

令和元年6月17日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07199

研究課題名(和文) 矯正学的歯の移動時に歯根膜で発現するMMP12による血管新生の制御

研究課題名(英文) Regulation of angiogenesis by MMP12 expressed in periodontal ligament during orthodontic tooth movement

研究代表者

成宮 毅 (Narimiya, Tsuyoshi)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：00803074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で歯の移動時に生じる牽引側歯根膜の歯根膜線維細胞は、伸展負荷時にマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP12)を発現し血管の基底膜を構成するコラーゲンタイプIVを分解することを明らかにした。しかし、伸展負荷時に歯根膜線維芽細胞から発現するMMP12の制御機構は不明な点が多い。今回の研究では、伸展刺激負荷時にヒト歯根膜線維芽細胞が細胞シグナル分子であるERKを経由してMMP12を発現している可能性を明らかにした。またMMP12と血管新生の関係および牽引側歯根膜での出芽型血管新生の可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

矯正歯科治療における歯の移動では、移動方向の歯根膜が圧迫され、反対側の歯根膜は牽引される。歯の移動時の牽引側歯根膜での報告は少なく組織リモデリングに関して不明な点が多い。牽引側歯根膜では歯根膜線維の再構成、骨添加などの大規模な組織リモデリングが起こることが想定される。組織リモデリングに必要な栄養供給源として新たな血管すなわち血管新生を必要とするが、牽引側歯根膜における血管新生の報告は限られており、明らかになっていない。牽引側歯根膜の血管新生メカニズムの解明は、血管制御を可能とし、組織リモデリングの制御は、治療期間の短縮をもたらし、すべての血管研究に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the orthodontic tensile strain upregulates MMP12 expression in periodontal ligament cells and induces angiogenesis via degradation of CollIV in the vascular endothelial basement membrane. However, it remains unknown the molecular regulatory mechanism of MMP12 worked in periodontal ligament cells by tensile strain. This study has clarified that human periodontal ligament cells upregulate MMP12 expression via ERK, cell signaling molecule, by tensile strain. It has also revealed the relationship between MMP12 and angiogenesis and the existence of angiogenesis with sprouting in the tension zone.

研究分野：歯科矯正

キーワード：MMP12 歯の移動 歯根膜 血管新生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯根膜は他の結合組織と比較して修復能力に優れた組織である。矯正治療では歯に物理的な力を付与すると歯槽骨内で歯が移動する。これらの組織リモデリングには細胞および栄養供給が必要であり、その供給経路として血管新生が生じていると考えられる。歯の移動中の牽引側歯根膜組織において血管数の増加や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や線維芽細胞増殖因子 2 (FGF-2) の発現が観察されていることから、歯の移動中の歯根膜組織で血管新生が生じていることが考えられる。これまでに伸展側歯根膜で MMP12 が発現上昇し、その MMP12 が血管基底膜を構成する IV 型コラーゲンを分解することで血管新生が起こる可能性を報告した。しかし血管新生時の血管内皮細胞の詳細な状態およびメカニカルストレスによる歯根膜線維芽細胞の MMP12 発現制御の詳細なメカニズムは不明である。

### 2. 研究の目的

牽引側歯根膜での血管新生研究はこれまで、VEGF などの血管新生促進に關与するサイトカイン、IV 型コラーゲンの分解の有無などの単発的かつ間接的な解析に留まっている。したがって、牽引側歯根膜で起こると想定される伸展刺激負荷による歯根膜線維芽細胞の MMP12 の発現から、血管新生の有無までを網羅的に解析する必要性がある。

本研究の目的は、歯の移動時の歯根膜組織で起こる血管新生時の出芽中の血管内皮細胞の状態とメカニカルストレスにより歯根膜線維芽細胞が発現する MMP12 の制御機構を明らかにし、矯正学的歯の移動時の歯根膜組織で起こる血管新生の詳細なメカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 伸展刺激負荷時の歯根膜線維芽細胞の MMP12 発現のシグナル伝達経路の解明

我々は 24 時間持続的伸展刺激負荷を行ったヒト歯根膜線維芽細胞で、MMP12 発現上昇を mRNA およびタンパクレベルで確認している。今回、持続的伸展負荷により MAPK 経路関連分子の ERK に着目し MMP12 発現との関係を調べる。具体的には阻害剤を用いて細胞内シグナル分子 ERK の抑制を行い、伸展刺激時の MMP12 発現を mRNA およびタンパクレベルで確認する。

#### (2) 矯正学的歯の移動時の歯根膜組織で発現する MMP12 と血管新生の関係の解明

歯の移動時の歯根膜組織で発現上昇する MMP12 の血管新生への影響  
これまでに歯の移動中の歯根膜組織の血管動態を詳細に調べるために、ラット臼歯移動後に造影剤を血行性に灌流し、CT 撮影を行い、牽引側歯根膜組織で新生血管数の増加を確認したが、MMP12 による影響は解析できなかった。そこで今回、MMP12 特異的阻害剤である MMP408 の骨膜下注射を行い、歯の移動時の歯根膜組織の MMP12 活性を抑制し、歯の移動時の歯根膜組織の CT 解析により、MMP12 活性阻害による血管新生への影響を調べる。

歯の移動時の歯根膜組織における出芽型血管新生の局在の観察  
歯の移動中の歯根膜組織における血管新生の局在を調べるために多重蛍光染色を行い、出芽時に認められる tip 細胞および stalk 細胞を含む内皮細胞を CD31、血管腔を構成する内皮細胞をレクチンで観察することにより、出芽の局在を観察する。すなわち CD31 のみ陽性となる部位は、新生中の血管内皮細胞による出芽構造であり、内腔が未形成であるために注入したレクチンが到達できないものと考えられる。具体的には、歯の移動後、血管内皮細胞に特異的に結合するレクチンを血行性に灌流する。灌流後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、EDTA で脱灰終了後、パラフィン切片を作製する。CD31 単独で染色された出芽部位を蛍光顕微鏡で観察する。

### 4. 研究成果

#### (1) ERK 阻害剤により mRNA レベルで伸展刺激負荷により発現上昇した MMP12 は抑制された。

伸展負荷を行っていない群、伸展負荷を 24 時間行った群、伸展負荷を 24 時間+ERK 阻害剤添加群の MMP12 のリアルタイム PCR を行った。ヒト歯根膜線維芽細胞に 24 時間伸展負荷を行ったところ MMP12 の発現が上昇した。一方、ERK 阻害剤により伸展負荷で発現が上昇した MMP12 は抑制された。

#### (2) ERK 阻害剤によりタンパクレベルで伸展負荷時により発現が上昇した MMP12 は抑制された。

伸展負荷を行っていない群、伸展負荷を 24 時間行った群、伸展負荷 24 時間+ERK 阻害剤添加群の MMP12 の western blotting を行った。リアルタイム PCR の結果と同様に、ヒト歯根膜線維芽細胞に 24 時間伸展負荷を行い発現が上昇した MMP12 は、ERK 阻害剤によりタンパクレベルで抑制された。

MMP12 のリアルタイム PCR および western blotting の結果より、伸展負荷時にヒト歯根膜線維芽細胞で発現が上昇する MMP12 は、MAPK 経路関連分子である ERK の関与が示唆された。今後は、ERK のリコンビナントタンパク質を用いて ERK 過剰発現時の MMP12 の変化を検討する。また持続的伸展負荷時によるヒト歯根膜線維細胞での ERK の動態を確認するため、western blotting 法を用いて、ERK リン酸化タンパクの経時的添加を調べ、MMP12 発現上昇の時期との関連を明らかにする。また、ERK の下流には AP-1 および NF- $\kappa$ B が報告されている。今回の NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた持続的伸展刺激を負荷したヒト歯根膜線維芽細胞の mRNA の解析では、持続的伸展刺激負荷により発現が上昇する MMP12 に、NF- $\kappa$ B 関与しないことを明らかにした。そこ

で、持続的伸展負荷時に歯根膜線維芽細胞で発現が上昇する MMP12 には AP-1 が関与していると考えている。今後は、AP-1 阻害剤を用いて伸展刺激時に発現が上昇する MMP12 と AP-1 の関係を検討する必要がある。

(3)牽引側歯根膜で特異的 MMP12 阻害剤 MMP408 により血管面積増加が抑制された。

ラットの牽引側歯根膜の血管面積を  $\mu$ CT で測定した。ラットの歯の移動後 5 日目で牽引側歯根膜では血管面積が増加するのに対して、MMP408 投与群では、歯を移動していない通常の歯根膜の血管面積と同等まで血管面積が減少した。これにより牽引側歯根膜で発現する MMP12 が血管新生に大きく関与している可能性が示唆された。今回の結果では、面積のみの測定で血管数の増加を判定できない。血管面積の増加は血管数の増加とも考えられるが、血管が拡張している可能性も否定できない。今後は MMP408 を用い、血管新生の判定方法としてレクチンを用いた多重免疫染色法により、分子生物学的視点からも解析を進めていく。

(4)牽引側歯根膜では出芽型血管新生が起こる。

歯の移動後、5 日目の歯根膜牽引側歯根膜の CD31 およびレクチンによる多重免疫染色を行った。CD31 およびレクチンにより血管壁の内皮細胞が黄色で観察される一方で、CD31 のみ蛍光している出芽が観察された。これにより牽引側歯根膜では、出芽型血管新生が起こっている可能性が示唆された。

今後は、tip 細胞のマーカー分子である delta-like 4(Dll4)や VEGF 受容体 2(VEGFR2)、stalk 細胞のマーカー分子である tie1 および tie2 の抗体を用いて多重蛍光免疫染色を行い、より確実に出芽の有無を検討する。

#### < 引用文献 >

Khouw FE, Goldhaber P. changes in vasculature of the periodontium associated with tooth movement in the rhesus monkey and dog. Arch Oral Biol. 1970 Dec;15(12):1125-32.

Kaku M, Motokawa M, Tohma Y, Tsuka N, Koseki H, Sunagawa H, ArturoMarequez Hernandez R, Ohtani J, Fujita T, Kawata T, Tanne K. VEGF and M-CSF levels in periodontal tissue during tooth movement. Biomed Res. 2008 Aug;29(4):181-7.

Salomao MF, Reis SR, Vale VL, Machado CV, Meyer R, Nascimrnto IL. Dental Press J Orthod.2014 May-Jun;19(3):67-74.

Narimiya T, Wada S, Kanzaki H, Ishikawa M, Tsuge A, Yamaguchi Y, Nakamura Y. Orthodontic tensile strain induces angiogenesis via type IV collagen degradation by matrix metalloproteinase-12. J Periodontal Res. 2017 Oct;52(5):842-852.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

成宮 毅、和田 悟史、菅崎 弘幸、中村 芳樹、伸展刺激によるヒト歯根膜線維芽細胞の MMP12 産生におけるシグナル経路の解明、第 77 回日本矯正歯科学会学術大会、2018

成宮 毅、和田 悟史、菅崎 弘幸、中村 芳樹、特異的 MMP12 阻害は、矯正学的歯の移動時の牽引側歯根膜組織における血管新生を抑制する、第 76 回日本矯正歯科学会学術大会、2017

〔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：

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。