

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2016  
課題番号：25463200  
研究課題名(和文) 歯根膜細胞とTh17細胞のNotchシグナルを介した重度歯根吸収発生機構の解明  
  
研究課題名(英文) Investigation of mechanism in orthodontically root resorption through notch signaling in periodontal ligament cells and Th17cells  
  
研究代表者  
山口 大(YAMAGUCHI, Masaru)  
  
日本大学・松戸歯学部・准教授  
  
研究者番号：60333100  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：in vivoにおいて、1週目ではHF群において歯根吸収像が認められた。さらに、歯根吸収部でJagged1, Notch-2, RANKL, IL-6, IL-17の陽性細胞の増加が認められた。以上の結果から、歯根吸収の発生にはJagged1, Notch-2, RANKL, IL-6, IL-17の発現が関与していることが示唆された。以上のことから圧迫側のhPDL cellsでは強い圧迫力が加わった時にNotchシグナルが活性化し、Jagged1, Notch2, RANKL, TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17の発現を促進することで歯根吸収が惹起された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the Notch and IL-17 expressions in odontoclasts in resorbed roots during experimental tooth movement in vivo. 8-week old male Wistar rats were divided into four groups, a heavy force group (50 g), optimal force group (10 g), jiggling force group (compression and tension, repetition; 10g) and a control group. The expression levels of Jagged1, Notch-2, RANKL, IL-6, IL-17 protein in the dental root determined using an immunohistochemical analysis. The immunoreactivity for Jagged1, Notch-2, RANKL, IL-6, IL-17 in resorbed roots exposed to the jiggling force were stronger than that in the other groups on day 21. The number of IL-17-positive odontoclasts was significantly increased in the JF group on day 21 compared with the other groups. These results suggest that Jagged1, Notch-2, RANKL, IL-6, IL-17 produced from periodontal tissues response to heavy and jiggling forces may induce odontoclastogenesis during orthodontic tooth movement, and may be one of risk factors for ORR.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：矯正歯科 歯根膜細胞 歯根吸収 IL-17 Notch シグナル

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、矯正治療中の歯根吸収の発生にRANKLが深く関係することを報告した。さらにTh17細胞から産生されるIL-17がRANKL産生を促進することを証明し、免疫システムが歯根吸収の増悪に関与していることを示した。しかしながら、歯根吸収時のRANKL、IL-17産生に関わるPDLcellsとTh17細胞のシグナル伝達について検討した研究はない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は矯正治療による歯根吸収発生メカニズムに対して歯根膜線維芽細胞とIL-17産生ヘルパーT細胞(Th17細胞)におけるシグナル伝達、特にNotchシグナルに焦点を当て歯根吸収時の歯根膜線維芽細胞とTh17細胞におけるNotchとそのリガンドであるJagged1の発現について、細胞生物学的、病理組織学的に検討し、重度歯根吸収発生機構の解明を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 1) 実験動物及び飼育条件

実験的歯の移動による歯根吸収では、生後8週令関節リウマチモデルマウス(SKG/Jcl)、アトピー性皮膚炎モデルマウス(NC/Nga)、BALB/cAJclマウス(対照群)(日本クレア株式会社)を各群6匹を用いて行った。

#### 2) 実験的歯根吸収モデル

マウス上顎右側第一臼歯の近心移動はPavlinらの方法に準じてニッケルチタンのクローズドコイル(古河テクノマテリアル)を用いて21日間行う。近心移動の方法は、マウスにソムノペンチルを用いて腹腔内麻酔を行ない、第一臼歯にコイルの一方をスーパーボンド(サンメディカル)で留め、コイルのもう一方をスーパーボンドで上顎前歯に留めた。また、この際、下顎右側第一臼歯をエンジンにて切削する。矯正力は10~50gの力を発揮するように設計した。実験期間終了後、上顎骨を摘出する。採取した上顎骨をホルマリン固定後パラフィン包埋し、切片を作成し、上顎臼歯歯根部の吸収像を病理組織学・免疫組織学染色を行なった。アレルギーマウスに矯正力(0~50g)を加え、人為的に歯根吸収を起こさせ、歯根周囲組織のJagged1, Notch1, Notch2, IL-17, RANKL, RANK, OPG, TRAPのタンパク質・遺伝子発現について正常マウスと比較検討した。

(2) 1) ヒト歯根膜線維芽細胞にcompression forceを加え、RANKLとIL-17の産生量と遺伝子発現量について検討した。アレルギー患者よりCD4陽性細胞を採取し、ヒト歯根膜線維芽細胞と共培養し、compression forceを加え、Jagged1, Notch1, Notch2, RANKL, TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17遺伝子発現について検討した。

#### (8) 免疫組織化学染色

まず、CD4とIL-17抗体を用いて、多重免疫蛍光染色を行い、Th17細胞の存在を確認した。免疫組織化学染色は、ヒストファインSAB-PO(G)キット(ニチレイ、JAPAN)とヒストファインシンプルステインMAX-PO(R)(ニチレイ、JAPAN)を用いて施行する。1次抗体には、抗ヤギpolyclonalのRANKL抗体(SANTA CRUZ, USA)、抗ウサギpolyclonalのRANK抗体(SANTA CRUZ)、抗ウサギpolyclonalのOPG抗体(SANTA CRUZ)、抗ウサギpolyclonalのIL-17抗体(SANTA CRUZ)、抗ウサギpolyclonalのGM-CSF抗体(SANTA CRUZ)、TRAP抗体(SANTA CRUZ)を用いた。

次に、Jagged1抗体、Notch1抗体、Notch2抗体を用いて、免疫組織化学染色を行いJagged1、Notch1、Notch2の動態を検討した。次に、遺伝子発現を確認するためにin situ thermal cycler(MJ Japan)を用いて、Jagged1、Notch1、Notch2、IL-17、RANKL、RANK、OPG遺伝子のin situ PCRを行った。

#### (3) ヒト歯根膜細胞とアレルギー患者由来CD4陽性細胞との共培養

1) hPDL cellsに過度のCompression Force(CF)として4.0g/cm<sup>2</sup>を作用させ、Real-time PCR法にてJagged1、Notch1、Notch2の遺伝子発現量を検討した。

2) ヒト歯根膜線維芽細胞にcompression forceを加え、RANKLとIL-17の産生量と遺伝子発現量について検討する。アレルギー患者よりCD4陽性細胞を採取し、ヒト歯根膜線維芽細胞と共培養し、compression forceを加え、RANKLとIL-17産生量と遺伝子発現量について検討した。

### 4. 研究成果

In vivoにおいて、8週齢のWistar系雄性ラットとアレルギーマウスの上顎第一臼歯の歯牙移動を行った。対照(control)群、至適矯正力(OF)群、強い矯正力(HF)群の計3グループに分け、力の強さはOF群で10g、HF群で50gとした。当該部の切片はHE染色、Jagged1、Notch-1、2、RANKL、IL-6、IL-17抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、

(1) in vivoにおいて、1週目ではHF群において歯根吸収像が認められた。さらに、歯根吸収部でJagged1、Notch-2、RANKL、IL-6、IL-17の陽性細胞の増加が認められた。以上の結果から、歯根吸収の発生にはJagged1、Notch-2、RANKL、IL-6、IL-17の発現が関与していることが示唆された。

(2) アレルギーマウスに過度の矯正力を加えた時に正常マウスに比べてTh17細胞が増加した。さらに、アレルギー患者のCD4陽性T細胞とヒト歯根膜線維芽細胞(hPDL cells)の共培養においてRANKLとIL-17の遺伝子発現と産生量の増加を認めた。

(3) 1.0g/cm<sup>2</sup> および 4.0g/cm<sup>2</sup> の荷重をかけた hPDL cells において Notch2 遺伝子発現量は 6h でピークに達し、1.0g/cm<sup>2</sup> の荷重をかけた時に比べ 4.0g/cm<sup>2</sup> の荷重を加えた時の方が増大した。

(4) 以上のことから圧迫側の hPDL cells では強い圧迫力が加わった時に Notch シグナルが活性化し、Jagged1, Notch2, RANKL, TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17 の発現を促進することで歯根吸収が惹起された。

#### 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 27 件)

石川 友子, 山口 大, 疋田 拓史, 菊田 純, 清水 真美, 高橋 桃子, 村上 嘉規, 葛西 一貴. ラットの実験的歯の移動においてジグリングは IL-17 を介して歯根吸収を重篤化する. 日大口腔科学, 査読有, 印刷中.

Kohno R, Yamaguchi M, Hikida T, Kikuta J, Shimizu M, Takahashi-Hikida M, Murakami Y, Kasai K. Expressions of IL-34 in root resorption by excessive orthodontic force. International Journal of Oral-Medical Sciences 査読有, in press.

Yao-Umezawa E, Yamaguchi M, Shimizu M, Kikuta J, Suzuki K, Kasai K. An energy dispersive x-ray microanalysis study in root apex of human cementum. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 査読有, in press.

Yamaguchi M, Yao-Umezawa E, Tanimoto Y, Shimizu M, Kikuta J, Hikida T, Takahashi-Hikida M, Horihata S, Suzuki K, Kasai K. Individual Variations in the Hardness and Elastic Modulus of the Human Cementum. Journal of Hard Tissue Biology, 査読有, 25, 2016, 345-350.

Tanaka K, Yamaguchi M, Hikida T, Yoshino T, Kikuta J, Shimizu M, Takahashi M, Kasai K. Jiggling force aggravates orthodontic root resorption via TNF- $\alpha$  during rat experimental tooth movement. International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 14(4):82-90, 2016. Hikida T, Yamaguchi M, Shimizu M, Kikuta J, Yoshino T, Kasai K. Comparison of orthodontic root resorption under heavy and jiggling forces during experimental tooth movement. Korean J Orthod. 査読有, 46(4):228-41, 2016. doi: 10.4041/kjod.2016.46.4.228.

Nakano Y, Yamaguchi M, Shimizu M, Kikuta J, Yoshino T, Tanimoto Y, Kasai K. Interleukin-17 is involved in orthodontically induced inflammatory root resorption in dental pulp cells. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 査読有, 148(2):302-309, 2015. doi: 10.1016/j.ajodo.2015.03.023.

Ohashi M, Yamaguchi M, Hikida T, Kikuta J, Shimizu M, Goseki T, Kasai K. Jiggling Force Induces Orthodontic Root Resorption during Tooth Movement in Rats. International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 14(1):13-20, 2015. doi.org/10.5466/ijoms.14.82.

Kikuta J, Yamaguchi M, Shimizu M, Yoshino T, Kasai K. Notch Signaling Induces Root Resorption via RANKL and IL-6 from hPDL Cells. J Dent Res. 査読有, 94(1):140-7, 2015. doi: 10.1177/0022034514555364.

Isogai N, Yamaguchi M, Kikuta J, Shimizu M, Yoshino T, Hikida T, Takahashi M, Goseki T, Kasai K. Wnt5a Stimulates the Bone Formation in Tension Side during Orthodontic Tooth Movement. International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 13(3):120-127, 2014. doi: doi.org/10.5466/ijoms.13.120.

Odaira-Yamazaki M, Yamaguchi M, Kikuta J, Shimizu M, Yoshino T, Hikida T, Takahashi M, Kasai K. Jagged1 stimulates the bone resorption during orthodontic tooth movement. International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 13(2):59-65, 2014. doi: 10.5466/ijoms.13.59.

Yoshino T, Yamaguchi M, Shimizu M, Yamada K, Kasai K. TNF- $\alpha$  aggravates The Progression of OIIRR in The Presence of RANKL. J Hard Tissue Biol, 査読有, 23(2), 155-162, 2014.

[学会発表](計 52 件)

Hitomi Saito, Masaru Yamaguchi, Mami Shimizu, Jun Kikuta, Yoshiki Murakami, Kazutaka Kasai. Compression Force Induces Wnt Signaling in Periodontal Ligament Cells. International Association for Dental Research( IADR), 2017, 3, 22-25, San Francisco, USA. Eriko Umezawa-Yao, Masaru Yamaguchi, Mami Shimizu, Jun Kikuta, Kunihiro Suzuki, Kazutaka Kasai. Hardness and Ca/P ratio of cementum involve in root resorption. International Association for Dental Research ( IADR ), 2017, 3, 22-25, San Francisco, USA.

Jun Kikuta, Masaru Yamaguchi, Mami Shimizu, Takuji Hikida, Momoko Hikida, Takehiro Iwane, Kazutaka Kasai. Notch signaling aggravates root resorption by suppressing Wnt signaling. International Association for Dental Research ( IADR ), 2017,3,22-25, San Francisco, USA.

Takuji Hikida., Masaru Yamaguchi., Mami Shimizu., Jun Kikuta., Momoko Hikida., Kazutaka Kasai. Jiggling force aggregates root resorption via production of inflammatory cytokines. International Association for Dental Research ( IADR ), 2017,3,22-25, San Francisco, USA.

Yukari Minato, Masaru Yamaguchi, Mami Shimizu, Jun Kikuta, Takuji Hikida, Momoko Hikida, Masaaki Suemitsu, Kayo Kuyama, Kazutaka Kasai. Relationship between root resorption and apoptosis in cementum. International Association for Dental Research( IADR ), 2017,3,22-25, San Francisco, USA.

斉藤瞳、山口大、菊田純、疋田拓史、高橋桃子、清水真美、村上嘉規、吉野智一、葛西一貴. 持続的圧迫力がヒト歯根膜線維芽細胞の Wnt5a 発現に及ぼす影響について, 第 75 回日本矯正歯科学会, 2016.11/7-9, アスティとくしま、徳島県徳島市.

梅澤恵梨子、山口大、清水真美、吉野智一、菊田純、鈴木久仁博、葛西一貴. 根尖部セメント質の物性および化学組成が歯根吸収の発生に及ぼす影響、第 75 回日本矯正歯科学会, 2016.11/7-9, アスティとくしま、徳島県徳島市.

湊友香里、山口大、清水真美、菊田純、高橋桃子、吉野智一、葛西一貴. 歯の移動による歯根吸収とセメント細胞のアポトーシスの関与、第 75 回日本矯正歯科学会, 2016.11/7-9, アスティとくしま、徳島県徳島市.

Yamaguchi M, Hikida T, Yoshino T, Kikuta J, Shimizu M, Takahashi M, Kasai K. Jiggling force aggravates orthodontic root resorption via TNF- during rat experimental tooth movement. 38th Asia Pacific Dental Congress. 2016.6/17-19, Hong Kong.

Masaru Yamaguchi, Jun Kikuta, Mami Shimizu, Takuji Hikida, Momoko Takahashi, Kazutaka Kasai. Low-energy laser irradiation induces the expression of osteopontin in tension side during orthodontic tooth movement. 8th International Orthodontic Congress 2015, 2015.9/27-30, London, UK.

Takuji Hikida, Masaru Yamaguchi, Mami

Shimizu, Tomokazu Yoshino, Jun Kikuta, Momoko Takahashi, Kazutaka Kasai. Light jiggling force exacerbates orthodontic root resorption via the production of inflammatory cytokines. 8th International Orthodontic Congress 2015, 2015.9/27-30, London, UK.

Jun Kikuta, Masaru Yamaguchi, Mami Shimizu, Tomokazu Yoshino, Takuji Hikida, Momoko Takahashi, Kazutaka Kasai. The Notch signaling response to an excessive orthodontic force stimulates orthodontically-induced inflammatory root resorption via RANKL and IL-6 production from hPDL. 8th International Orthodontic Congress 2015, 2015.9/27-30, London, UK.

#### 〔図書〕(計 1 件)

Yamaguchi M and Garlet GP. The role of inflammation in defining the type and pattern of tissue response in orthodontic tooth movement. BIOLOGICAL MECHANISMS OF TOOTH MOVEMENT. 2nd Editors: Vinod Krishnan and Ze'ev Davidovitch, Wiley-Blackwell Publishing Group., pp.121-137, 2015.

#### 〔産業財産権〕

##### 出願状況 (計 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 件)

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

#### 〔その他〕 ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山口大 (YAMAGUCHI Masaru)  
日本大学・松戸歯学部・准教授  
研究者番号：60333100

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )