

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592393

研究課題名（和文） 時計遺伝子クロックを介した、血管新生概日リズム調節機構の同定

研究課題名（英文） Regulation of periodic angiogenesis through biological clock gene Clock

研究代表者

細道 純 (HOSOMICHI JUN)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00420258

研究成果の概要（和文）：生体への機械的刺激は、組織改造において重要である。本研究では、機械的刺激が歯周組織、顎骨の改造に及ぼす影響について検討した。はじめに、機械的刺激が血管新生を介して歯周組織の改造を促すことを仮説とし、(1)咬合刺激が歯髓血管に与える影響、(2)咬合刺激低下に伴う歯根膜血管新生抑制を介しての歯の矯正移動への影響について検討した。また、交感神経系を介した歯槽骨代謝への影響について解明するため、咬合喪失ラットへ交感神経受容体遮断薬の投薬実験を行った。以上から咬合刺激により正常歯、矯正移動歯の歯周組織及び顎骨の改造が促されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Mechanical loading is a key factor in tissue remodeling. This study examined influences of mechanical stimuli on the remodeling of periodontal tissues, mandibular bone. We hypothesised that mechanical forces, such as occlusal force and orthodontic force, promote the periodontal remodeling through angiogenesis. We firstly examined two topics as the followings: (1) influences of occlusal stimuli on blood vessels in a rat dental pulp, (2) influences of occlusal hypofunction on the teeth movement through the impaired angiogenesis in the periodontium. Secondly, we focused on the mediation of unloading-induced bone loss through sympathetic nervous activity. We examined the effect of sympathetic nervous activity on occlusal hypofunction-induced alveolar bone loss in rats using a non-selective  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist. In summary these studies indicated that occlusal stimuli played a role in the maintenance and remodeling of periodontium and bone during both normal condition and teeth movement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：矯正・小児系歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：血管新生、歯根膜

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面組織の再生において、組織の栄養供給を担う血管系の再生は重要な鍵となる。血管の再構築、すなわち血管新生は血管新生促

進因子と新生抑制因子により厳密に制御され、両者のバランスが崩れたとき、生体にさまざまな病態を誘発する。血管研究において、血管新生の制御機構の一つとして、「時計遺

伝子」を介した、末梢性の生物時計によるメカニズムが注目され、炎症や悪性腫瘍の増悪、血管をはじめとする組織再生が、一連の周期により変化し、時計遺伝子群との関与が示唆されている。

歯科矯正において、歯や顎骨に対して矯正力または整形力を加えることで歯列、顎顔面の形態、機能への治療を実現する。本研究では、機械的刺激が歯周組織、顎骨及び顎関節のリモデリングに及ぼす影響に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究では、機械的刺激による顎顔面領域の組織リモデリングの解明を目的とし、(1)～(5)の5実験を行った。

(1)咬合刺激がラット歯髄組織の微小血管に与える影響について

歯根膜組織と歯髄組織は血管を介して交通しており、歯根膜内の炎症やさまざまな刺激が歯髄に及ぶ。歯に矯正力を加えると、歯髄において血管成長因子の産生、血管数の増加、血流の増大、神経線維の増加が生じることが明らかにされており、歯に加わる機械的刺激が歯髄へ影響を及ぼすといえる。そこで、歯髄血管系の構造変化に着目して、咬合刺激が歯髄組織へ与える影響を検討した。

(2)咬合刺激低下に伴う歯根膜血管新生抑制を介しての歯の矯正移動への影響について

咬合刺激低下により歯根膜は低機能状態になり、歯根膜血管の退行性変化が生じる。矯正移動に伴う歯周組織の改造現象において、血管新生は重要な役割を担う。しかしながら咬合刺激が低下した歯根膜の矯正移動に伴う血管新生の変化は未だ明らかにされていない。本研究では、血管新生因子 VEGF の受容体である VEGFR-2 を介した歯根膜の血管新生に着目し、咬合刺激低下が歯の矯正移動様式へ与える影響とその機序を組織学的に検討した。

(3)加齢が歯周組織の塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に与える影響について

近年の歯科矯正臨床において、成人の割合が増えてきており、治療成果を向上させる為にも、加齢に伴う歯周組織の変化を理解することはとても重要である。歯根膜の恒常性の維持を行っている成長因子の一つに、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF)が知られており、歯根膜においても bFGF が発現している。本研究では、加齢の歯根膜における塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の発現量に与える影響を検討した。

(4)咬合刺激低下時における歯槽骨代謝に交感神経系が与える影響について

咬合刺激の低下が歯槽骨の骨代謝に与える影響を解明することを目的に、交感神経系を介した血管新生受容体を介した矯正移動歯の歯周組織の改造機序の解明を目指した。

これまで四肢骨においては尾部懸垂モデルを用いた研究により、機械的刺激に伴う骨代謝の変化に交感神経ペプチドが関与することが報告された。そこで、本研究では、これまで明らかにされていない歯槽骨代謝への交感神経系の関与についてマイクロ CT 解析及び組織学的解析により検討した。

(5)成長期における下顎骨の機能的後方偏位が下顎頭形態に及ぼす影響について

顎関節症の誘因の一つとして臨床的に下顎偏位が唱えられており、その一つである下顎の機能的後方誘導に着目し、下顎後方誘導に伴う下顎頭軟骨と骨のリモデリングについて実験的に明らかにするため、CT 解析及び組織学的解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1)咬合刺激がラット歯髄組織の微小血管に与える影響について

7週齢 Wister 系雄性ラット 20 匹を用い、咬合機能低下群と対照群の 2 群にわけた。ラット上顎切歯に咬合板を、下顎切歯に金属冠を装着し上顎第 1 臼歯の咬合刺激の排除を行い、咬合機能低下モデルを作製した。装置装着後 7、14 日に屠殺、固定、脱灰後、パラフィン包埋を行い、ラット下顎骨の厚さ 5 $\mu$ m の水平断連続切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、下顎第一臼歯遠心根を組織学的に観察した。過去の報告をもとに、歯髄組織内の細動脈を選択し、細動脈の走行変化を観察した。組織像の解析には画像解析ソフトを用いて細動脈内腔面積を計測し、統計処理ソフトにて統計処理を行った。

(2)咬合刺激低下に伴う歯根膜血管新生抑制を介して歯の矯正移動への影響について

12 週齢 SD 系雄性ラットを、正常咬合群(N 群：n=5)、正常歯の矯正移動群(M 群：n=5)、咬合刺激低下群(H 群：n=5)、咬合刺激低下歯の矯正移動群(HM 群：n=5)の 4 群に分けた。上顎切歯に咬合板を、下顎切歯に金属冠を装着し上顎第 1 臼歯(M1)の咬合刺激の排除を行い、開始 2 週間後、10 gf の NiTi クローズドコイルスプリングを上顎切歯と M1 間に装着し、M1 の近心移動を開始した。移動開始 1、2、3、7 日後に、M1 の近心移動量および近心傾斜度をマイクロ CT により計測し M1 の移動効率を評価した。非脱灰新鮮凍結切片を作製し、血管内皮細胞の指標である CD31、VEGFR-2 の免疫染色及び TUNEL 染色を行った。

(3)加齢が歯周組織の塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に与える影響について

5 週齢、9 週齢、15 週齢、6 カ月齢、12 カ月齢、18 週齢の雄性 Wister-ST 系ラットを用い、通法に従い、屠殺、固定、脱灰後、パラフィン包埋を行った。動物の年齢設定は、成長群は、5 週齢、9 週齢、15 週齢とし、老化群を 6 ヶ月齢、12 ヶ月齢、18 ヶ月齢とした。

それぞれの年齢のラットの両側上顎 M1 を矢状断連続切片にて観察を行い、染色は HE 染色、bFGF の免疫染色を行った。

(4) 咬合刺激低下時における歯槽骨代謝に交感神経系が与える影響について

実験動物として5週齢 Wister 系雄性ラット 24 匹を用いた。咬合刺激低下モデルとして上顎切歯にバイトプレート、下顎切歯にメタルキャップを装着し、臼歯部の咬合刺激を排除した。無処置の対照群、咬合刺激低下群、咬合刺激低下モデルに  $\beta$ -blocker である propranolol を添加した飲料水を投与した群、無処置ラットに propranolol を添加した飲料水を投与した群の4群を作製した。実験開始1週間後(6週齢時)に屠殺を行い、下顎第一臼歯根分岐部歯槽骨に対してマイクロ CT による解析を行った。また組織切片を作製し破骨細胞数の局在、細胞数の変化を比較する目的にて、TRAP 染色を行った。

(5) 成長期における下顎骨の機能的後方偏位が下顎頭形態に及ぼす影響

雄性5週齢 Wister 系ラット 20 匹を用いた。実験群のラットには前歯部に金属のプレートを装着し、下顎後方誘導モデルを作製した。装置装着後 2、4 週後に実験群、対照群それぞれの右側下顎頭を採取し、Micro CT 撮影をした後、通法に従い前頭断の凍結切片を作製しヘマトキシリン-エオジン染色を行って組織学的変化を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 咬合刺激がラット歯髓組織の微小血管に与える影響について

装置装着7日後において下顎第一臼歯遠心根の歯髓内の細動脈の局在はすべての深度において、対照群で散在しているのに対し、実験群では歯髓の中央部に比較的集中しているのが観察された。細動脈内腔面積は、実験群では対照群と比較して有意に小さな値を示した。装置装着14日後においても同様の変化が認められたが、対照群と実験群の有意差はあるものの、装置装着7日後に比べて変化の差が小さかった。このことより、咬合機能低下時における歯髓内細動脈の内腔面積の減少が認められた。したがって、咬合刺激は歯髓組織の血管系に影響を及ぼすことが示唆された。

(2) 咬合刺激低下に伴う歯根膜血管新生の抑制を介して歯の矯正移動への影響について

マイクロ CT による評価から HM 群は M 群と比較して有意に近心傾斜を呈した。移動開始1日後以降移動終了まで M1 の矯正移動効率は HM 群に対して M 群の方が有意に大きな値を示した。組織学的観察から M 群、HM 群の M1 遠心側歯根膜において CD31 及び VEGFR-2 の発現が多く認められた。移動開始後 M 群ではそれらの発現が経時的に増加したが、HM 群では

移動開始3日後まで有意に減少した。したがって、咬合刺激低下歯の矯正移動の様式は咬合歯とは異なり、その機序として歯根膜内の血管新生の抑制が示唆され、咬合刺激は効率的な矯正移動を行う上で重要な鍵である。

(3) 加齢が歯周組織の塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に与える影響について

実験結果により、加齢により歯根膜における bFGF の発現量は変化した。

(4) 咬合刺激低下時における歯槽骨代謝に交感神経系が与える影響について

無処置の対照群と比較して、咬合刺激低下群では骨密度、骨梁幅、骨梁数ともに有意に小さく、咬合刺激低下モデルに  $\beta$ -blocker である propranolol を投与した群では咬合刺激低下群に対して比べ、骨密度、骨梁幅、骨梁数ともに有意に大きい値を示した。したがって、これらの結果から、咬合刺激低下による骨吸収は、 $\beta$ -blocker を投与した場合の歯槽骨において抑制された。咬合刺激低下時の歯槽骨代謝に、交感神経系が関与している可能性が示唆された。

(5) 成長期における下顎骨の機能的後方偏位が下顎頭形態に及ぼす影響

下顎頭中央部において、対象群に比べ実験群の軟骨の幅は増加した。

#### 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3件)

① Shimizu Y, Hosomichi J, Kaneko S, Shibutani N, Ono T. Effect of sympathetic nervous activity on alveolar bone loss induced by occlusal hypofunction in rats, Archives of Oral Biology, 査読有, 2011, In press

② Sako E, Hosomichi J, Alteration of bFGF expression with growth and age in rat molar periodontal ligament, The Angle Orthodontist, 査読有, Vol. 80, No. 5, 2010, pp. 904-11

③ Shibutani N, Hosomichi J, Ishida Y, Soma K, Influence of occlusal stimuli on the microvasculature in rat dental pulp, The Angle Orthodontist, 査読有, Vol. 80, No. 2, 2010, pp. 316-21

〔学会発表〕(計9件)

- ① R. USUMI, N. SHIBUTANI, N. ONO, J. HOSOMICHI, S. KANEKO, T. ONO, Occlusal stimuli influence VEGFR-2/CD31 expressions in periodontium during tooth movement, 第89回国際歯科学研究学会大会, 2011年3月16-19日. アメリカ合衆国・サンディエゴ
- ② 清水 康広, 細道 純, 金香佐和, 小野卓史. 咬合刺激低下時における歯槽骨代謝に交感神経系が与える影響について. 第69回日本矯正歯科学会大会. 2010年9月27-29日. 神奈川県横浜市
- ③ Jun Hosomichi, Changes of maxillofacial muscle activity in adult patients with mandibular asymmetry after nonsurgical orthodontic treatment, 第7回国際矯正歯科学会, 2010年2月6-9日, オーストラリア・シドニー
- ④ 酒向 絵美, 細道 純, ラット臼歯歯根膜における塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の成長, 加齢に伴う発現変化, 第68回日本矯正歯科学会大会, 2009年11月16-18日, 福岡市
- ⑤ 黒田 由紀子, 細道 純, 成長期における下顎骨の機能的後方偏位が下顎頭形態に及ぼす影響, 第68回日本矯正歯科学会大会, 2009年11月16-18日, 福岡市
- ⑥ 細道 純, 矯正単独治療を行った成人下顎骨側方偏位症例の治療前後における咀嚼筋活動の変化, 第68回日本矯正歯科学会大会, 2009年11月16-18日, 福岡市
- ⑦ USUMI R, ONO N, HOSOMICHI J, Usefulness of the observation on VEGF receptor-2 in rat periodontal ligament using fluorescent antibody method, 第50回韓国矯正歯科学会大会, 2009年11月5-7日, 韓国・大邱

⑧ HOSOMICHI J, MATSUMOTO Y, Computed tomography evaluation of temporomandibular joint morphology in patients with Class II Division 2 malocclusions, 第50回韓国矯正歯科学会大会, 2009年11月5-7日, 韓国・大邱

⑨ 渋谷 直樹, 細道 純, 石田 雄之, 相馬 邦道, 咬合刺激喪失がラット臼歯歯髓組織および象牙質形成に及ぼす影響について, 第67回日本矯正歯科学会大会, 2008年9月16-18日, 千葉市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

細道 純 (HOSOMICHI JUN)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 00420258

##### (2) 研究分担者

松本 芳郎 (MATSUMOTO YOSHIRO)  
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号: 20292980

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: