織化学染色および in situ PCR 分析を行う。

平成 24 年度：①アレルギーマウスから Th17 細胞を採取し、IL-17, RANKL, OPG の産生量と遺伝子発現および骨吸収活性について分子生物学的手法を用いて検討を行う。

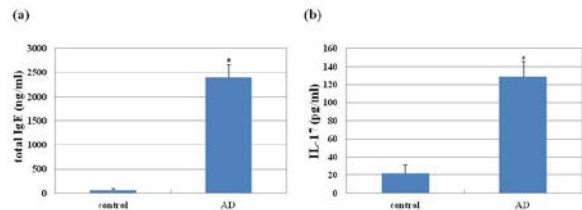
②矯正治療による重度歯根吸収者より T リンパ球を採取し、活性化 T リンパ球より産生される IL-17 について検討する。さらに、活性化 T リンパ球と歯根膜線維芽細胞に IL-17 を作用させ、granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、RANKL の産生量について検討する。採取した培養上清より骨吸収活性について検討を行う。

4. 研究成果

移動 7 日目において RA マウスの方が正常マウスに比べ、Th17 が多く認められた。また、アレルギー患者の CD4 陽性 T 細胞と PDL の共培養において RANKL、IL-17 の高い遺伝子発現を認めた。平成 24 年度はアレルギーマウスより Th17 細胞を採取し、IL-17 産生量について検討する。さらに、IL-23 を作用させ、RANKL 産生量および骨吸収活性について検討を行う。また、矯正治療による重度歯根吸収者より T リンパ球を採取し、活性化 T リンパ球より産生されるインターロイキン 17 (IL-17) について検討する。さらに、活性化 T リンパ球と歯根膜線維芽細胞に IL-17 を作用させ、granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、RANKL の産生量について検討する。採取した培養上清より骨吸収活性について検討を行う。その結果、以下の結果を得た。

研究 1

RA マウス, wild type マウスの PDL に Th17 細胞の存在を確認した。さらに, RA マウスの方が wild type マウスと比較し歯根膜に発現する Th17 細胞の数の増加を認めた。また, 歯牙移動群 (orthodontic force 群:OF 群) は, コントロール群と比較し, Th17 細胞の数が増加した。

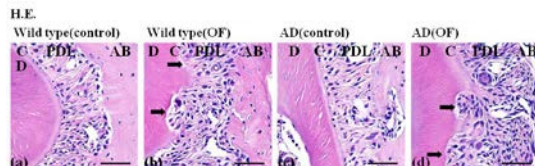


研究 2

(1)Nc/Nga マウスのダニ抗原を 17 日間反復塗布した背部には、赤い湿疹、結節等が形成され、湿潤した局面から組織液の滲出を認めた。さらに、血中 IgE、IL-17 タンパク発現量が増加し、アトピー性皮膚炎の発症を確認した。



(2)AD マウス, wild type マウスの OF 群は歯根の表面に吸収窩が認められ、周囲に TRAP 陽性の多核破歯細胞が出現した。それらは wild type マウスと比較し AD マウスでより多く認めた。

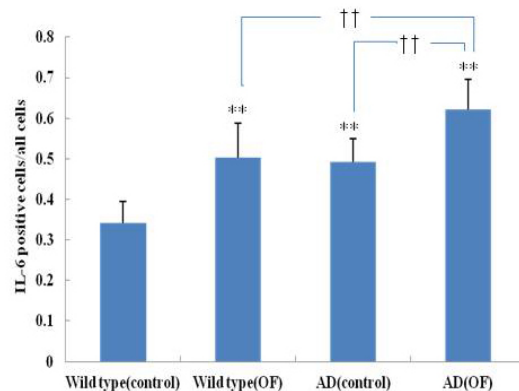


(3)AD マウスは wild type マウスと比較し、多くの IL-17, IL-6, RANKL 陽性細胞を認め

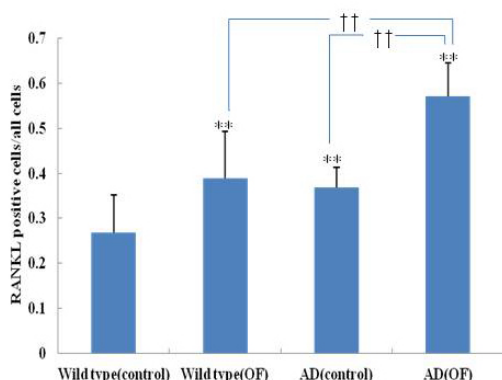
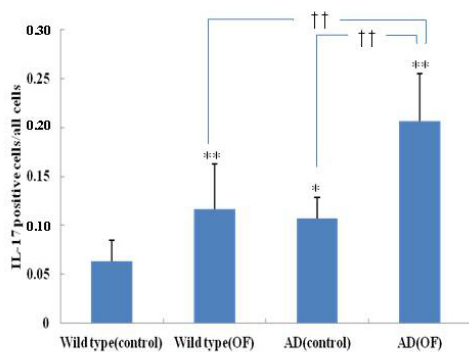
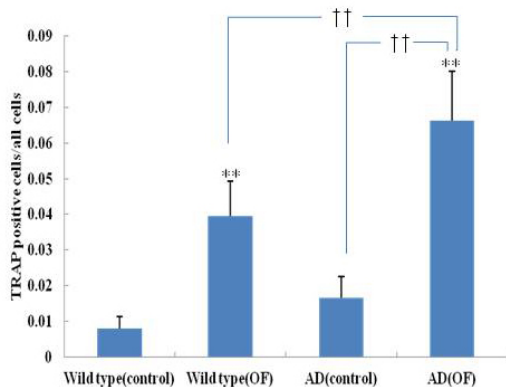
た。さらに、OF群はコントロール群と比較し、IL-17、IL-6、RANKL 陽性細胞の増加を認めた。

(4)AD マウス, wild type マウスの PDL に Th17 細胞の存在を確認した。さらに, wild type マウスと比較して、AD マウスの歯根膜に発現する Th17 細胞の数の増加を認めた。また、OF 群は、コントロール群と比較し、Th17 細胞の数が増加した。

(5)hPDL cells とアトピー性皮膚炎患者の CD4⁺T 細胞を共培養し、CF を付与した群は、他群と比較し IL-6、RANKL の mRNA 発現と IL-17、IL-6、RANKL タンパク発現が有意に増加した。また、hPDL cells とアトピー性皮膚炎患者の CD4⁺T 細胞を共培養し CF 刺激を行った群の OPG の mRNA 発現とタンパク発現は、健常者のものより有意に低下した。



以上の結果は、Th17 細胞の歯根吸収への関与を示唆しており、強い矯正力を作用させた場合、アトピー性皮膚炎患者は健常者よりも歯根吸収を惹起しやすいことを示していた。



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 Yamada K, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Kobayashi R, Kasai K. Th17-cells in atopic dermatitis stimulate orthodontic root resorption. Oral Dis. in press
- ② Ando J, Yamaguchi M, Fujita S, Kawamura A, Utsunomiya T, Kasai K. Morphological and Histological Changes in the Mandibular Condyle after Plate Removal in Experimental Models of Short- and Long-term Mandibular Lateral Displacement. J Hard Tissue Biol, in press
- ③ Shimizu M, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Orthodontic root resorption was associated with the secretion of IL-6 and IL-8 stimulated by IL-17 in dental pulp cells. Int J Oral-Med Sci, in press.
- ④ IL-8 and MCP-1 induced by excessive Asano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. Oral Dis. 2011 Jul;17(5):489-98.
- ⑤ Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, Kasai K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root

resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. Eur J Orthod. 2011 Aug;33(4):335-43.

[学会発表] (計4件)

- ① 山田邦彦, 山口 大, 藤田祥仁, 浅野正貴, 安藤 淳, 宇都宮忠彦, 山本浩嗣, 葛西一貴. 矯正学的歯の移動時に生じる歯根吸収における **helper T cell 17** の関与. 第 70 回日本矯正歯科学会大会, 2011.10.19, 名古屋国際会議場・名古屋.
- ② 安藤淳, 山口 大, 川村亜耶, 藤田祥仁, 宇都宮忠彦, 山本浩嗣, 葛西一貴. 下顎側方偏位実験モデルにおける下顎頭軟骨の **CTGF** の病理組織学的変化および形態計測学的研究. 第 70 回日本矯正歯科学会大会, 2011.10.19, 名古屋国際会議場・名古屋.
- ③ Funakoshi M, Yamaguchi M, Asano M, nakojima R, Fujita S, kasai K. IL-8/RANKL increased by excessive orthodontic force in periodontal ligament induces orthodontically-induced inflammatory root resorption. 10th World of congress on inflammation, 25-29, June, 2011. paris, France.
- ④ Yamada K, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Ando J, Utsunomiya T, Yamamoto H, kasai K. The participation of interleukin 17 and RANKL in root resorption of the allergic mouce. 10th World of congress on inflammation, 25-29, June, 2011. paris, France.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 祥仁 (FUJITA SHOJI)
日本大学・松戸歯学部・兼任講師
研究者番号 : 80547688