

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：47131

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792125

研究課題名(和文)骨粗鬆症の顎骨骨強度と過剰咬合力による変化の解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the analytical method of the change of alveolar bone strength of the osteoporosis and hyperocclusion

研究代表者

後藤 加寿子(GOTO-T, KAZUKO)

福岡医療短期大学・その他部局等・准教授

研究者番号：60389418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症での骨強度診断法確立と補綴物装着後の骨強度維持の目的で、骨粗鬆症でのマイクロCTによる三次元画像観察、3D骨梁構造計測の形態観察による顎骨骨強度解析法の確立。骨粗鬆症患者の咬合性外傷誘発性歯槽骨吸収での骨強度減少と発症メカニズムを解明した。CCL2発現が重要であるが、CCL2欠損によりCCL3がこの発現を補償的に担うことから過剰咬合によるメカニカルストレスはCCL2とCCL3の協調的発現で咬合性外傷を誘導することが示唆された。また、XII型コラーゲンは加齢による発現減少により歯根膜線維の恒常性や安定に関与すると考えられ、この発現量が一定であることが骨質維持に重要であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：To establish the analytical method and the maintenance in the bone strength after prosthesis we firstly examined the effect of MS on relationships between chemokine expression and osteoclastogenesis using hyperocclusion models. MS induced by intermittent stretching upregulated the expression of CCL2. We secondly examined the effect of aging changes on production of collagens in bone quality of the PDL tissue by excess MS. The expression of collagen type XII in young and aged mice also increased in stimulus time dependent manner. Hyperocclusion predominantly induced CCL2 expression in PDL tissues and promoted chemotaxis and osteoclastogenesis, leading to MS-dependent alveolar bone destruction during occlusal traumatism. Furthermore, expression of collagen type XII has been suggested may be involved in homeostasis and stability of the PDL fibers, resulting in the maintenance of jaw bone quality.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨強度 骨粗鬆症 顎骨 咬合力 ケモカイン コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、骨粗鬆症疾患における骨強度は骨量に加え、骨質に関与することが明らかとなっている。この骨質を規定する因子には、骨微細構造やマイクロダメージ、石灰化度、コラーゲン架橋などの骨質因子があり、これらはすべて骨密度維持とともに骨リモデリングにより制御されている。歯科補綴物の適応は当然のことながら、高齢者の割合が多く、また高齢者特有なこれらの病状をかかえている場合は非常に多い。従って、骨粗鬆症を含めた有病者の骨強度を出来るだけ正確に把握することは、インプラントを含めた補綴物を装着した後の顎骨を正常に維持するために非常に重要なことである。現在までに、全身の骨密度と顎骨骨密度の関係について、特に骨年齢を決める手指骨と下顎骨密度が相関性を持つという報告は存在するが、骨質を考慮した骨強度の決定法とそれに伴う補綴物の適応性に関してはまだ明らかでない。

## 2. 研究の目的

この顎骨の骨強度の恒常的な維持には適度な強さの咬合力を継続的に受けることが不可欠であることが知られている。即ち、過剰な力は歯の動揺や歯槽骨の吸収を誘発し、逆に過小の場合であれば歯根膜組織の廃用性萎縮を引き起こすことが既に明らかになっている。咬合性外傷は、咬合時に歯周組織に過剰な咬合力が加わり、歯槽骨の吸収がおこり、最悪の場合、歯牙の喪失にいたることが知られている。さらに、部分床義歯を使用している症例では、鉤歯には義歯の予期せぬ横揺れにより側方力が加わり、歯槽骨の吸収を招く場合がある。このように、様々な要因による機械的刺激が歯

槽骨の吸収を招く場合があるが、咬合性外傷による歯槽骨吸収のメカニズムについて未だ不明な点が多く残されている。さらに、この治療法としても咬合調整や隣在歯との連結固定の処置以外に有用な治療及び予防法は未だ確立されていないのが現状である。そこで、本研究は骨粗鬆症における顎骨の骨質を含めた骨強度状態の診断法確立と補綴物装着後における歯槽骨の骨強度の維持を目的とした最初のステップとして、骨粗鬆症におけるマイクロCTによる三次元画像観察、3D骨梁構造計測からの形態的観察による顎骨の骨強度の解析法の確立とこの骨粗鬆症患者における咬合性外傷誘発性の歯槽骨吸収における骨強度の減少とその発症メカニズムの解明について明らかにすることを目的とする。

これらのことより、高齢者の骨質を含めた骨強度を正確に見極め、インプラントや残存歯の鉤歯としての適応性の判断に結びつく重要な役割を果たせると考える。この目的のため、まず顎骨の骨吸収関連因子の咬合性外傷誘発との関連を明らかにし、さらに歯槽骨吸収における骨強度を規定する一因子となるコラーゲンの発現について検討した。

## 3. 研究の方法

### 1. In vivo 咬合性外傷モデル

齧歯類の上顎大白歯咬合面にワイヤーを接着し、早期接触による咬合性外傷モデルを作製した。中でも顎骨の形態および免疫染色に関しては顎骨リ

モデリングに関連する調節因子を探索した(図1)。

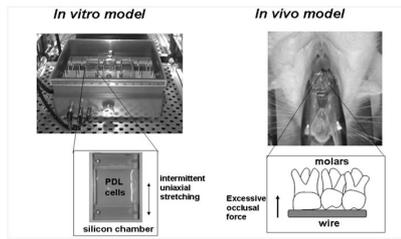


図1. 咬合性外傷モデル装置図

## 2. In vitro 咬合性外傷モデル

マウス抜去歯より単離した歯根膜細胞に過剰な進展機械的刺激を与えた in vitro モデルを用いて、in vivo 咬合外傷モデルマウスで明らかになった顎骨リモデリングに関連する調節因子の発現と変化及びこの下流シグナルについて解析した。さらに加齢と骨質の変化を観察する目的で、マウス抜去歯より単離した歯根膜細胞に過剰な進展機械的刺激を与えた in vitro モデルを用いて、コラーゲン産生能の加齢による変化について解析した。

## 4. 研究成果

(1)咬合性外傷モデルマウスを用いた解析

In vivo 咬合性外傷モデルマウスを作製し、最長7日間過剰咬合によるメカニカルストレス(MS)を与え、経時的に顎骨標本を採取した。HE染色による歯根膜腔と骨性状観察 TRAP染色による破骨細胞の出現の確認 免疫染色法による顎骨リモデリングに関連する調節因子の発現について局在性も含め検討を行った。野生型マウス(WT)の歯槽骨では、TRAP

陽性細胞は過剰 MS 刺激4日以降に増加し、同時に歯根膜に CCL2 と CCL3 発現、特に CCL2 の発現が優位に増加した(図2)。

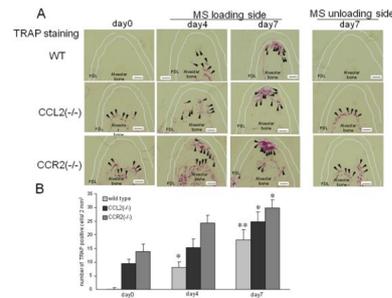


図2. 野生型(WT), CCL2欠損(CCL2(-/-)), 及びその受容体欠損(CCR2(-/-))における過剰咬合刺激によるTRAP陽性多核細胞数の変化

一方、CCL2(-/-)とCCR2(-/-)マウスの歯槽骨では、無刺激時にすでに TRAP 陽性細胞の発現がわずかに認められた。さらに、WTと比較した歯根膜に CCL3 発現が補償的に上昇した。これら CCL2(-/-)マウスにおいても TRAP 陽性多核細胞と CCL3 の発現は共に刺激依存性に増加した(図3)。

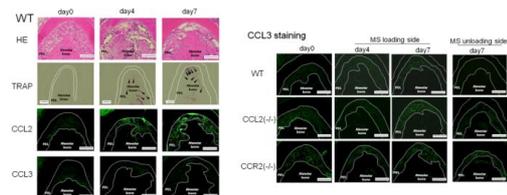


図3. 野生型(WT), CCL2欠損(CCL2(-/-)), 及びその受容体欠損(CCR2(-/-))における過剰咬合刺激によるCCL2, CCR2及びCCL3の発現の変化

以上の結果より、CCL2 は過剰 MS 刺激依存性に発現し TRAP 陽性細胞の誘導に関連することがわかった。さらに、CCL2シグナル欠損により CCL3 がこの発言を補償的に担うことから過剰咬合によるメカニカルストレスは CCL2とCCL3を協調的に発現させて咬合性外傷を誘導することが示唆された。

(2)マウス歯根膜細胞の伸展刺激による解析

マウス歯根膜細胞に持続的伸展刺激を与える *in vitro* 咬合性外傷モデルを用いて、間欠的な MS による歯根膜細胞のケモカインの発現に関して検討した。この結果、MS により歯根膜細胞に CCL2 と CCL3 発現、特に CCL2 の発現が優位に増加した (図 4)。

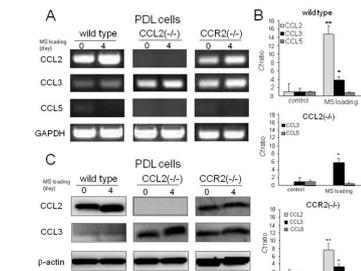


図4. 野生型(WT), CCL2欠損(CCL2(-/-)), 及びその受容体欠損(CCR2(-/-))由来の歯根膜細胞を用いて、間欠的伸展刺激を与えた時のケモカインの発現の変化

一方、CCL2 (-/-) と CCR2 (-/-) マウス由来の歯根膜細胞では、無刺激時に既に CCL3 の発現が相補的に認められ MS 依存性に発現が増加した。さらに、WT と比較した場合、MS 依存性に有意に CCL3 の発現が増加することが明らかになった。以上の結果より、CCL3 は過剰 MS 刺激依存性に発現し、CCL2 シグナルが欠損した場合、相補的に歯根膜組織に CCL3 が発現、活性化され咬合性外傷による顎骨吸収の誘発に関与することが明らかになった。

次に、この *in vitro* 咬合性外傷モデルを用いて過剰 MS による歯根膜組織の骨質の重要な決定因子であるコラーゲン産生能の加齢による変化について検討した。10 週齢 (若年) と 30 週齢 (加齢) の ddY マウスより歯根膜細胞を採取した。伸展刺激が無い場合、線維形成型コラーゲンの I 型コラーゲン mRNA、タンパク質の発現量は 10 週齢と 30 週齢に違いは認められなかったが、歯根膜に発現が多く線維結合型コラーゲンの XII 型コラーゲンの mRNA、タンパク質の発現は共に 10 週齢と比較して 30 週齢では 5 分の 1 程度であった (図

5)。

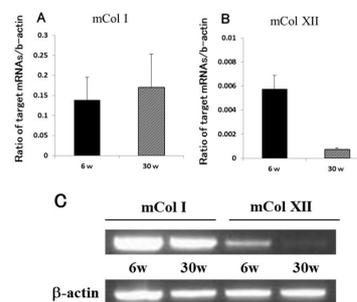


図5. 非刺激状態での若年、加齢mPDL cellにおけるI型コラーゲン、XII型コラーゲン mRNA発現量の比較

さらに、伸展刺激依存性に若年及び加齢マウス由来の I 型コラーゲンの mRNA 発現は刺激時間依存的に上昇した。一方、XII 型コラーゲン mRNA は若年由来の細胞では時間依存的な上昇を認めたが、加齢由来の細胞では 2 日目に最も上昇し、その後減少する傾向が見られた。以上の結果より、歯根膜細胞は、加齢とともに XII 型コラーゲン mRNA 産生能が低下し、若年マウスのような MS 依存性の時間依存的な上昇も観察されなかった。さらに、加齢マウスでの歯根膜芽細胞は細胞間での秩序ある配列が乱れており、若年マウスに観察されたような過剰咬合受容後の細胞間配列の回復も観察されなかった (図 6)。これらのことから、XII 型コラーゲンは歯根膜線維の恒常性や安定に関与する可能性が示唆された。

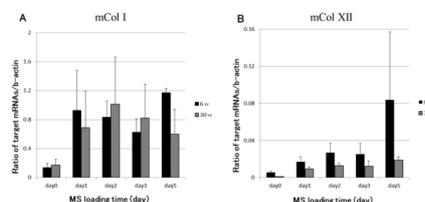


図6. 伸展刺激による若年、加齢mPDL cellにおけるI型コラーゲン、XII型コラーゲン mRNA発現量の時間的変化

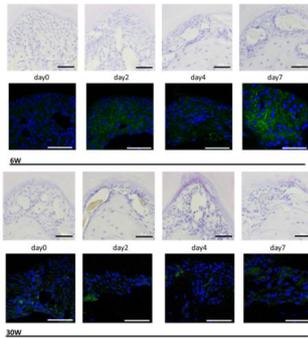


図7 若年(6週齢)及び加齢(30週齢)マウス下顎第一臼歯分岐部におけるH/E染色及び抗XII型コラーゲン抗体による免疫染色像の経時的変化。スケール=50 $\mu$ m

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tsutsumi T, Kajiya H, Goto KT, Takahashi Y, Okabe K.

Hyperocclusion up-regulates CCL3 expression in CCL2- and CCR2-deficient mice.

*J Dent Res* 90:65-70(2013) (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

Tsutsumi T, Kajiya H, Goto K, Nagaoka Y, Okamoto F, Okabe K.

The novel roles of CCL2 and CCL3 on osteoclast differentiation and alveolar bone resorption during occlusal traumatism.

国際骨代謝学会 (IBMS)・日本骨代謝学会 (JSBMR) 第2回合同国際会議、2013年5月28日~6月1日、神戸

Tsutsumi T, Kajiya H, Goto K, Takahashi Y, Okabe K.

Expression C-C chemokine ligands for osteoclastogenesis induced by hyperocclusion.

アメリカ骨代謝学会(ASBMR), 2013年10月3日~10月7日、アメリカ(ボルチモア)

都築 尊、鍛冶屋 浩、後藤 加寿子、堤貴司、岡部 幸司

メカニカルストレスによる歯根膜組織のコラーゲン産生能の加齢による変化

日本骨代謝学会学術集会、2014年7月24日~7月26日、大阪国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

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)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

後藤 加寿子 (GOTO-T KAZUKO)

福岡医療短期大学・歯科衛生学科・准教授  
研究者番号：60389418