

平成30年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20582

研究課題名(和文) VEGF/VEGFRに着目した咬合刺激低下歯の効率的な矯正学的移動システムの構築

研究課題名(英文) Construction of efficient orthodontic movement under the occlusal hypofunctional condition focusing on VEGF / VEGFR

研究代表者

白見 莉沙 (USUMI-FUJITA, Risa)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・プロジェクト助教

研究者番号：90706946

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)：これまでわれわれはラット臼歯の咬合刺激を低下後、矯正力を用いて移動する実験系において、咬合刺激の低下が歯根膜における退行性変化をもたらし、咬合刺激低下歯を矯正力を用いて移動した場合における組織障害、またその修復過程に与える影響について詳細な検討を行ってきた。本研究では、咬合刺激低下歯に対するLIPUS照射が歯周組織の萎縮を軽減すると仮定し実験を行った。Micro-CT解析およびqRT-PCRの結果から、咬合刺激低下歯の歯根膜において、LIPUS照射が咬合刺激低下歯における歯周治療および骨再生を促進するアプローチとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reduced occlusal stimuli are widely known to induce atrophic changes in the periodontal ligament (PDL) and alveolar bone. When compared with that of functional teeth, the PDL in occlusal hypofunctional teeth is thinner and bone formation and density are lower. Mechanical stress plays an important role in the homeostasis of PDL and alveolar bone remodeling. In this study, it was assumed that low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) exposure has recovery effects on the hypofunctional PDL and interradicular alveolar bone (IRAB). According to the results of micro-CT and qRT-PCR analysis, LIPUS exposure reduced the atrophic changes of alveolar bone by inducing the upregulation of periostin and CTGF expression to promote PDL healing after induction of occlusal hypofunction.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：咬合刺激低下 廃用性萎縮 歯科矯正 VEGF LIPUS

1. 研究開始当初の背景

矯正臨床において、咬合刺激低下歯に急激に矯正力を加えると歯根吸収や骨性癒着、歯髄壊死が生じることが知られているが、その詳細なメカニズムについては明らかにされていない。生体は、適度なメカニカルストレスを受けながら、細胞の構造や機能を変化させる。例えば、宇宙空間のような無重力状態、寝たきり状態やギプス固定などの不動化状態に持続的に曝されると、骨や筋肉の萎縮が起こることはよく知られている。同様に、歯の喪失により咬合力がかからなくなると歯槽骨の減少や、対合歯の歯周組織に様々な変化が生じる。

われわれは、咬合機能の生物学的意義を明らかにするため、咬合刺激というメカニカルストレスを低下させた時の歯周組織の変化について、微小血管、歯根膜機械受容器、歯槽骨について様々な廃用性変化を明らかにしてきた。特に血管系の変化については歯周組織の変化と血管リモデリングは密接に関係していることが明らかとなっている。この中でも、血管内皮増殖因子である VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) はメカニカルストレスを受けることで産生が促され、血管新生や骨リモデリングを活発に誘導することが報告されている。

歯に矯正力をかけた際には、圧迫側歯根膜における血管の圧迫により、血流の減少、酸素濃度の減少が引き起こされることで、細胞の変化がはじまり、牽引側歯根膜では逆の現象がおこり、細胞の変化が始まることは古くから血流理論として知られている。

しかしながら、咬合刺激を喪失した歯にメカニカルストレスを加え、矯正学的に移動をさせた際に、血管系が受ける影響は明らかにされておらず、現在われわれは VEGFR-2 陽性細胞が形成・修復過程に果たす役割について、矯正力による違いや、組織障害および修復過程に与える影響という観点から詳細な検討を行っている(研究スタート支援#25893073)。これまで歯根膜において血管新生増殖因子である VEGF の発現に着目した報告は認められるが、その受容体である血管新生増殖因子受容体 VEGFR の発現を報告したものは国内外の渉猟しても皆無である。VEGFR-2 を介する血管新生に着目する点が本研究の特徴であり、リガンドである VEGF だけでなく VEGFR-2 に着目することでより確実に血管新生および骨リモデリングのメカニズムを明らかにでき、より確実な咬合刺激低下歯の効率的な矯正学的移動システムを構築できると考えている。

2. 研究の目的

これまでわれわれは、咬合刺激低下歯に対する歯の移動を行った際、正常咬合歯とは異なる移動様相を呈し、CD31、VEGF-A および VEGFR-2 など血管系に影響を与える因子が発現することから、歯根膜において顕著な虚血

障害が起っていることを実証してきた。また、歯の移動開始後、経時的に血管内皮細胞 (CD31 陽性細胞) だけでなく、他の歯根膜細胞にも VEGF-A や VEGFR-2 の発現が多く認められることから、VEGFR-2 陽性細胞が形成・修復過程に果たす役割に着目し、矯正力による違いや、組織障害および修復過程に与える影響という観点から詳細な検討を行っている(研究スタート支援#25893073)。以上の経緯を踏まえ、本研究では VEGF/VEGFR に着目し、効率的な咬合刺激低下歯の移動システムを構築する。

3. 研究の方法

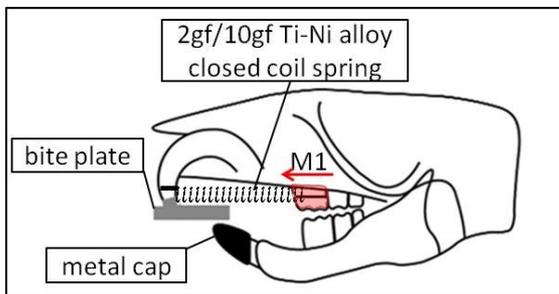
これまでわれわれはラット臼歯の咬合刺激を低下後、矯正力を用いて移動する実験系において、咬合刺激の低下が歯根膜における退行性変化をもたらす、咬合刺激低下歯を矯正力を用いて移動した場合、正常咬合歯とは異なる移動様相を呈し CD31、VEGF-A および VEGFR-2 の発現に影響を与えることを明らかとしてきた。さらに VEGFR-2 陽性細胞が、矯正力による違いや、組織障害、またその修復過程に与える影響について詳細な検討を行っている(研究スタート支援#25893073)。

そこで本研究では以下の

- (1) 分子生物学手法を用いた VEGF 依存性 VEGFR-2 誘導に着目した歯根膜細胞の賦活化
- (2) 咬合刺激低下歯に対する効率的な矯正学的移動システムの構築

という2点について細胞培養実験および疾患動物モデルを用いて研究計画を立案した。

低出力超音波 (Low Intensity Pulsed Ultrasound, LIPUS) は骨折の治療を促進するとの報告以来、血管新生や仮骨形成、軟骨内骨化の促進、骨芽細胞の活性化などの効果があることが知られている。また、虚血再還流障害においては、予め臓器に対して軽度の虚血負荷を繰り返し加えておく (ischemic preconditioning) ことによって、酸素フリーラジカルの産生が減少し虚血再還流障害が軽減されることも知られている。これらの報告を参考にし、(1) においては、不活化歯根膜クローン細胞を作製後、VEGF-A を添加した条件で培養し、LIPUS を照射した際のクローン細胞における VEGFR-2 の発現量の経時的变化と、細胞分化の過程について検討する。方法としては、蛍光抗体法による培養細胞における VEGFR-2 の免疫染色と、リアルタイム PCR による mRNA の発現量の定量化や、イムノブロッディング法によるタンパク質の発現量の評価を行うこととした。(2) においては、ラット臼歯咬合刺激低下モデルを用いて、咬合刺激低下歯に対する LIPUS の効果を確認後、咬合刺激低下歯に軽度の虚血負荷を繰り返し与えてから矯正力を用いて歯の移動を行う方法を比較検討し、咬合刺激低下歯に対する効率的な矯正学的移動システムを検討することとした。



4. 研究成果

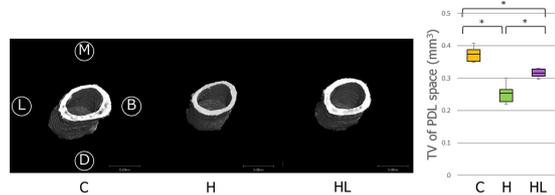
(1) ヒト・テロメラーゼ遺伝子(hTERT 遺伝子)を安定発現させた不死化クローン歯根膜細胞クローン細胞の作製を試みたが、安定発現に難を要し、歯根膜細胞を継代培養し 3,4 世代を用いて実験を行った。虚血障害を起こすと、組織周辺は解糖系が進むことからアシドーシスになっていると考えらるが、詳細なメカニズムは分かっていないため、プロトンセンサーを中心としたメカニズムの解明を進めている。

(2) 臼歯歯根完成期にあたる生後 12 週の Sprague-Dawley 系雄性ラット 15 匹を用いた。ラットは正常咬合(C)群、咬合刺激低下(H)群、咬合刺激低下および LIPUS 照射(HL)群の 3 群(各 n=5)に分類した。H および HL 群において Suhr らの方法に準じて、上顎切歯に金属製バイトプレート、下顎切歯に金属製キャップをコンポジットレジンにてそれぞれ装着し、上顎第一臼歯(M1)の咬合接触を排除し咬合刺激低下状態を誘引した。2 週間経過後、HL 群にのみ 5 日間、毎日 20 分間 LIPUS 照射を行った。LIPUS 照射のパラメータは周波数 1.5MHz、繰り返し周波数 1.0kHz、パルス持続時間 200 μ s、強度 300mW/cm²とした。C 群および H 群には偽照射を行った。最後の LIPUS 照射 8 時間後に CO₂ を用いて屠殺した。上顎骨を取り出し、4%ホルムアルデヒドにて固定した。

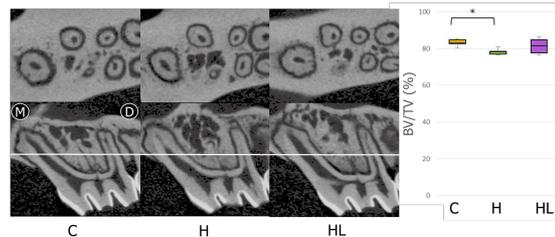
[Micro-CT 解析] Micro-CT を用いて全てのサンプルを 20 μ m 幅で撮影した。M1 の根管中隔部歯槽骨の骨密度 (BV/TV) および M1 の遠心頬側根の歯根膜体積を Shimizu ら (2013, 2014) の方法に基づき測定した。これらの測定には 3D 画像解析ソフトを用いた。

[qRT-PCR] M1 の遠心頬側根の歯根膜を採取し、Vegf、Runx2、Twist1、Ctgf および periostin の mRNA 測定を TaqMan プローブ法にて行った。インターナルコントロールとして Gapdh を用いた。

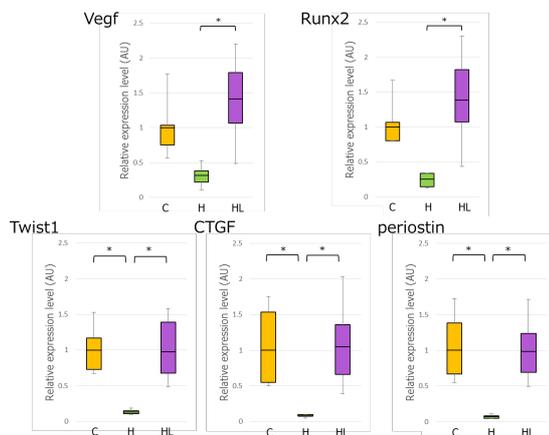
結果として、M1 の歯槽骨体積/組織体積は C 群に比較して H 群で有意に (C 群の 0.94 倍) 減少した。しかし、HL 群と C 群間で有意な差は認められなかった。歯根膜体積は C 群に対して、H 群で有意に (C 群の 0.68 倍) 小さかった。LIPUS を照射した HL 群において歯根膜体積は H 群に対して有意に (H 群の 1.24 倍) 大きかった。しかし、C 群に対して HL 群は有意に (C 群の 0.84 倍) 小さかった。



根管中隔部歯槽骨の BV/TV の計測結果においては H 群において BV/TV が小さかった。



mRNA の解析において、Vegf および Runx2 は HL 群において H 群に比較し有意に (Vegf : H 群の 4.48 倍、Runx2 : H 群の 5.45 倍) 高かった。Twist1、Ctgf および periostin は C 群に対して H 群で有意に低く、HL 群では (Twist1 : H 群の 7.43 倍、periostin : H 群の 13.63 倍、Ctgf : H 群の 12.91 倍) 高かった。しかし、C 群と H 群では有意な差は認められなかった。



以上のことから、LIPUS 照射は咬合刺激低下歯の歯根膜と歯槽骨の萎縮を軽減した。咬合刺激低下歯に対する LIPUS 照射は Vegf と Runx2 と同様に Twist1、Ctgf および periostin の mRNA 発現レベルを増加した。LIPUS 照射が咬合刺激低下歯における歯周治療および骨再生を促進するアプローチとなる可能性が示唆された。

今後、咬合刺激低下歯に軽度な虚血負荷を繰り返し与えてから矯正力を用いて移動を行う方法として、前述同様に、ラットの臼歯の咬合刺激を低下させ 2 週間経過後、

- ・上顎切歯に装着した咬合板と下顎切歯に装着した金属冠を除去し咬合刺激を再開させた群

- ・咬合刺激を低下させたまま、2gf/10gf の矯正力を間欠的に与えた群

を作成し、その後臼歯の矯正学的な近心移動を行い、免疫組織学的解析、メッセージレベ

ルでの観察や、リアルタイム PCR によるメッセージレベルでの発現量の定量化や、免疫ブロッディング法によるタンパク質レベルでの発現量の評価を予定している。

さらに、咬合刺激低下歯への矯正負荷に伴う歯根膜組織の虚血性変化を分子生物学的手法を用いて、HIF-1 依存的变化と NF- κ B 依存的变化に差別化し、各々の特異的阻害薬を用いて、その組織における組織障害、炎症、血管新生を調べる。その結果、咬合刺激低下歯への矯正力負荷の虚血障害予防法を考案する。

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)

Kasahara Y, Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Kaneko S, Ishida Y, Shibutani N, Shimizu Y, Okito A, Oishi S, Kuma Y, Yamaguchi H, Ono T. Low-intensity pulsed ultrasound reduces periodontal atrophy in occlusal hypofunctional teeth. *Angle Orthod.* 査読有、2017、Sep;87(5):709-716.

[学会発表](計 3 件)

細道 純、鈴木 拓海、渋谷 直樹、細野 香澄、山口 博之、隈 陽一郎、金香 佐和、笠原 由紀、大石 修史、臼見 莉沙、清水 康広、小野卓史、矯正歯の移動時における Ki67 および LGR5 陽性歯根膜細胞の局在変化、第 76 回日本矯正歯科学会大会、2017 年

笠原 由紀、臼見 莉沙、隈 陽一郎、大石 修史、沖藤 明日香、清水 康広、渋谷 直樹、石田 雄之、金香 佐和、細道 純、小野 卓史、LIPUS 照射は咬合刺激低下歯の歯周組織を回復する、第 75 回日本矯正歯科学会大会、2017 年

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 38th Annual Scientific Conference on Dental Research.* 2016.

6. 研究組織

(1)研究代表者

臼見 莉沙 (USUMI-FUJITA, Risa)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・プロジェクト助教

研究者番号：90706946