

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18767

研究課題名(和文) 矯正治療による歯根吸収とセメント芽細胞のアポトーシスとWntシグナルの関連性

研究課題名(英文) Relationship between root resorption by orthodontic treatment, cementoblast apoptosis and Wnt signaling

研究代表者

小林 友香里(湊友香里)(KOBAYASHI, Yukari)

日本大学・松戸歯学部・専修医

研究者番号：60822864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は矯正治療時の歯根吸収の発生因子であるWntシグナル伝達とOPG-RANKL-RANKシグナル伝達システムおよびアポトーシス活性との関連性を検討し、矯正治療時の歯根吸収メカニズムを解明することであった。本研究にて、in vivoにおいて過大な矯正力を加えた7日後から歯根吸収および破骨(歯)細胞の出現が認められた。Control群、10g群の各1日後ではセメント質表面でWnt7a陽性細胞が多数認められた。これにより至適矯正力においてはセメント芽細胞のアポトーシスはWnt7aにより阻害され、リモデリングにおける相互作用のバランスが保たれていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて、至適矯正力においてはセメント芽細胞のアポトーシスはWnt7aにより阻害され、リモデリングにおける相互作用のバランスが保たれていることが考えられた。今後、in vitroにおいて、HCEMの培養を行い、過大な圧迫力と至適圧迫力を加え、Wnt7a、Caspase3、Caspase8、RANK、RANKLの遺伝子発現量を比較検討し、細胞培養液中にWnt7a抑制剤や活性剤を添加し、遺伝子発現量の検討を行うことでWntシグナル伝達の活性が歯根吸収の抑制に有効であることが証明できれば、将来的に歯根吸収の増悪を抑制することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the mechanism of root resorption during orthodontic treatment by investigating the relationship between Wnt signaling, which is a factor that causes root resorption during orthodontic treatment, OPG-RANKL-RANK signaling system, and apoptosis activity.

In this study, root resorption and the appearance of osteoclasts were observed 7 days after the excessive orthodontic force was applied in vivo. A large number of Wnt7a-positive cells were observed on the cementum surface 1 day after each of the Control group and the 10 g group. This suggests that Wnt7a inhibits the apoptosis of cementoblasts in the optimal corrective force and maintains the balance of interactions in remodeling.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯根吸収 セメント芽細胞 アポトーシス Wntシグナル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯根吸収は矯正力における炎症プロセスに基づき、矯正力により骨吸収性サイトカインの産生が増大し、破骨(歯)細胞が誘導されることが歯根吸収の原因の1つであることが示唆されている。当講座では、ラットの歯牙移動モデルを用い、強い矯正力を加え歯根吸収を惹起させた際、破骨(歯)細胞形成とセメント芽細胞の Caspase3、Caspase8、RANKL の発現の増加を認めた¹⁾。RANKL を発現する骨芽細胞は、RANK シグナル伝達を介して破骨(歯)細胞の分化を制御する。一方、OPG は受容体へ作用し、RANKL の効果を抑制し、破骨(歯)細胞の分化と活性化を一時停止する。OPG の発現は Wnt / β -カテニン調節システムによって調節されている。Wnt シグナル伝達は哺乳類に認められ、細胞増殖、細胞形態、細胞運動及び細胞分化を調整し、生物の発達を制御している。歯に関連しては初期発生や形態形成、歯根膜、歯槽骨ならびにセメント質を含めた歯周組織の恒常性を維持するうえで重要なシグナルであると考えられている。Wnt7a は細胞生存シグナルを活性化することによりアポトーシスを抑制する^{2), 3), 4)}。Wnt シグナル伝達、OPG-RANKL-RANK シグナル伝達、アポトーシス因子はそれぞれセメント芽細胞で発現されるが、歯根吸収メカニズムにおいてそれらの相互関係の役割は未だ解明されていない。そこで本研究は、セメント芽細胞に着目し歯根吸収発生のメカニズムにおいて、Wnt シグナル伝達が破骨(歯)細胞活性とアポトーシス経路の活性の双方に関与し矯正治療時の歯牙への負荷に対して状態の保持と歯根吸収発生のメカニズムの重要な役割となっているのではないかを検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は矯正治療時の歯根吸収の発生因子である Wnt シグナル伝達と OPG-RANKL-RANK シグナル伝達システムおよびアポトーシス活性との関連性である。ラットを用いた実験的歯根吸収モデルにて、セメント芽細胞の Wnt シグナルと Osteoprotegerin (OPG) -receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) -RANK シグナル伝達システムおよびアポトーシス因子の発現を観察し、その関連性について検討する。In vitro では、ヒトセメント芽細胞様細胞 (human cementoblast-like cells : HCEM) に圧迫刺激を加え Wnt シグナル阻害剤、活性剤をそれぞれ作用させた際の OPG-RANKL-RANK シグナル伝達システムの発現とアポトーシス因子の発現の動向を観察することにより、矯正治療時の歯根吸収メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) ラットを用いた実験的歯根吸収モデルにおいて強い矯正力と至適矯正力でのアポトーシス因子、歯根吸収因子および Wnt シグナル因子を TUNEL 法および免疫組織化学染色法で Caspase3、Caspase8、RANK、RANKL、OPG、Wnt7a の発現を比較検討する。特にセメント芽細胞の動態について検討する。

(2) ヒトセメント芽細胞様細胞 (human cementoblast-like cells : HCEM) に強い圧迫力と至適圧迫力を加え、Caspase3、Caspase8、RANK、RANKL、OPG、Wnt7a の産生量と遺伝子発現量について比較検討する。

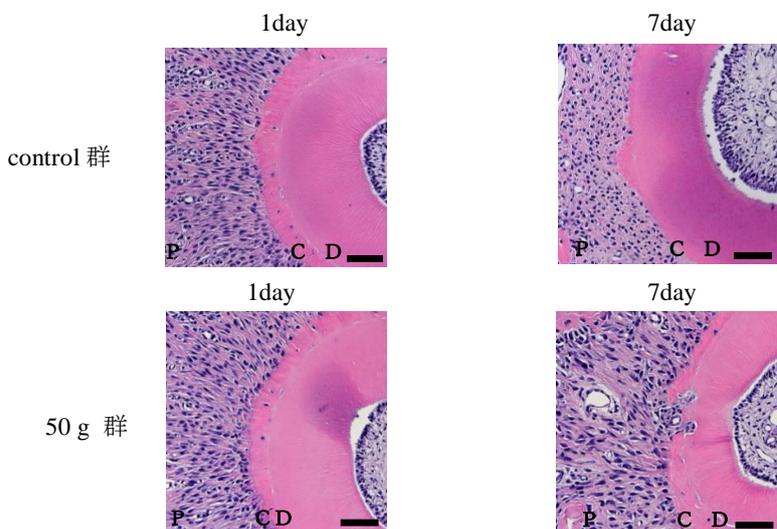
(3) HCEM に Wnt7a を抑制する SFRP4 を上記の培養系に添加し圧迫力を加え、OPG-RANKL-RANK シグナル伝達の活性とアポトーシスの活性を検討する。また、ヒトセメント芽細胞に GSK3 (glycogen synthase kinase 3) 阻害剤 (Wnt/ β -catenin 経路活性化剤) を添加し圧迫力を加え、OPG-RANKL-RANK シグナル伝達とアポトーシスが抑制されるか検討する。

4. 研究成果

(1) 実験的歯の移動における歯周組織周辺の組織学的変化 (H. E. 染色)

実験的歯の移動各 1、7 日後の組織像において、Control 群の歯周組織は、比較的密な結合組織及び繊維芽細胞で構成されていた。歯根表面のセメント質は比較的平滑であった。50 g 群の 1 日後の組織像では、Control 群と比較し、歯根表面のセメント質は平滑であり大きな違いは認められなかった。7 日後の組織像では歯根表面のセメント質に不規則な吸収窩が認められ、窩内には単核及び多核の細胞が観察された。

<H. E 染色>

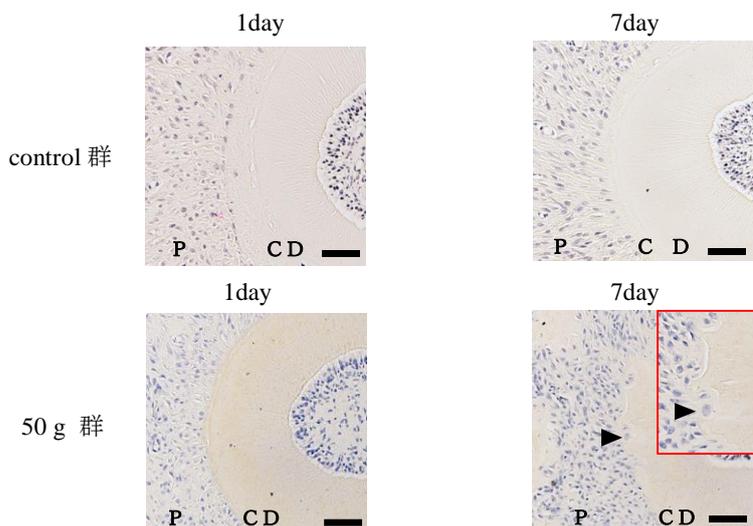


P, 歯根膜 D, 象牙質 C, セメント質 倍率 200×, bar : 50 μm

(2) TRAP の免疫組織化学的所見

50 g 群では、実験的歯の移動 1 日後の組織像において、TRAP 陽性多核細胞は歯根表面に殆ど認められなかった。7 日後の組織像では、歯根表面のセメント質に不規則な吸収窩が認められ、窩内には TRAP 陽性多核細胞が認められた。

<TRAP 染色>

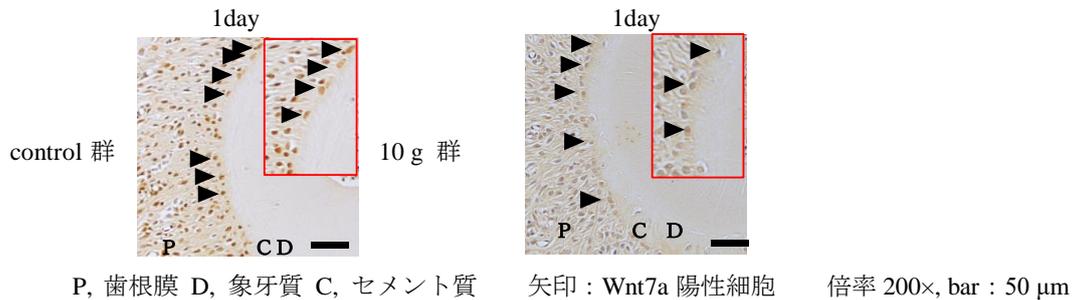


P, 歯根膜 D, 象牙質 C, セメント質 矢印 : TRAP 陽性細胞 倍率 200×, bar : 50 μm

(3) Wnt7a の免疫組織化学的所見

Control 群、10 g 群の実験的歯の移動 1 日後の組織像を示す。歯根表面のセメント質は平滑であり、Wnt7a 陽性細胞が多数認められた。

<Wnt 7 a 染色>



本研究の結果から、以前の本講座の研究と同じく過大な矯正力を加えた 7 日後から歯根吸収および破骨（歯）細胞が出現した。Control 群、10 g 群の各 1 日後ではセメント質表面で Wnt7a 陽性細胞が多数認められた。

矯正歯科治療による歯根吸収は、過大な矯正力によって出現し、壊死組織の除去によって引き起こされると報告⁵⁾されており、ラットの歯牙移動で硝子様変性組織の除去における TRAP 陽性多核破骨（歯）細胞の関与が強調されている。また、Wnt シグナルと OPG-RANKL-RANK システムは骨吸収とリモデリングにおいて相互に作用し、なかでも Wnt シグナルの一つである Wnt7a はアポトーシスを阻害することが解明されている。

セメント質と骨の生物学的類似性を考慮すると、Control 群、10 g 群の各 1 日後ではセメント質表面に Wnt7a 陽性細胞が多数認められることからセメント芽細胞のアポトーシスは阻害され、リモデリングにおける相互作用のバランスが保たれていることが示唆されている。したがって、至適矯正力である 10 g 群では歯根吸収が少ないことから、Wnt7a 陽性細胞の経時的な発現量は大きく減少しないと考えられる。しかし、強い矯正力である 50 g 群の 7 日後の歯根吸収部位では、セメント芽細胞のアポトーシス関連因子である Caspase3, 8 が誘導され、RANKL を介した破骨（歯）細胞への分化が促進されることにより、リモデリングにおける相互作用のバランスが崩れ、Wnt7a 陽性細胞は減少することが考えられる。

以上のことから今後、*in vitro*において、HCEM の培養を行い、過大な圧迫力と至適圧迫力を 3, 6, 9, 12, 24 時間ずつ加え、Wnt7a, Caspase3, Caspase8, RANK, RANKL の遺伝子発現量を real-time PCR 法にて比較検討する。また、細胞培養液中に Wnt7a 抑制剤である Secreted frizzled-related protein 4 (SFRP4)、活性剤である GSK3 阻害剤を添加し、ELISA と real-time PCR にて同様の産生量と mRNA の発現、遺伝子発現量の検討を行う。そして *in vivo*においてはラットの実験的歯の移動モデルを用い、Wnt7a, TRAP, Caspase3, Caspase8, RANK, RANKL の経時的な発現の有無をさらに検討していくことで Wnt シグナル伝達の活性が歯根吸収の抑制に有効であることが証明できれば、将来的に歯根吸収の増悪を抑制することが期待できる。

<引用文献>

- 1) Minato Y et al. Korean J Orthod, 48:253-261, 2018.
- 2) Kovacs B et al. Int J Oral-Med Sci, 20:4653, 2019.
- 3) Tamura M et al. Front Biosci, 2:1405-1413, 2010.

4) Lim WH et al. J Periodontal Res, 49:751-759, 2014.

5) Kvam E. J Dent Res, 80: 357-368, 1972.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------