

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592392

研究課題名（和文） 乳歯歯質が持つ生理的歯根吸収の調節機構に関する研究

研究課題名（英文） Study on the control system of the physiological root resorption which might be present in the deciduous root dentin

研究代表者

高木 裕三（TAKAGI YUUZOU）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30124697

研究成果の概要（和文）：象牙質から抽出した有機基質成分中には破骨細胞の活性を抑制する因子が存在していることが判った。このような抑制効果について乳歯の有機基質成分と永久歯の有機基質成分で統計学的に有意な差は認められなかったが、永久歯の方が抑制効果は高い傾向が認められた。

研究成果の概要（英文）：Some factors that suppress osteoclast activity are contained in both deciduous and permanent dentin organic matrix extracts. Although there was no significant difference in osteoclast activity between deciduous and permanent dentin extracts, osteoclasts incubated with permanent dentin extracts tend to exhibit less resorption activity than those incubated with deciduous dentin extracts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯科学

キーワード：乳歯、生理的歯根吸収、破骨細胞、象牙質有機基質、吸収抑制

1. 研究開始当初の背景

小児の歯列発育の過程では乳歯から永久歯への歯の交換現象があり、これが円滑に進むことが健全な永久歯列・咬合の完成に重要な要件になっている。すなわち、乳歯は後継永久歯が配列するための時間的、空間的調整の役目を担っており、適切な時期に生理的歯根吸収が発生・進行し、脱落する必要がある。一方、永久歯には生理的歯根吸収と呼ばれる現象はなく、歯根吸収が生じるのは病的な例外的現象である。つまり、永久歯は生理的歯根吸収はもとより、骨のような改造現象もなく、極めて安定した組織である。このことが、

摂食や発音、あるいは道具としての永久歯の機能を長年にわたり維持できるようにさせている。

一般に、乳歯と永久歯は外見上の差異が多少認められるものの、組織学的にはほぼ同じ構造をしており、生化学的組成もほとんど差は認められない。したがって、乳歯の生理的歯根吸収は乳歯歯根が特別な性質を持っているために発生するのではなく、後継永久歯歯胚が萌出運動することで乳歯歯根に近接し、その圧力によって吸収組織が誘導されて発生すると一般に考えられている。しかしながら、後継永久歯歯胚が欠如していても、ゆ

つくりではあるが歯根吸収は生じ、乳歯はやがて脱落することが知られている (Southam JC, 1967)。さらに、臨床では上顎の永久側切歯や永久犬歯の萌出過程で、先行乳歯の歯根のみならず、すでに萌出している隣接の永久歯の歯根にほぼ同時期に歯胚が接近することが度々観察されるが、永久歯歯根には吸収が生じず、乳歯歯根にのみ吸収が起きる。このことは、乳歯には永久歯と異なる何らかの性質があって、その性質によって生理的歯根吸収が“特異的”に発生する可能性が高い。すなわち、永久歯歯質は吸収に対して抵抗性を持つ、あるいは永久歯は歯周組織によって破歯細胞から保護されている等が考えられる。

我々は前者の可能性を確認するため、「永久歯の歯根象牙質は破歯細胞による吸収に対して抵抗性を持つ」との作業仮説を立て、乳歯と永久歯の象牙質が実際に破歯細胞で吸収される際に異なった振舞いをするかを確認する研究に着手した。このような研究目的には破歯細胞を象牙質切片上で培養する方法が最も合理的であると考えられるが、破歯細胞の単離・収集が試料の制約等から極めて困難であるため、形態と機能面で近似している破骨細胞を代用する bioassay の実験系で検索を行なった。破骨細胞様細胞を象牙質切片上で培養した結果、切片表面に形成された吸収窩の体積 (三次元計測で算出) と、培地に溶出したコラーゲン架橋結合の量が共に乳歯の方が永久歯に比べて有意に大きな値を示した。さらに、象牙質切片上の破骨細胞中の I 型コラーゲン分解活性を持つ蛋白分解酵素の mRNA 量を測定したところ、乳歯の方が永久歯より大きな値を示した。元々、乳歯と永久歯の歯根象牙質は物理・化学的な溶解性に差があり、乳歯の方が溶解しやすいことが報告されている (Davis KR et al., 2001) が、これらの結果は乳歯の歯根象牙質中に破骨細胞の硬組織吸収機能を助ける何らかの生物学的機構が存在するか、あるいは永久歯の歯根象牙質中には破骨細胞の硬組織吸収機能を低下させる何らかの生物学的機構が存在する可能性を示唆している (Varghese BJ et al., 2006)。

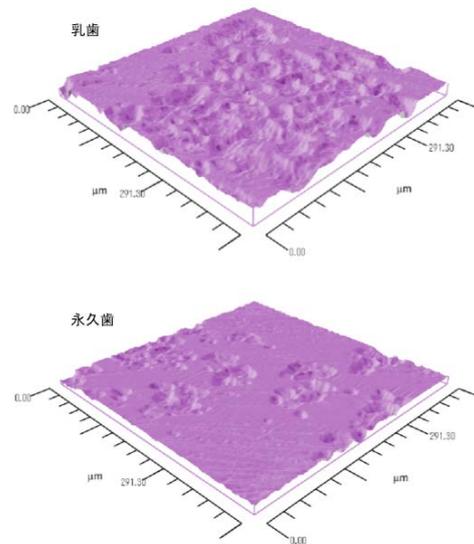


図 1. 破骨細胞様細胞による象牙質切片上の吸収窩の立体写真。乳歯の方が吸収窩の深さと体積が有意に大きな値を示した (Varghese BJ et al., J Bone Miner Metab 24: 248-254, 2006)。

2. 研究の目的

以上のような学術的背景から、象牙質には破骨細胞による硬組織吸収に影響を与える何らかの調節機構が存在し、生理的な状況での永久歯の歯根吸収を予防する機構の一つになっている可能性が考えられる。特に、歯の発育時には様々な成長因子が歯胚組織中に発現しており、これらの一部は石灰化した象牙質にも捕捉されていることが明らかになっていることから、これらが破骨細胞の吸収活性に影響を与えている可能性が考えられる。そこで、本研究では次のような項目を目的として実験を計画した。

1. 乳歯と永久歯の歯根象牙質中に破骨細胞の硬組織吸収能に影響を与える生物学的因子が存在するかを検索する。
2. 歯の発育時に歯胚組織中に発現している成長因子が破骨細胞の機能や分化に影響を与えるかを検索する。
3. 以上の検索によって得られた結果をまとめ、乳歯の生理的歯根吸収が“特

異的“に発生する機構について考察を加える。

3. 研究の方法

[象牙質非コラーゲン性基質が破骨細胞の硬組織吸収能に及ぼす影響の検索]

これまでの研究により、歯根象牙質切片上に播種した破骨細胞による象牙質の吸収は乳歯の方が永久歯よりも顕著で、両者の間に差があることが示されている。さらに、切片上の破骨細胞の蛋白分解酵素の遺伝子発現にも同様の差が生じていることが示されている。そこで、これらの差を生じさせている原因を明らかにするため、乳歯および永久歯の歯根象牙質から非コラーゲン性有機基質を抽出・単離し、これらの抽出画分が破骨細胞による象牙 (ivory) の吸収活性に及ぼす影響を調べた。なお、象牙質と骨の組成は近似していることから、破骨細胞や破骨細胞による両組織の吸収面における分解・吸収の機構に大きな差異はないと考えられる。また、破骨細胞の単離・収集は生体内での分布が極めて少ないことから大変困難である。そこで、本研究では、これまでの研究で用いてきたマウス骨髄由来の破骨細胞様細胞を硬組織吸収性細胞として利用する硬組織吸収の bioassay 法を応用した。

具体的な方法としては、まずマウス頭頂骨より得た骨芽細胞に富む細胞画分とマウス長管骨より採取した骨髄細胞とをコラーゲンゲル上で共存培養する系に活性型ビタミン D₃ と PGE₂ を加えて破骨細胞の形成を誘導した。次に、形成された破骨細胞様細胞をコラゲナーゼ処理により回収し、ウシの乳切歯歯根と永久切歯歯根、および象牙 (ivory) から作成した厚さ 300~500 μm の非脱灰横断研磨切片上に播種した後、MEM 培地に乳歯象牙質、あるいは永久歯象牙質の 0.6M HCl 脱灰抽出物を添加し、48 時間培養 (37°C、5%CO₂ 環境下) して破骨細胞様細胞の活性に及ぼす影響を観察した。なお、マウス骨髄由来の破骨細胞様細胞の分離には Jimi et al. (1996) の方法を応用した。そして、培養した破骨細胞様細胞の活性を調べるため、まず切片上の Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 陽性細胞数を光学顕微鏡で調べ、次に吸収窩の面積を走査型共焦点レーザー顕微鏡で調べた。また、切片上の細胞から細胞抽出液を調整し、含まれる TRAP 量を急速マイクロプレート比色法で、また c-Src kinase 活性を免疫沈殿法による Universal Tyrosine Kinase Assay Kit で夫々測定した

他、mRNA を抽出して RT-PCR 法で増幅した後、Northern Blot Analysis で TRAP や vacuolar-type H⁺-ATPase (v-ATPase)、calcitonin receptor (CTR)、MMP 9、カテプシン K の遺伝子発現状況を評価した。そして、これらの検査・分析で得られた結果を乳歯と永久歯の象牙質抽出画分の間で比較検討した。

なお、本研究で分析の対象とした MMP-9 やカテプシン K は結合組織に広く分布している I 型コラーゲンを分解する機能を持ち、本研究組織のメンバーによるこれまでの研究で乳歯の歯根吸収組織およびそこに分布している破骨細胞に発現していることが確認されている。さらに、これらの酵素は破骨細胞でも発現している事が多くの論文で報告されており、骨ならびに象牙質有機基質の分解・吸収に重要な働きをしているとみなされている。したがって、その遺伝子の発現状況は破骨細胞や破骨細胞の硬組織吸収活性を評価する指標になると考えられる。

[歯の形成時に象牙質に捕捉される成長因子が破骨細胞の硬組織吸収能に及ぼす影響の検索]

歯の形成時に Transforming growth factor-β (TGF-β) や Insulin-like growth factor-I (IGF-I)、Bone morphogenic proteins (BMPs)、Fibroblast growth factors (FGFs) などのサイトカインが石灰化と共に象牙質有機基質中に補足され、残留している事がすでに知られている。これらのうち TGF-β は脾臓細胞と骨芽細胞の共存培養系に加えると破骨細胞の形成を阻害することが報告されている (Quinn et al., 2001)。そこで、マウス骨髄マクロファージを M-CSF と RANKL を含む培地で培養し、象牙質の脱灰抽出物や TGF-β、BMP-2 を添加した後、上記の破骨細胞のマーカーの変化を調べた。

4. 研究成果

[象牙質非コラーゲン性基質が破骨細胞の硬組織吸収能に及ぼす影響]

象牙質中に破骨細胞の吸収活性に影響を与えるシグナル物質が存在し、歯根吸収を調節しているとの作業仮説を立て、これを確認する目的で以下の実験を行った。

マウス骨髄細胞を骨芽細胞と共存培養して分化させた破骨細胞を象牙 (ivory) スライス上に播種した後、培地にウシ乳歯象牙質と永久歯象牙質の脱灰抽出物を添加して破骨細胞の活性に及ぼす影響を観察した。その結

果、破骨細胞の数には変化がなかったが、象牙 (ivory) 表面の吸収窩の形成が抑制され (図2)、破骨細胞の活性に関する c-Src リン酸化活性も抑制された (図3)。

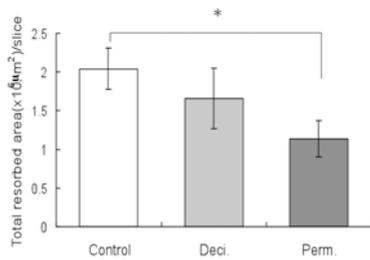


図2. 破骨細胞様細胞による象牙切片上の吸収窩の面積。対照 (Control) に比べ、乳歯 (Deci) 又は永久歯 (Perm) の脱灰抽出物を添加した場合は乳歯から永久歯の順に吸収窩の面積が小さくなっている。

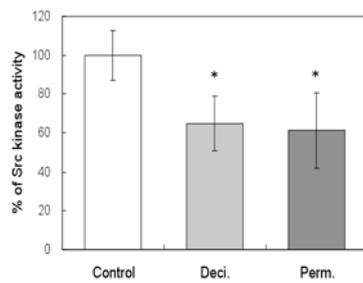


図3. Ivory 切片上で培養した破骨細胞様細胞の c-Src kinase activity。対照 (Control) に比べ、乳歯 (Deci) 又は永久歯 (Perm) の脱灰抽出物を添加した場合は、共に活性が低下している。

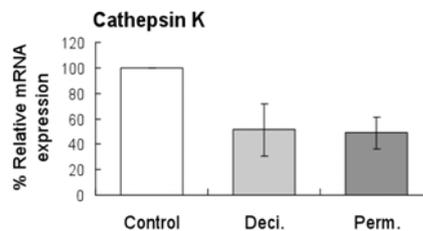
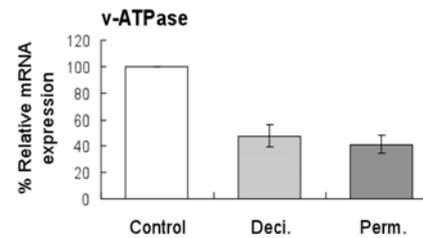
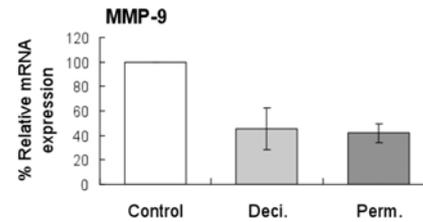
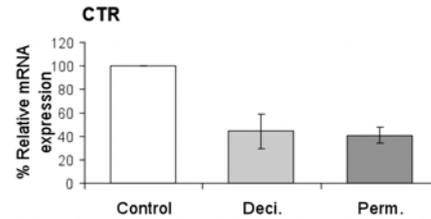
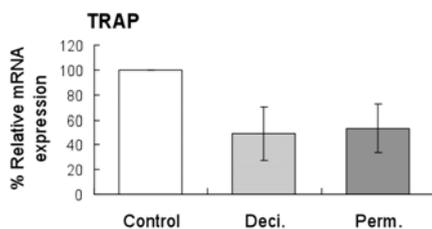


図4 Ivory 切片上で培養した破骨細胞様細胞の TRAP 及び CTR, MMP-9, v-ATPase, Cathepsin K の mRNA レベル。対照 (Control) に比べ、乳歯 (Deci) 又は永久歯 (Perm) の脱灰抽出物を添加した場合は、いずれもレベルが低下している。

さらに、破骨細胞マーカー遺伝子 (TRAP, CTR, MMP-9, v-ATPase, Cathepsin K) の mRNA レベルも抑制されていることが明らかになった (図4)。しかし、これらの抑制レベルを乳歯と永久歯の脱灰抽出物で比較した所、吸収窩の面積については乳歯の

方が大きい傾向を示したが、統計学的有意差は確認できなかった(図2)。また、破骨細胞のマーカー遺伝子の mRNA レベルも乳歯と永久歯の間で統計学的有意差は確認できなかった(図3、4)。

[歯の形成時に象牙質に捕捉される成長因子が破骨細胞の硬組織吸収能に及ぼす影響]

マウス骨髄マクロファージを M-CSF と RANKL を含む培地で培養し、象牙質の脱灰抽出物や TGF- β 、BMP-2 を添加した後、5日間培養して破骨細胞のマーカーの変化を調べた。その結果、象牙質の脱灰抽出物と TGF- β は TRAP の活性を上げたが、BMP-2 は TRAP の活性を上げないことが示された。また、象牙質の脱灰抽出物や TGF- β と共に TGF- β 受容体阻害剤を培地に添加すると TRAP 活性は抑制されるが、象牙質の脱灰抽出物の場合は TGF- β の場合より抑制度が低いことが示された。

[乳歯の生理的歯根吸収が“特異的”に発生する機構についての考察]

上顎永久犬歯の萌出時に、近接する永久側切歯や第一小臼歯の歯根は吸収されないが、先行乳犬歯にのみ歯根吸収が生じていることは臨床のエックス線写真検査でよく観察される。このことは乳歯と永久歯の歯根の被吸収性に差がある事を示唆しており、実際に Varghese BJ らは象牙質スライス上で破骨細胞を培養する象牙質吸収モデルの実験系で乳歯の方が永久歯より被吸収性が高いことを確かめている(図1)。もともと乳歯象牙質は永久歯象牙質と比べて酸による脱灰への抵抗性が低く、物理化学的に溶解しやすい性質があることから、破骨細胞にも吸収され易いことは推測されていた。しかし、Varghese BJ らは象牙質吸収モデルの実験でカテプシンKや MMP-9 などの mRNA レベルも乳歯の象牙質スライス上で培養した破骨細胞の方が高く、吸収活性が上がっていることを発見している。これらの結果は象牙質の被吸収性の差は単に物理化学的な溶解性によるもののみではなく、象牙質中に破骨細胞の吸収活性に影響を与えるシグナル物質が存在し、歯根吸収を調節している可能性があることを示唆している。

そこで本研究では、乳歯と永久歯の象牙質有機質に着目し、それぞれの酸抽出物を象牙質 (ivory) スライス上に播種した破骨細胞の培養系に添加し、吸収活性に及ぼす影響を調べた。その結果、象牙質の脱灰抽出物添加後2日間の培養で、破骨細胞の分化には変化がなかったが、象牙 (ivory) スライス表面の吸収窩の形成は抑制されていることがわかった。

また、細胞外基質の破骨細胞に対する影響は c-Src のリン酸化活性が重要であることが示唆されているが、本研究でも象牙質の脱灰抽出物によって破骨細胞の c-Src リン酸化活性が抑制され、破骨細胞マーカー遺伝子 (TRAP, CTR, MMP-9, v-ATPase Cathepsin K) の mRNA レベルも抑制されていることが明らかになった。しかし、これらマーカー遺伝子の mRNA レベルの抑制に、乳歯象牙質と永久歯象牙質からの抽出物の間で差は見られなかった。

以上の結果より、象牙質の有機基質中には破骨細胞の吸収活性を抑制する因子が含まれていることが示されたが、乳歯と永久歯の間では破骨細胞のマーカー遺伝子の mRNA レベルに差がみられなかった。この結果は以前に報告されたウシ象牙質スライス上で培養した破骨細胞のマーカー遺伝子の mRNA レベルの結果と異なるものであったが、破骨細胞の活性には破骨細胞の付着する硬組織表面の性状が非常に重要であると報告されており、今回の実験では同じ性状の象牙 (ivory) スライスが用いられたことと、塩酸抽出によって有機質成分の integrity が失われた結果ではないかと推察している。象牙質の有機基質中には破骨細胞の吸収活性を抑制する因子が存在していることは、今回の研究から確認できたが、乳歯と永久歯の間で差があることは更なる実験系によって確認する必要がある。既にラットの大腿骨の培養系を用いた骨吸収の bioassay 法が確立していることから、今後この方法を用いた研究で確認する予定である。

一方、マウス骨髄マクロファージを M-CSF と RANKL を含む培地で培養し、象牙質の脱灰抽出物や TGF- β 、BMP-2 を添加した後、破骨細胞のマーカーの変化を調べたところ、象牙質の脱灰抽出物と TGF- β は TRAP の活性を上げたが、BMP-2 は TRAP の活性を上げないことが確認出来た。また、象牙質の脱灰抽出物や TGF- β と共に TGF- β 受容体阻害剤を培地に添加すると TRAP 活性は抑制されるが、象牙質の脱灰抽出物の場合は TGF- β の場合より抑制度が低いことが示された。これらの結果は象牙質の有機基質中に含まれる TGF- β と BMP-2 が破骨細胞の分化に影響している事を強く示唆しており、象牙質には破骨細胞の活性のみならず分化にも関わる生物活性因子が存在していることを示唆している。

以上の結果は、乳歯の生理的歯根吸収の発生機序解明のみならず、永久歯の病的歯根吸収発生メカニズム解明の一助になり、今後、

小児歯科および歯科矯正科の臨床における多くの課題の解決に寄与する可能性がある。

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)

1. Sriarj W., Aoki K., Ohya K., Takagi Y., Shimokawa H. Bovine dentine organic matrix down-regulates osteoclast activity. J. Bone Mineral and Metabolism 27: 315-323, 2009

[学会発表] (計2件)

1. Sriarj W., Aoki K., Ohya K., Takagi Y., Shimokawa H. Dentin organic matrices effect on osteoclastogenesis. IADR 86th General Session, Tronto, Canada, July 2-5, 2008
2. Sriarj W, Aoki K, Ohya K, Takagi Y., Shimokawa H. Factors in dentine organic matrices influence osteoclastogenesis IADR 88th General Session, Barcelona, Spain, July 15, 2010

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 裕三 (TAKAGI YUZO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30124697

(2) 研究分担者

下川 仁弥太 (SHIOKAWA HITOYATA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：80014257

宮新 美智世 (MIYASHIN MICHIO)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90229849