

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861771

研究課題名(和文)咬合状態の変化が成長期の骨代謝へ与える影響 - 咬合異常マウスモデルを用いた検討

研究課題名(英文) Evaluation of the effects of occlusal disharmony-induced stress on bone metabolism during growth period in mice

研究代表者

清水 康広 (Shimizu, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60631968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、咬合異常ストレスが全身の骨代謝に与える影響の詳細を、咬合異常マウスモデルを用いて明らかにすることを目的とした。装置未装着の対照群と比較して咬合異常群の血中 corticosterone濃度は有意に上昇し、脛骨および大腿骨の骨密度は有意に減少していた。脛骨近心2次海綿骨部における骨形態計測の結果、骨形成指標は有意に減少していたが、骨吸収指標の上昇は認めず、血清中の骨代謝マーカーはその結果をほぼ裏付けていた。なお、屠殺時に両群間の体重に有意差は認められなかった。これらのことから成長期における咬合異常は血中ストレスホルモンを上昇させ、全身骨密度の低下をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate whether occlusal disharmony-induced stress decreases bone mass. Five-week-old C57BL/6J male mice were used. A 0.5-mm increase in the vertical height of occlusion was used to induce occlusal disharmony for a period of 7 days. Serum corticosterone levels were significantly higher on post-induction day 7, with radiological evidence of osteopenia of long bones of the hind limbs. Osteopenia was associated with a reduction of the mechanical properties of the tibia and femur, with a significant suppression of bone formation parameters as evaluated by bone histomorphometric analysis of the tibial metaphysis. Our findings at the level of bones were supported by our assessment of serum markers of systemic metabolism. Therefore, occlusal disharmony-induced stress may lead to osteopenia and reduce the mechanical strength of the bone through an increase in serum glucocorticoid levels in mice.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：咬合異常 グルココルチコイド 骨形態計測

1. 研究開始当初の背景

これまでの動物実験において、成長期における咬合異常が副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドを増加させることが報告されてきた (J Dent Res 2001, Neuroscience Letters. 2009, 2011, 2013)。過剰のグルココルチコイドは、成長期において骨成長障害と骨の脆弱化を引き起こす (JBMR. 1999, Endocrinology. 2004, J Clin Invest. 2006)ため、咬合異常が全身の骨代謝へ影響を与えている可能性は大きい。しかしながら、咬合異常と全身の骨代謝の関連についてはこれまで検討されていない状況であった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに採択された科研費において今回の課題で使用予定のマウス咬合異常モデルを確立し、咬合異常が全身の骨密度に影響を与える可能性を示してきたが、今回は末梢骨用定量的 CT (pQCT)による骨密度や骨強度の評価に加え、組織学的形態計測法や骨代謝マーカーを使用した生化学的解析により、咬合異常と全身の骨代謝との関連性におけるメカニズムの詳細を、さらに明らかにする目的で研究を行った。

3. 研究の方法

実験動物として、成長期に当たる 5 週齢の C57BL/6 mice を用いた。咬合の不調和が骨代謝や骨成長に及ぼす影響をマウス咬合異常モデルにて検討した。咬合異常群は上下顎切歯にレジンを築盛することで作成した。屠殺時に眼窩静脈叢より血液を採取し、血清中のグルココルチコイド濃度を測定し、咬合異常マウスにおける副腎皮質ホルモンの上昇を確認した。観察部位の下肢骨に対して、末梢骨用定量的 CT (pQCT)による骨密度や骨強度の評価を行った。組織学的な形態計測を行い、石灰化速度や骨形成率といった動的パラメータの評価を行った。また、生化学的解析により、血清中の骨形成マーカーであるオステオカルシン濃度と骨吸収マーカーである骨型酒石酸抵抗性産生フォスファターゼ (TRAP-5b) 濃度を EIA 法により評価した。さらに咬合異常付と前後における尿中の骨吸収マーカーである骨由来コラーゲン C 末端テロペプチド (CTX) を EIA 法により測定した。

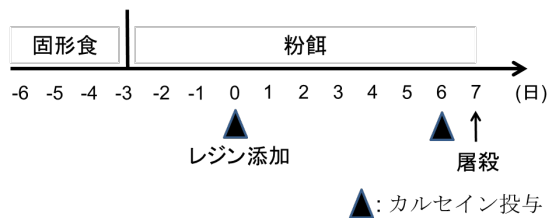
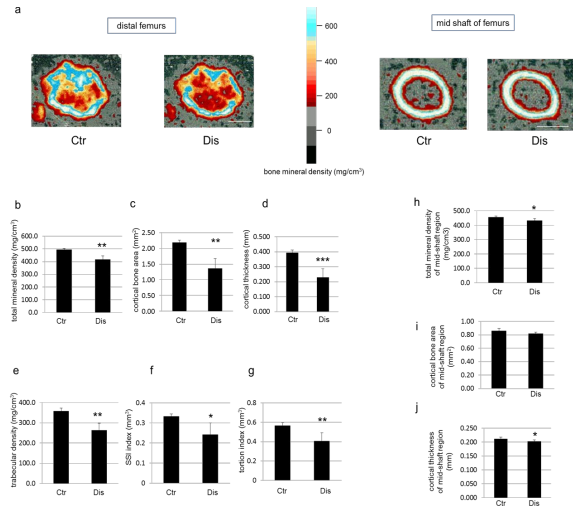


図 1 実験タイムスケジュール

4. 研究成果

まずはこれまでの報告と同様に、装置未装着の対照群と比較して咬合異常群の血中 corticosterone 濃度は有意に上昇していた。

pQCT を用いて装置装着 1 週間後の大腿骨遠心端および骨幹部において放射線学的検討を行ったところ、脛骨と同様に咬合異常群の骨密度は有意に減少し、骨の強度指標 (SSI 値) は有意に減少していた。



(b-g:遠心端、h-j:骨幹部)

a: マウス大腿骨遠心端および骨幹部

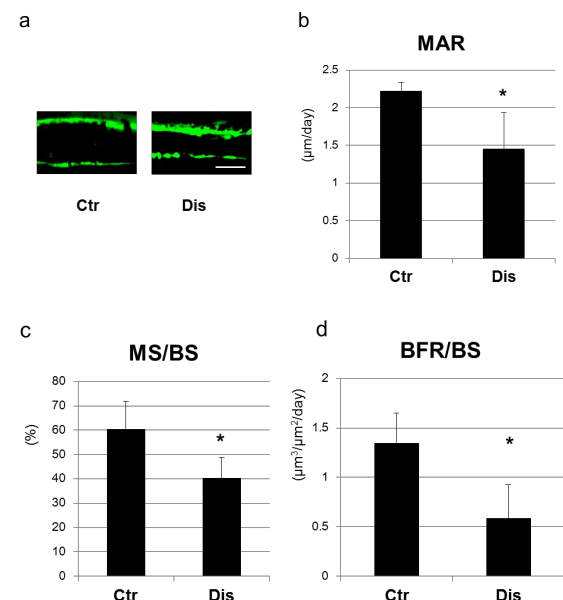
b: 全骨密度、c:皮質骨断面積、d: 皮質骨厚

e: 海綿骨密度、f: Y 軸 SSI、g: 極座標 SSI

h: 全骨密度、i: 皮質骨断面積、j: 皮質骨厚

(Ctr:対照群, Dis:咬合異常群)

組織学的解析として、装置装着 1 週間後の脛骨近心 2 次海綿骨部において骨形態計測を行ったところ、骨形成指標は有意に減少していた。また、生化学的解析において装置装着翌日の血清マーカーは有意に減少していた。



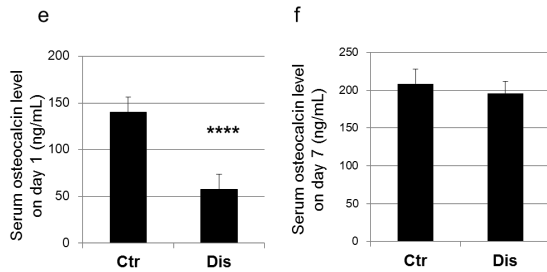


図3 骨形成指標

a:骨形成ラベリング長、b:骨石灰化速度

c:骨石灰化面、d:骨形成速度

e: 1日目の血清中骨形成マーカー、f: 7日目の血清中骨形成マーカー

(Ctrl:対照群, Dis:咬合異常群)

一方で骨吸収指標は対照群と比較して有意な上昇は認められなかった。

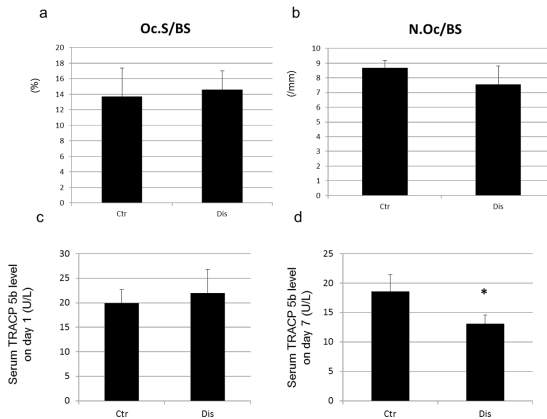


図4 骨吸収指標

a:破骨細胞面、b:破骨細胞数

c:1日目の血清中骨吸収マーカー、d:7日目の血清中骨吸収マーカー

(Ctrl:対照群, Dis:咬合異常群)

さらに、装置装着前後において尿中のCTX濃度(吸収系マーカー)の評価を行ったところ、有意差は認められなかった。

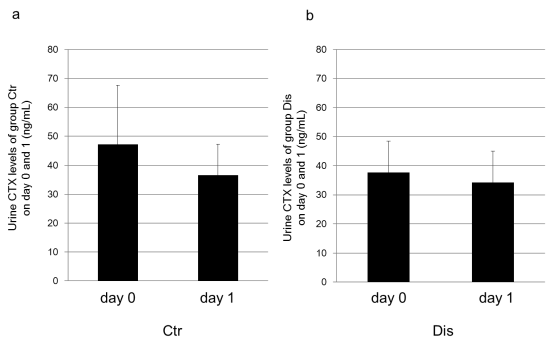


図5 装置装着前(day 0)および装着後(day 1)における尿中CTX濃度

a:対照群、b:咬合異常群

(Ctrl:対照群, Dis:咬合異常群)

また、咬合異常マウスにおける全身骨の成長障害を検討するべく脛骨長を計測したところ、実験群において有意に減少していた。

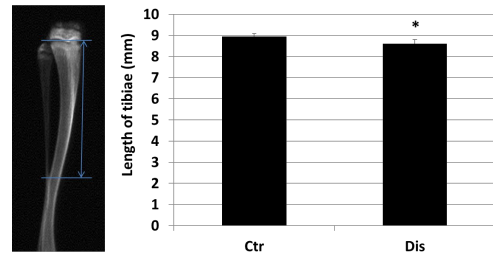


図6 マウス脛骨長

(Ctrl:対照群, Dis:咬合異常群)

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)(すべて査読あり)

1. Hosomichi J, Kuma YI, Oishi S, Nagai H, Maeda H, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T.

Intermittent hypoxia causes mandibular growth retardation and macroglossia in growing rats.

Am J Orthod Dentofacial Orthop. 151(2):363-371, 2017.

doi: 10.1016/j.ajodo.2016.02.033.

2. Shuji Oishi, Yasuhiro Shimizu, Jun Hosomichi, Yoichiro Kuma, Hideyuki Maeda, Hisashi Nagai, Risa Usumi-Fujita, Sawa Kaneko, Naoki Shibutani, Jun-ichi Suzuki, Ken-ichi Yoshida, Takashi Ono.

Intermittent Hypoxia Influences Alveolar Bone Proper Microstructure via Hypoxia-Inducible Factor and VEGF Expression in Periodontal Ligaments of Growing Rats.

Front. Physiol. 16;7:416, 2016.

doi: 10.3389/fphys.2016.00416.

3. Arai Y, Aoki K, Shimizu Y, Tabata Y, Ono T, Murali R, Mise-Omata S, Wakabayashi N. Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model.

Eur J Pharmacol. 5;782:89-97, 2016.

doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.049.

4. Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Kuma Y, Nagai H, Maeda H, Usumi-Fujita R, Kaneko S, Shitano C, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Intermittent hypoxia induces disturbances in craniofacial growth and discrepancies in craniofacial morphology.

Archives of Oral Biology. 61:115-24, 2016.

doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.017.

5. Kato G, Shimizu Y, Arai Y, Suzuki N, Sugamori Y, Maeda M, Takahashi M, Tamura Y, Wakabayashi N, Murali R, Ono T, Ohya K,

Mise-Omata S, Aoki K.
The inhibitory effects of a RANKL-binding peptide on articular and periarticular bone loss in a murine model of collagen-induced arthritis: A bone histomorphometric study.

Arthritis Research & Therapy. 17:251, 2015.

doi: 10.1186/s13075-015-0753-8.

6. Kuma Y, Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Oishi S, Maeda H, Nagai H, Shimizu Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki JI, Yoshida KI, Ono T.

Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats.

Arch Oral Biol. 59(11):1139-45. 2014.

doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.06.005.

7. Shimizu Y, Hosomichi J, Nakamura S, Ono T.

Micro-computed tomography analysis of changes in the periodontal ligament and alveolar bone proper induced by occlusal hypofunction of rat molars.

Korean J Orthod. 44(5):263-7, 2014.

doi: 10.4041/kjod.2014.44.5.263.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 清水慶広、青木和広、加藤玄樹、小野卓史

咬合異常に伴うストレスはマウス椎骨・長管骨骨密度の低下をもたらす

第 75 回日本矯正歯科学会大会、2016/11/7-9、アスティとくしま(徳島県・徳島市)

2. 山口博之、石田雄之、細道純、畑野香澄、笠原由紀、大石修史、隈陽一郎、沖藤明日香、臼見莉沙、清水慶広、渋谷直樹、金香佐和、渡邊亮、鈴木淳一、小野卓史

超音波マイクロバブル法を応用した歯周組織への新規 NF- B デコイ導入法の開発

第 75 回日本矯正歯科学会大会、2016/11/7-9、アスティとくしま(徳島県・徳島市)

3. 畑野香澄、石田雄之、山口博之、細道純、鈴木淳一、笠原由紀、大石修史、隈陽一郎、沖藤明日香、臼見莉沙、清水慶広、渋谷直樹、金香佐和、小野卓史

SDF-1/CXCR4 シグナル阻害はラット臼歯の矯正移動を遅延する

第 75 回日本矯正歯科学会大会、2016/11/7-9、アスティとくしま(徳島県・徳島市)

4. Oishi Shuji, Shimizu Yasuhiro, Hosomichi Jun, Kuma Yoichiro, Maeda Hideyuki, Nagai Hisashi, Kaneko Sawa, Ishida Yuji, Shibutani Naoki, Usumi-Fujita Risa, Yamaguchi Hiroyuki, Suzuki Jun-ichi, Yoshida Ken-ichi, Ono Takashi.

Intermittent hypoxia influences bone microstructure via hypoxia inducible factor and VEGF in growing rats.

10th Asia Pacific Orthodontic Congress, 2016/9/1-3, Bali (Indonesia)

5. 新井祐貴、青木和広、清水慶広、田村幸彦、小野卓史、三瀬節子、Murali Ramachandran、若 則幸

ペプチドが誘導する抜歯後の新生骨形成および歯槽骨保護:BMP-2 誘導マウス抜歯窩骨新生モデルによる検証研究

第 36 回日本骨形態計測学会、2016/6/23-25、新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

6. Yuki Kasahara, Risa Usumi-Fujita, Jun Hosomichi, Sawa Kaneko, Yuji Ishida, Naoki Shibutani, Yasuhiro Shimizu, Asuka Okito, Shuji Oishi, Yoichiro Kuma, and Takashi Ono.

Effect of low-intensity pulsed ultrasound on periodontal tissues in occlusal hypofunctional teeth.

The Annual Dental Scientific Conference in Ho chi minh city, 2016/4/5, Ho chi minh city (Vietnam)

7. Shuji Oishi, Yasuhiro Shimizu, Jun Hosomichi, Yo-ichiro Kuma, Risa Usumi-Fujita, Hideyuki Maeda, Hisashi Nagai, Chisa Shitano, Sawa Kaneko, Yuji Ishida, Jun-ichi Suzuki, Ken-ichi Yoshida, Takashi Ono.

The effects of intermittent hypoxia on the microstructure of growing craniofacial bones.

Sleep, 2015/6/6-10, Seattle (USA)

8. Yo-ichiro Kuma, Risa Usumi-Fujita, Jun Hosomichi, Shuji Oishi, Yasuhiro Shimizu, Hisashi Nagai, Hideyuki Maeda, Chisa Shitano, Sawa Kaneko, Yuji Ishida, Jun-ichi Suzuki, Ken-ichi Yoshida, Takashi Ono.

Intermittent hypoxia induces changes in the expression of the angiogenic factor, nitric oxide synthase 3, with impaired growth of the nasal airway.

Sleep, 2015/6/6-10, Seattle (USA)

9. Jun Hosomichi, Yo-ichiro Kuma, Shuji Oishi, Risa Usumi-Fujita, Yasuhiro Shimizu, Hideyuki Maeda, Hisashi Nagai, Chisa Shitano, Sawa Kaneko, Yuji Ishida, Jun-ichi Suzuki, Ken-ichi Yoshida, Takashi Ono.

Sleep, 2015/6/6-10, Seattle (USA)

10. Jun Hosomichi, Yuta Nakai, Hideyuki Maeda, Yo-ichiro Kuma, Shuji Oishi, Risa Usumi-Fujita, Yasuhiro Shimizu, Sawa Kaneko, Yuji Ishida, Naoki Shibutani, Ken-ichi Yoshida, Takashi Ono.

Intermittent hypoxia triggers inflammatory pathway with down-regulated myofibrillar and mitochondrial biogenesis in the geniohyoid muscle.

第 74 回 日本矯正歯科学会学術大会、福岡

国際会議場(福岡県・福岡市) 2015/11/18-20
11. 大石修史、**清水康広**、細道純、金香佐和、
渋谷直樹、白見莉沙、舌野知佐、隈陽一郎、
中井雄太、鈴木淳一、永井恒志、前田秀将、
吉田謙一、小野卓史

間欠的低酸素暴露は成長期ラット歯槽骨の
骨微細構造に影響を与える

第 74 回 日本矯正歯科学会学術大会、福岡
国際会議場(福岡県・福岡市) 2015/11/18-20
12. Matsumoto Y, Hoshomichi J, Ishida Y,
Ohmori H, **Shimizu Y**, Kyuragi T, Shitano C,
Kawabe A, Maekawa M, Ikeda Y, Kirii A, Kita
S, Sakaguchi T, An J, Yamada K, Suzuki K,
Ono T.

Root resorption of maxillary incisors
associated with ectopically erupting
canines: predisposing factors, diagnosis
and prognosis of orthodontic treatment.

8th The International Orthodontic
Congress 2015/9/27-30, London (UK)

13. 新井祐貴、**青木和広**、三瀬節子、**清水康
広**、小野卓史、若林則幸

マウス抜歯窩に局所適用した RANKL 結合ペプ
チドと BMP-2 の併用による骨形成促進作用の
評価

第 35 回日本骨形態計測学会、倉敷市芸文館
(岡山県・倉敷市) 2015/6/4-6

14. 加藤玄樹、**清水康広**、菅森泰隆、田村幸
彦、小野卓史、大谷啓一、**青木和広**

II 型ウシコラーゲン誘導のマウス関節リウ
マチモデルを用いた RANKL 結合ペプチドの
骨形成促進作用と骨吸収抑制作用

第 56 回歯科基礎医学会学術大会、福岡国際
会議場(福岡県・福岡市) 2014/9/25-27

15. 大石修史、**清水康広**、細道純、隈陽一郎、
前田秀将、白見莉沙、金香佐和、舌野知佐、
鈴木淳一、吉田謙一、小野卓史

成長期ラットにおける間欠的低酸素曝露は、
骨成長障害とともに関節頭海綿骨の骨密度
増生をもたらす

第 73 回日本矯正歯科学会大会、幕張メッセ
(千葉県・千葉市) 2014/10/20-22

16. 細道純、隈陽一郎、大石修史、永井恒志、
金香佐和、白見莉沙、**清水康広**、舌野知佐、
石田雄之、鈴木淳一、吉田謙一、小野卓史

成長期の間欠的低酸素曝露は、ラット顎顔面
の成長障害とともに舌の肥大および下顎歯
列の拡大をもたらす

第 73 回日本矯正歯科学会大会、幕張メッセ
(千葉県・千葉市) 2014/10/20-22

17. 沖藤明日香、中浜健一、細道純、舌野知
佐、白見莉沙、**清水康広**、石田雄之、金香佐
和、森田育男、小野卓史

骨芽細胞の破骨細胞支持能の獲得における
プロトンセンサーGPR4 の関与

第 73 回日本矯正歯科学会大会、幕張メッセ
(千葉県・千葉市) 2014/10/20-22

18. Shuji Oishi, **Yasuhiro Shimizu**, Jun
Hosomichi, Yo-ichiro Kuma, Hideyuki Maeda,
Hisashi Nagai, Sawa Kaneko, Jun-ichi

Suzuki, Ken-ichi Yoshida, Takashi Ono.
Disturbance of maxillofacial bone growth
induced by intermittent hypoxia in growing
rats.

Sleep 2014, 2014/5/31-6/4, Minneapolis
(USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 康広 (Yasuhiro Shimizu)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・非
常勤講師
研究者番号：60631968

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

青木 和広 (Aoki Kazuhiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：40272603