

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893020

研究課題名(和文) 矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜でのScleraxisの発現解析

研究課題名(英文) Analysis of scleraxis expression in the periodontal ligament using experimental tooth movement

研究代表者

川津 正慶 (KAWATSU, MASAYOSHI)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：70712925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Scleraxis (Scx)は歯根膜を含む腱・靭帯組織で発現する転写因子である。本研究では矯正歯の移動実験を行い、歯根膜でのScxの発現を解析した。歯根膜の牽引側ではScxの発現は上昇し、圧迫側では低下した。牽引側ではScxの上昇に伴い、活性型transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1)の検出とTGF- $\beta$ 1シグナリング分子であるSmad3のリン酸化の亢進が認められた。培養歯根膜細胞でもTGF- $\beta$ 2添加によるScxの発現上昇が認められたことから、牽引力によるScxの発現上昇は、TGF- $\beta$ 1/Smad3シグナリング経路を介して調節されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Scleraxis (Scx), a transcription factor, is predominantly expressed in tendons and ligaments including the periodontal ligament (PDL). In this study, we investigated Scx expression in the PDL during experimental tooth movement. Scx expression was significantly up-regulated on the tension side of the PDL, whereas it was down-regulated on the compression side. Up-regulation of Scx was followed by activation of the transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) signaling as evidenced by detection of increased active-TGF- $\beta$ 1 and the significant increase of phospho-Smad3 positive PDL fibroblasts on the tension side. TGF- $\beta$ 2 positively regulated the expression of Scx in cultured PDL fibroblasts. These findings suggest that tensile force responsive up-regulation of Scx in the PDL is mediated through activation of the TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Scleraxis 歯根膜細胞 メカニカルストレス

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯槽骨と歯のセメント質を連結する型コラーゲンの豊富な靭帯組織で、咀嚼、発音、嚥下などのメカニカルストレスに曝されている。歯根膜は組織再生の重要なターゲットになっているにも関わらず、これまで特異的分化マーカーがあまり知られていない。そのため、生理的・矯正歯の移動に伴った歯根膜自体のリモデリングの分子メカニズムに関しては不明な点が多い。

矯正歯科治療における歯の移動は、継続的なメカニカルストレスを介することで達成される。矯正力が負荷された歯根膜とその周囲歯槽骨では牽引領域および圧迫領域を生じ、歯根膜と歯槽骨のリモデリングを伴う。歯根膜中の歯根膜線維芽細胞はメカノセンサーを有しており、牽引力や圧迫力といった機械的刺激に応答して、様々な遺伝子発現の変化を引き起こされることが知られている。しかし、個々の遺伝子発現を制御する転写因子が、歯根膜に負荷されるメカニカルストレスに対してどのように応答するかについてはほとんど報告されていない。また、メカノセンサーはメカニカルストレスを直接感知し応答する分子機構であるが、この「直接応答」を個体レベルで解析する実験系、実験モデルを構築することは現時点では極めて困難である。

Scleraxis(Scx)は靭帯・靭帯形成領域で発現する basic helix-loop-helix 型転写因子である。Scx のノックアウトマウスでは靭帯が低形成となることが明らかとなっており、Scx は靭帯細胞の分化および成熟において重要な役割を担っていると考えられている。また、Scx は、靭帯・靭帯の主要な構成分子である *Type I Collagen* および *Tenomodulin* の発現を調節することにより、機能的な靭帯・靭帯の形成や維持にも関与していると考えられる。マウスのアキレス靭帯を用いた実験から、靭帯細胞での Scx 発現は、生理的なメカニカルストレ

スによって維持されていることが報告されている。しかしながら、靭帯・靭帯における牽引と圧迫のメカニカルストレスに反応して、Scx の発現がどのように変化するかについては明らかになっていない。近年、我々の研究グループは、歯根膜でも歯根形成に伴って Scx の発現が誘導されていることを見出している。しかしながら、歯根の形成後、矯正力を負荷することによって、早期における歯根膜での Scx の発現のプロファイルに関して詳細な解析を行った研究報告はない。

## 2. 研究の目的

歯根膜での Scx の発現制御の機構を解析する。歯根膜を含む靭帯・靭帯の Scx の発現領域で GFP (Green Fluorescent Protein) を高いレベルで発現するトランスジェニックマウス (*ScxGFP Tg* マウス) のラインを使用し、矯正歯の移動実験を行うことで、歯根膜における牽引および圧迫のメカニカルストレスに対する Scx の発現の応答性を明らかにする。また、様々な細胞内シグナリング分子の局在を、蛍光免疫二重染色により Scx の発現と関連づける。 *In vitro* の実験系では、培養歯根膜細胞を用いて、Scx の発現調節におけるシグナリングの関与について検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 矯正歯の移動モデル

矯正歯の移動実験には、9 週齢の雄性 *ScxGFP Tg* マウスを用いた。施術は 30mg/kg ベントバルビタールの腹腔内注射による全身麻酔下で行った。矯正歯の移動モデルとして上顎左側第一臼歯と第二臼歯の間に、Waldo 法に従い elastic バンドを挿入し実験群とした。なお、elastic バンドを挿入していない右側上顎骨を実験的歯の移動の対照群(0 時間)とした。第一臼歯と第二臼歯間の距離の評価としては屠殺時に全身麻酔下にて、個人トレーを用いてシリコーン印象材に

よる精密印象を採得後、超硬石膏により上顎歯列の模型を作成した。模型をトリミング後、スキャニングして、計測した。

#### (2) 非脱灰凍結切片の作製および免疫染色

深麻酔下において、4% paraformaldehyde (PFA)および20% Sucrose 含有4% PFAを用いて経心的灌流固定を行った。上顎骨を摘出し、4の条件下で3時間20% Sucrose 含有4% PFAに浸漬し、凍結包埋剤を用いてドライアイス投入したヘキサンの中で凍結包埋した。非脱灰凍結切片は、クライオスタットを用いて、川本法に準じて作成した。すなわち、試料を凍結切片支持用粘着フィルムに密着させ、タングステンカーバイド製ナイフを用いて咬合面に平行に4 μmで薄切した。切片面を100%エタノールに浸け、次いで4% PFAに5分間浸漬した。石灰化組織中の蛋白質の抗原部位は、切片を0.25 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)に室温で浸漬し、1時間の脱灰処理を行って露出させた。牽引領域および圧迫領域のScxおよび各種シグナル伝達系の活性化をシグナル分子のリン酸化を認識する抗体により二重免疫染色によって検出し、Scxの発現の変化と関連付けながら、Scxの発現に関する因子を特定した。免疫染色画像は、蛍光顕微鏡、デジタルカメラを用いて撮影した。画像は、撮影後の凍結切片にヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を行った。

#### (3) 歯根膜細胞培養

4週齢雄性Wistar/STラットを頸椎脱臼により屠殺した後、上下顎臼歯を抜歯し、phosphate buffer saline (PBS)で洗浄してから歯根中央部の歯根膜組織を採取した。歯根膜組織はアウトグロース法に従って培養した。本研究では第3継代歯根膜細胞を使用した。すべて37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下にて培養を行った。

#### (4) 種々の成長因子の添加

歯根膜細胞をtype I collagenでコーティ

ング処理した24-wellプレートに $2.5 \times 10^4$  cells/wellの細胞密度にて播種して培養した。種々の成長因子に対する歯根膜細胞の反応性を見るために、コンフルエントの状態になったことを確認して、培地を0.5% fetal bovine serum (FBS)に置換し、一晩静置した。0.1% bovine serum albumin (BSA)、transforming growth factor-beta2 (TGF-2)、bone morphogenetic protein (BMP)-4、growth differentiation factor (GDF)-5およびfibroblast growth factor (FGF)-2を添加し培養を行った。歯根膜細胞からtotal RNAおよびタンパクを抽出した。抽出したRNAからScx遺伝子の発現をリアルタイムPCRにて測定した。また、ウェスタンブロット解析により各種シグナリング分子の活性化を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 矯正歯の移動による牽引側および圧迫側におけるScxの発現プロファイルについて

Elasticバンド挿入後、1時間以内では上顎第一臼歯と第二臼歯間距離の拡大が認められなかったが、3時間以降で認められた。上顎第一臼歯と第二臼歯間距離は6時間から24時間で有意に増加した。矯正歯の移動を行って、歯根膜におけるScxの発現を解析した結果、elasticバンド挿入後、HE染色から、牽引側の3時間では0時間と比較して歯根膜の幅が広がり、細胞が伸展されていた。一方、圧迫側の3時間では0時間と比較して幅が狭くなって圧縮されたような形を呈していた。次に歯根膜の牽引側および圧迫側におけるScx発現のプロファイルについて詳細に解析した。牽引側では、Scxの発現レベルが高い細胞の割合が3時間で有意に増加した。一方、圧迫側では6時間で有意に減少した。これらの結果から、Scxはメカニカルストレスに反応性を示し、実験的歯の移動モデルにおいて、

牽引側と圧迫側で異なった発現調節がなされていることが示唆された。

(2) 歯根膜における様々な細胞内シグナリング分子の局在について

牽引側では Scx の上昇に先立って、活性型 TGF- $\beta$ 1 の検出と TGF- $\beta$ 1 シグナリング分子である Smad3 のリン酸化の亢進が認められた。牽引側の歯根膜では、0 時間と比較して 3 時間と 6 時間で活性型 TGF- $\beta$ 1 を多く検出した。一方、圧迫側の歯根膜では著しい変化はなかった。牽引側の歯根膜細胞における phospho-Smad3 (p-Smad3) 陽性細胞の割合は、3 時間から有意に増加した。一方、圧迫側の歯根膜においては、圧迫力に伴い Scx の発現が低下することから全歯根膜細胞から p-Smad3 陽性細胞を算出することが出来なかった。

(3) 培養歯根膜細胞における種々のシグナリングについて

TGF- $\beta$ 2 で Scx の発現レベルが最も上昇した。また FGF-2 においても上昇を認めた。BMP-4 および GDF-5 では Scx の発現レベルに顕著な変化は認められなかった。またウェスタンブロットから TGF- $\beta$ 2 の添加により Smad2 および Smad3 のリン酸化の亢進を認めた。このことから、牽引側での歯根膜での Scx の発現調節には TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 シグナリング経路を介して調節されている可能性が示唆された。

## 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 1 件 )

Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C.  
Scleraxis and osterix antagonistically regulate tensile force-responsive

remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone., Development., 査読有, 2015, 142(4):787-796

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

川津正慶、岩崎将也、清流正弘、池田悦子、滝本晶、宿南知佐、山本照子  
歯根膜細胞における伸展刺激に応答した Scleraxis 発現調節メカニズムの解析  
第 72 回日本矯正歯科学会大会, 2013 年 10 月 7 日 ~ 9 日、キッセイ分化ホール ( 長野県松本市 )

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川津 正慶 ( KAWATSU, MASAYOSHI )  
東北大学・大学病院・医員  
研究者番号 : 70712925