

平成22年 3 月 31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592367

研究課題名（和文） 重度歯根吸収者由来活性型Tリンパ球の骨免疫学的検討

研究課題名（英文） Osteoimmunological study in the occurrence of orthodontically root resorption

研究代表者

葛西 一貴（KASAI KAZUTAKA）

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：30169396

研究成果の概要（和文）：矯正治療による重度歯根吸収者由来Tリンパ球の培養上清中のRANKLとIL-17の産生量を測定した結果、正常群に比べて、重度歯根吸収者群のRANKLとIL-17の産生量は有意に高かった。矯正力を加えた臼歯歯根吸収部に破骨（歯）細胞とRANK, RANKL, c-fms, M-CSF, IL-1 beta, IL-6, IL-17, IL-17R, CD4 抗体陽性細胞がみられ、hPDL cellsはIL-17刺激により、RANKL産生量は経時的及び濃度依存的に増加したことから矯正学的歯の移動時の歯根吸収の発生にはIL-17/RANKLが深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The increase of RANKL and IL-17 were greater in the severe root resorption group than in the non-resorption group. Further, IL-17 stimulated RANKL production from human PDL cells in time- and dose dependent manner. Immunoreaction against osteoclastogenesis (RANK, RANKL, c-fms, M-CSF, IL-1 beta, IL-6, IL-17, IL-17R, CD4) became stronger in osteoblasts, osteoclasts, odontoclasts, and fibroblasts of the periodontal ligament in root resorption area from Day 7 onwards. The IL-17/RANKL system is responsible for transducing the heavy mechanical loading signals into an odontoclastic episode in root resorption.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	400,000	120,000	520,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：重度歯根吸収, 活性型Tリンパ球, 骨免疫学, IL-17, RANKL

1. 研究開始当初の背景

近年、基礎医学分野で独立した分野として発展してきた骨代謝学と免疫学を統合し、骨免疫学という新しい学際分野を開拓された。一方、矯正臨床において治療中後に発生する歯

根吸収は未だその発生のメカニズムは解明されていない。同様の治療を施しても歯根吸収の発生の程度は患者によって異なる。最近の研究で日本人の重度歯根吸収者は喘息とアレルギー患者に多いことが報告され、矯正

治療中の歯根吸収の発生に免疫システムが関与していることを示唆している。

2. 研究の目的

本申請では矯正治療による重度歯根吸収者よりTリンパ球を採取し、活性化Tリンパ球より産生されるインターロイキン17 (IL-17) について検討する。さらに、活性化Tリンパ球にインターロイキン18 (IL-18) を作用させ、GM-CSFの産生量について検討する。

3. 研究の方法

(1) ① 申請者は、矯正治療のため抜去された第一小臼歯から採取した歯根膜、歯髄、辺縁歯肉をそれぞれ継代培養して得た歯周組織細胞(歯根膜細胞; HPDL, 歯髄細胞; HDP, 歯肉線維芽細胞; HGF) を約50例保存しており、そのうち重度歯根吸収者由来のHPDL (SRR-PDL cells) とHDP (SRR-DP cells) およびTリンパ球を5例所有している。重度歯根吸収を生じた同一患者から得られた歯周組織細胞 (SRR-PDL cells, SRR-DP cells) は非常に貴重で矯正治療による重度歯根吸収の発生メカニズムの解明の一助をなすものとする。

② 矯正治療による重度歯根吸収者由来Tリンパ球の破骨細胞活性因子の発現制御機構について検討を行う。まず、培養上清をR&D社製ELISA kitによりIL-17の産生量を測定した。

③ さらに、IL-17産生量の変化が遺伝子発現レベルによるものかを検討する目的で細胞からTotal RNAを回収し、リアルタイム-PCR法にてIL-17 mRNAの発現量を検討した。細胞からAcid Guanidium-Phenol-Chloroform (AGPC)法にてTotal RNAを回収し、得られたRNAをPerkin Elmer Cetus GeneAmpTMRNA PCRキットを用いてReverse transcription (RT) stepを行いcDNAを得た。このcDNAを、リアルタイム-PCR サーマルサイクラーにてIL-17 mRNAの発現量を定量した。

④ 次に、重度歯根吸収者由来Tリンパ球にIL-18を添加して、その培養上清をR&D社製ELISA kitによりGM-CSFの産生量を測定した。

⑤ さらに、GM-CSFの産生量の変化が遺伝子発現レベルによるものかを検討する目的で細胞からTotal RNAを回収し、リアルタイム-PCR法にてGM-CSFのmRNAの発現量を検討した。

(2) In vivo study

① 実験動物および実験的歯の移動

Wistar系雄性ラット: 6週齢(三協ラボサービス株式会社)各群25匹。切歯を固定源とし、coil springにて第一臼歯を近心に移動する装置を考案した。(Fujitara et al: Figs. 1 and 2)。この移動装置により実験期間中、上顎第一臼歯を近心側へ10 および50gの力で連続的に7日間牽引した。

② Immunohistochemistry

RANKL, RANK, Osteoprotegerin (OPG), Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), Colony-stimulating factor receptor (c-fms), IL-1beta, IL-6, CD4, IL-17, IL-17Rの各抗体はSanta Cruz社製polyclonalを使用した。

(3) In vitro study

① ヒト歯根膜由来線維芽細胞

Human periodontal ligament cell (hPDL) Somermanらの方法によりout growthさせ10% FCS 添加の α -MEM培養液にて継代培養して得た歯根膜培養細胞を用いた。

② sRANKL, OPG 産生量

細胞がconfluentになった後、IL-17 (R&D社)を(0-100ng/ml)の濃度にて24時間添加する。培養上清をQuantikine社製sRANKL assay kitにてsRANKLとOPG産生量を測定した。さらに、Real-time-PCRにてRANKLとOPG mRNAの発現量を検討した。

③ Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time PCR)

RNeasy Mini Kitでtotal RNAを抽出し、PrimerScript RT reagent KitにてRT-PCR法を行い、SYBER Green Iを用いたインターカラー法にてRANKL, IL-17の遺伝子発現の検討を行った。

④ 統計解析

結果は平均値と標準偏差で示した。検定には、one-way ANOVAを用い、実験群間においては多重比較検定 (Tukey test) を用いた。

4. 研究成果

Fig.1 sRANK and IL-17 release from human T cells obtained from the patients with root resorption.

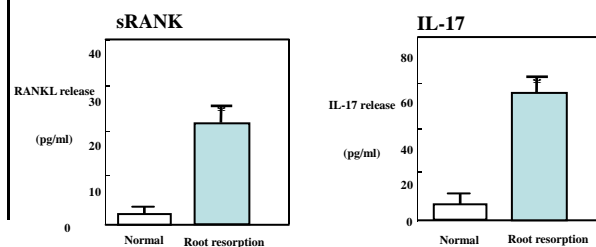


Fig.2 The gene expression of RANK and IL-17 from human T cells obtained from the patients with root resorption.

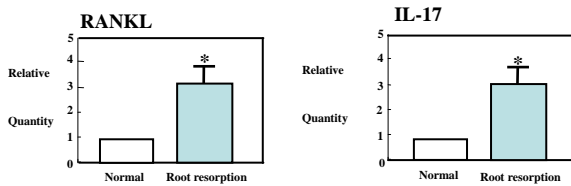


Fig.3 Effects of IL-17 on the expression of RANK and OPG mRNA from hPDL cells.

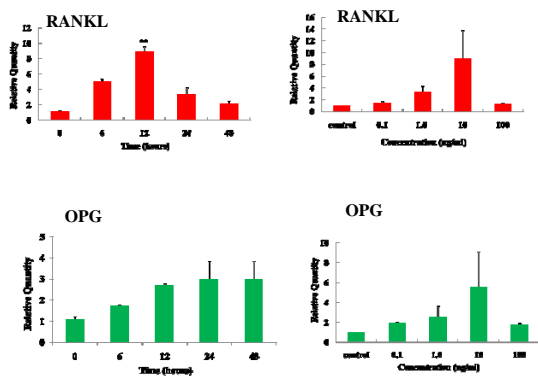


Fig.4 Effects of IL-17 on sRANK and OPG production from hPDL cells.

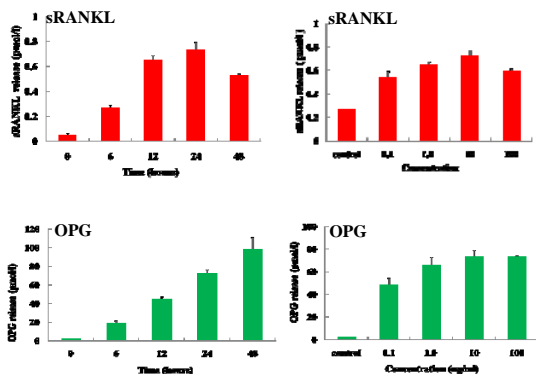
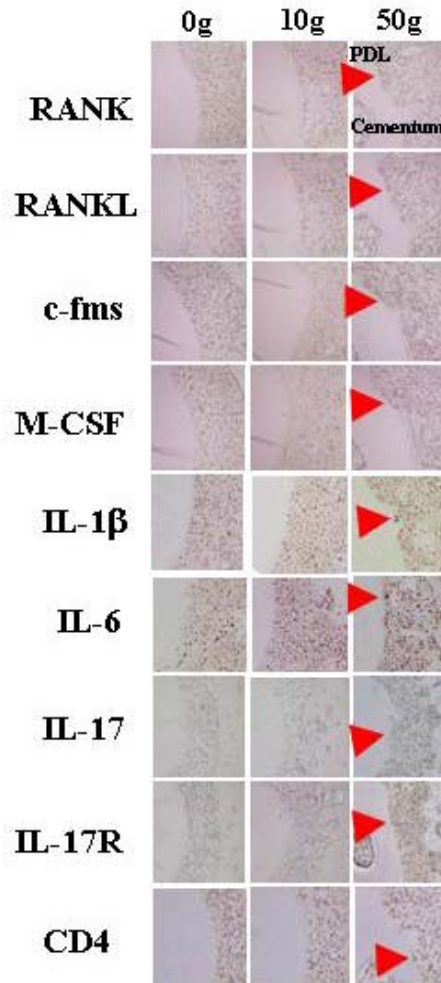


Fig.5 Immunostaining for RANK、RANKL、M-CSF、M-CSF receptor (c-fms)、IL-1、IL-6、

IL-17, IL-17R, and CD4 on day 7.



【結果のまとめ】

矯正治療による重度歯根吸収者由来 T リンパ球の培養上清中の RANKL と IL-17 の産生量を測定した結果、正常群に比べて、重度歯根吸収者群の RANKL と IL-17 の産生量は有意に高かった (Fig. 1 and 2)。

hPDL cells は IL-17 刺激により、対照群と比較して RANKL 産生量は経時的及び濃度依存的に増加した (Fig. 3 and 4)。

移動 7 日目において、10g と 50g の矯正力を加えた臼歯の圧迫側歯槽骨辺縁と歯根吸収部に破骨 (歯) 細胞と RANK, RANKL, c-fms, M-CSF, IL-1 beta, IL-6, IL-17, IL-17R, CD4 抗体陽性細胞がみられ、50g 群においてそれらの染色性は増強された (Fig. 5)。

【結論】矯正学的歯の移動時の歯根吸収の発生には IL-17/RANKL が深く関与していることが示唆された。

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 12 件)

- ① Yamaguchi M, Koiso E, J Fong, Fujita S, Kasai K, 他 2 名. Excessive orthodontic force induces odontoclastogenesis in root cementum as evidenced by the expression of RANK/RANKL. *Int J Oral-Med Sci*, 査読有 8(1): 38-46, 2009.
- ② Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Kojima T, Kasai K. Effects of relaxin on collagen type I released by stretched human periodontal ligament cells. Takano M, *Orthod Craniofac Res*. 査読有 12(4):282-288, 2009.
- ③ Yoshida T, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Kato M, Arai Y, Kaneda T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. *Orthod Craniofac Res*. 査読有 12(4):289-298, 2009.
- ④ Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 査読有 12(2):113-119, 2009.
- ⑤ Yamaguchi M, Ozawa Y, Mishima H, Aihara N, Kojima T, Kasai K. Substance P increases production of pro-inflammatory cytokines and osteoclast formation in dental pulp fibroblasts from patients with severe orthodontically root resorption. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 査読有 133(5):690-698, 2008.
- ⑥ Kunii R, Yamaguchi M, Aoki Y, Watanabe A, Kasai K. Effects of experimental occlusal hypofunction, and its recovery, on mandibular bone mineral density in rats. *Eur J Orthod*. 査読有 30(1):52-56, 2008.
- ⑦ Nakajima R, Yamaguchi M, Kojima T, Takano M, Kasai K. Effects of compression force on fibroblast growth factor-2 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand production by periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontal Res*. 査読有 43(2):168-173, 2008.
- ⑧ Watanabe A, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Histopathological changes in collagen and matrix metalloproteinase levels in articular condyle of experimental model rats with jaw deformity. *Orthod Craniofac*

Res. 査読有 11(2):105-118, 2008.

- ⑨ Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res*. 査読有 11(3):143-155, 2008.
- ⑩ Kariya G, Nariyasu T, Yamaguchi M, Nakajima R, Takano M, Yoshida T, Fujita S, Kasai K. ALP activity decreased in compressed PDL cells obtained from severe orthodontically root resorption. *Orthodontic Waves*, 査読有 66(3): 67-72, 2007.

[学会発表] (計 29 件)

- ① Odontoclastogenesis in root cementum during orthodontic tooth movement as evidenced by the expression of IL-17/RANKL
Yamaguchi M, Fujita S, Nakajima R, Kasai K. 7th International Orthodontic Congress, Sydney, 6-9 February 2010.
- ② Production of chemokine in the occurrence of orthodontically root resorption. Asano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. 7th International Orthodontic Congress, Sydney, 6-9 February 2010.
- ③ 矯正学的歯の移動時に生じる歯根吸収における IL-17/RANKL の関与
山口 大, 藤田祥仁, 中嶋 亮, 吉田賢正, 高野真知, 林 倫子, 平手友里恵, 葛西一貴. 第 68 回日本矯正歯科学会大会, 2009. 11. 18 福岡
- ④ 矯正学的歯の移動時に生じる歯根吸収は IL-17/RANKL 発現を介して生じる
山口 大, 藤田祥仁, 吉田賢正, 葛西一貴. 第 26 回日本骨代謝学会学術集会, 2008. 10. 30 大阪
- ⑤ 矯正学的歯の移動時に生じる歯根吸収の骨免疫学的検討
山口 大, 藤田祥仁, 児島 格, 吉田賢正, 中嶋 亮, 高野真知, 葛西一貴. 第 66 回日本矯正歯科学会大会, 2007. 9. 20 大阪
- ⑥ Yamaguchi M, Kojima T, Nakajima R, Kasai K. DNA Microarray Analysis of Dental Pulp from Orthodontically Apical Root Resorption. American Association Orthodontists 107th Annual Session, Seattle, May 21 2007.

6. 研究組織
(1) 研究代表者

葛西 一貴 (KASAI KAZUTAKA)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号：30169396

(2) 研究分担者

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