

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10407

研究課題名(和文) 硝子様変性と破歯細胞活性を標的にしたHIF-1 阻害による歯根吸収抑制機構の解明

研究課題名(英文) inhibition of orthodontically induced root resorption by HIF-1a inhibition

研究代表者

橋本 恵 (Hashimoto, Megumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：80724517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、矯正力による歯根吸収へのHIF-1 (hypoxia inducible factor 1 alpha)の関与を硝子様変性(虚血性細胞死)と破骨、破歯細胞の分化・活性化機構の両面から検討し、HIF-1 阻害による歯根吸収抑制の立証とそのメカニズム解明に迫ることであった。HIF-1 阻害剤をラットに腹腔内投与し、HIF-1 阻害の効果を見たところ、硝子様変性組織の減少がみられ、また、破骨細胞と破歯細胞ともに減少傾向がみられた。しかし、有意差のある明かな差は認められなかった。新たなHIF-1 阻害剤を用いて研究を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、低酸素環境で活性化する転写因子;HIF-1 (hypoxia inducible factor 1 alpha)に注目し、矯正力負荷時の歯根吸収発症の過程に関与するかどうかを検討することである。この研究により、歯根吸収のメカニズムが明らかになることで、矯正治療における最も良くおこる副作用である歯根吸収の予防に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the involvement of HIF-1 (hypoxia inducible factor 1 alpha) in orthodontic force-induced root resorption from the viewpoints of hyalinization (ischemic cell death) and odontoclast and osteoclast differentiation and activation mechanisms. When HIF-1 inhibitor was intraperitoneally administered to rats and the effect of HIF-1 inhibition was examined, a decrease in hyalinization degenerative tissues was observed, and both odontoclasts and odontoblasts showed a tendency to decrease. However, no significant difference was observed. We will continue the further experiments using a new HIF-1 inhibitor.

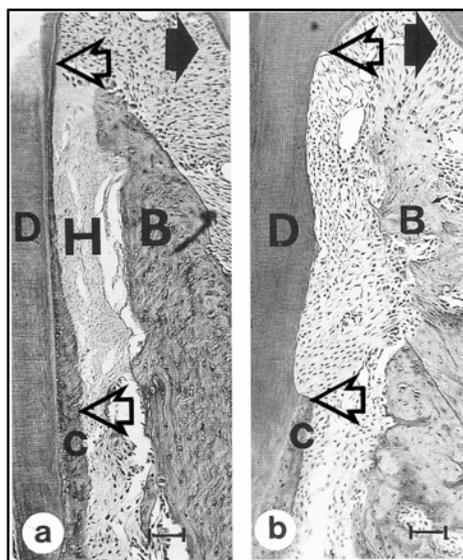
研究分野：歯科矯正

キーワード：hif-1a 歯根吸収 矯正

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正治療において、歯根吸収は最も頻繁に認められる副作用の一つである。一般に、歯根吸収は次の様な過程で進行すると言われている。(1) 血管が圧迫され血流の供給が減少することから、圧迫側の歯根膜組織が血行障害や低酸素環境になり、硝子様変性(虚血性細胞死)が出現する。その後、(2) それに近接した領域に炎症性サイトカインやマクロファージ細胞が出現し、(3)破骨・破歯細胞により骨吸収や歯根吸収が起こる、という過程である。右図(Fig.1)の様子、硝子様変性(aの白抜き矢印間、H)の場所に一致して、歯根吸収(bの白抜き矢印間)が生じる事から、硝子様変性(虚血性細胞死)は歯根吸収を誘導する因子である可能性が示されているが、その成因についての詳細は不明である(Brudvik P, Eur J. Ortho, 1995)。



B, 骨; C, セメント組織; D, 象牙質; H, 硝子様変性
(a) 矯正3日後の硝子様変性範囲(白抜き矢印の間)
(b) 矯正21日後の歯根吸収範囲(白抜き矢印の間)
矯正力の方向(黒矢印) Fig.1

低酸素環境は生体内の微細構造で生理的に存在しているが、近年、虚血性心疾患や癌のみならず、糖尿病や脂肪肝などの代謝疾患の病態でも広く認められることが分かってきた。この十数年の間に、低酸素応答を担う分子が次々と同定され、低酸素応答機構が分子レベルで明らかにされつつある。その中心に位置するのが、遺伝子発現を制御する転写因子 HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha) である (Koumenis C, Mol. Cancer Res. 2006)。低酸素環境下において、HIF-1 α は多様な生理活性を示すが、その中で、今回注目したのは、歯根吸収における重要な初期病態である硝子様変性(虚血性細胞死)に関わる機能と、その後におこる破骨・破歯細胞の分化・活性化に関わる機能である。

低酸素環境で HIF-1 α が虚血性細胞死を誘導する機序については、現在、次のような説明がなされている。すなわち、低酸素環境では、HIF-1 α は、代謝調整、血管新生など多様な生理作用に関わる遺伝子の発現を変化させ、低酸素応答を調節し適応しようとする。しかし、低酸素環境が慢性化する、もしくは過度になると、適応は難しくなり、HIF-1 α は細胞死を選択する(Piret JP, Biochemical Pharmacology, 2002)。実際、HIF-1 α の欠損している腫瘍は、wild-type の腫瘍と比較して、低酸素環境下にある腫瘍内部の細胞死の比率が低く、腫瘍の進展が速いことが分かっている。このように、HIF-1 α は低酸素環境に適応しようとする一方で、細胞死に直接働くことが示されている。細胞死の経路は、pro-apoptotic タンパクである Nip3 や p53 遺伝子に関与していることが示唆されているが、我々も、低酸素による細胞死の経路に小胞体ストレスが関与していることを発見した (Hotokezaka Y, Cell Death Differ. 2009、Hotokezaka Y, Cell Death Dis.

2015)。

一方、HIF-1 α は、破骨細胞の分化・活性化に促進的に働くことが報告されている。低酸素環境下にて、骨芽細胞と末梢血単核細胞を共培養すると、末梢血単核細胞が活性型の破骨細胞に分化する。この際、破骨細胞内ではRANKLの発現が増加すると同様に、HIF-1 α の発現が増加していることが分かった (Dandajena TC, Orthodontics and Craniofacial Research, 2012)。さらに、HIF-1 α は、破骨細胞の活性化を通して骨粗鬆症の発症に関与していることが示された。すなわち、破骨細胞において、エストロゲン存在下では、その受容体を介してHIF-1 α の発現は減少しているが、閉経によるエストロゲン欠乏がHIF-1 α の発現を増加させ、破骨細胞を活性化し、骨吸収を亢進させるという、新たな機序が示された (Miyachi Y, Proc Natl Acad Sci USA, 2013)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、矯正力による歯根吸収へのHIF-1 α の関与を硝子様変性（虚血性細胞死）と破骨、破歯細胞の分化・活性化機構の両面から検討し、HIF-1 α 阻害による歯根吸収抑制の立証とそのメカニズム解明に迫ることである。本研究は、矯正治療における副作用である歯根吸収に対して、低酸素環境で活性化する転写因子HIF-1 α の制御という新しい観点から取り組むことが特色であり、さらに、虚血性細胞死の抑制と破骨・破歯細胞の不活性化という異なる2つの働きを検討し、HIF-1 α の作用を多角的に評価するところが独創的な点である。

HIF-1 α の阻害剤について、骨粗鬆症の治療薬としての研究が最近開始された。したがって、歯根吸収予防薬として利用できる可能性は十分期待できる。将来的に臨床応用が可能になれば、重大な副作用である歯根吸収を克服し、より早く安全に歯を移動させることが可能になり、その臨床的意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) 実験1. HIF-1 α の硝子様変性帯での発現ならびに硝子様変性、破歯・破骨細胞活性化、歯根吸収への関与を検討する。

Wistar系ラット雌（10週齢）を用い、上顎第1臼歯-切歯間に矯正装置（クローズドコイルスプリング）を装着し、上顎第1臼歯を近心に牽引する。牽引後に、組織染色、骨組織の動態検出、実験動物用マイクロCTおよび走査型顕微鏡撮影を行う。詳細は以下の通りである。

組織染色—組織標本を作製し、HE染色（硝子様変性の同定）、TUNEL染色（細胞死判定）、抗pimonidazoleモノクローナル抗体染色（低酸素部位同定）、免疫染色（HIF-1 α 発現判定）を行う。

骨組織の動態検出—アルカリフォスファターゼ染色（骨芽・セメント芽細胞の動態検出）と、TRAP（酒石酸耐性酸性フォスファターゼ）染色（破骨・破歯細胞の動態検出）を行う。

小動物用マイクロCT—小動物用CTにて撮影し、歯牙の動きや周囲骨の変化を検討する。

走査型顕微鏡—歯根を摘出し、走査型電子顕微鏡（SEM）にて歯根吸収面積を、走査型レーザ

一顕微鏡 (SLM) にて歯根吸収深さを測定する。両者を乗じて歯根吸収体積を求める。

(2) 実験2. HIF-1 α 阻害剤をラットに投与し、HIF-1 α 阻害剤の効果を解析する。

実験1と同様の方法を用いて比較検討する。HIF-1 α 阻害剤の濃度と投与時期を変化させて腹腔内注射を行う。阻害剤は、FG-4592と2-Methoxyestradiol (Selleck社)を使用する。

(3) 実験3. ヒト歯根膜線維芽細胞、破骨細胞を用いて、HIF-1 α 抑制による細胞死制御および破骨細胞活性化抑制機構を解明する。

正常初代培養細胞であるヒト歯根膜線維芽細胞や破骨細胞、cell line化された線維芽細胞(BJ、HT-1080)、破骨細胞(RAW264.7)を使用して、伸展・圧縮刺激(培養細胞伸展システム(STREX社))や低酸素培養(アネロパック(MGC社))などのストレスを与え、HIF-1 α の歯根膜線維芽細胞や破骨細胞における動態を解析する。HIF-1 α の阻害剤またはsiRNAを細胞に導入し、線維芽細胞の細胞死制御および破骨細胞の分化、活性化抑制を検討する。

4. 研究成果

Wistar系ラット(10週齢雄)を用い、上顎第1臼歯-切歯間に矯正装置(クローズドコイルスプリング)を装着し、上顎第1臼歯を近心に牽引した。牽引後に、マイクロCTおよびレーザー査型顕微鏡撮影を行った。また、組織標本を作製し、HE染色、TRAP染色およびTUNEL染色(細胞死判定)を行った。

以下の結果が分かった。

- (1) 硝子様変性は矯正力が強く作用する歯根膜の圧迫部位でおこっていた。
- (2) 歯根膜の圧縮率が70パーセントを超えると硝子様変性が顕著にみられた。
- (3) TUNEL陽性細胞は歯根膜の圧迫部位に認められた。
- (4) TRAP陽性細胞は歯根吸収部位で顕著に認められた。

上記の実験系で、HIF-1 α 阻害剤FG-4592をラットに腹腔内投与し、HIF-1 α 阻害の効果を見たところ、TUNEL細胞数の抑制、硝子様変性組織の減少がみられた。また、破骨細胞と破歯細胞はともに減少傾向がみられた。しかし、有意差のある明らかな差は認められなかった。

今後は、HIF-1 α 阻害剤をG-4592から2-Methoxyestradiol (Selleck社)に変更して、同様の実験系を再度行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ueda-Ichinose Yuika, Hotokezaka Hitoshi, Miyazaki Toshihiro, Moriishi Takeshi, Hotokezaka Yuka, Arizono Keira, Nakamura Takuya, Yoshida Noriaki	4. 巻 92
2. 論文標題 Lithium reduces orthodontically induced root resorption by suppressing cell death, hyalinization, and odontoclast formation in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Angle Orthodontist	6. 最初と最後の頁 547 ~ 554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2319/072221-578.2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arizono Shimada Keira, Hotokezaka Hitoshi, Morita Yukiko, Ino Kondo Airi, Ueda Ichinose Yuika, Nashiro Yukako, Hotokezaka Yuka, Yoshimi Keiko, Kiliaridis Stavros, Yoshida Noriaki	4. 巻 49
2. 論文標題 Effect of masseter muscle mass on the rate of experimental tooth movement in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 1012 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joor.13357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishioka-Sakamoto Kie, Hotokezaka Hitoshi, Hotokezaka Yuka, Nashiro Yukako, Funaki Mariko, Ohba Seigo, Yoshida Noriaki	4. 巻 93
2. 論文標題 Fixation of an orthodontic anchor screw using beta-tricalcium phosphate in a screw-loosening model in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Angle Orthodontist	6. 最初と最後の頁 341 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2319/080822-558.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ueda Y, Hotokezaka H, Miyazaki T, Moriishi T, Hotokezaka Y, Arizono K, Nakamura T, Yoshida N
2. 発表標題 Suppression of orthodontic root resorption by lithium and elucidation of its mechanism.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of Japanese Orthodontic Society & The 5th International Congress. 2021. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ueda Y, Hotokezaka H, Arizono K, Nashiro Y, Morita Y, Hotokezaka Y, Yoshimi T, Yoshimi K, Yoshida N
2. 発表標題 Effect of administration of botulinum toxin type A in masseter on tooth movement in rats.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of Japanese Orthodontic Society & The 5th International Congress. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kondo A, Hotokezaka H, Hotokezaka Y, Kondo T, Arizono K, Hashimoto M, Yoshida N
2. 発表標題 Effects of Lithium chloride on alveolar bone morphometry, tooth movement and root resorption in rats.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of Japanese Orthodontic Society & The 5th International Congress. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ichinose-Ueda Y, Hotokezaka H, Miyazaki T, Moriishi T, Hotokezaka Y, Arizono K, Nakamura T, Yoshida N
2. 発表標題 Relationship between suppression of orthodontically induced root resorption by lithium and hyalinization (ischemic cell death)
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society & The 9th Joint Symposium of the Japanese Orthodontic Society and Korean Association of Ortodontists. (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佛坂 由可 (HOTOKEZAKA Yuka) (10244089)	長崎大学・病院(歯学系)・講師 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佛坂 斉社 (HOTOKEZAKA Hitoshi) (90199513)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・准教授 (17301)	
研究分担者	近藤 崇伸 (KONDOU Takanobu) (20814106)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	Division of Orthodontics	University Clinics of Dental Medicine	University of Geneva