

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究C

研究期間：2010～2012

課題番号：22592297

研究課題名（和文） 矯正学的歯の移動時に生じる歯根吸収におけるケモカインーRANKL発現の検討

研究課題名（英文） The examination of the expression of chemokines and RANKL in root resorption during orthodontic tooth movement

研究代表者

山口 大 (YAMAGUCHI MASARU)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：60333100

研究成果の概要（和文）：*In vivo*において50g群では10g群と比較してCINC-1陽性細胞、CXCR2陽性細胞、MCP-1陽性細胞およびRANKL陽性細胞の増加を認めた。*In vitro*において、hPDL cellsのIL-8とMCP-1の遺伝子発現量は、6時間をピークに加重依存的に増加し、それらの産生量は経時・加重依存的に増加した。以上の結果から、IL-8(CINC)、MCP-1およびRANKLは過度の矯正力により歯根膜細胞から多量に産生され、破歯細胞分化を促進することにより歯根吸収を発生させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The immunoreactivity for CINC-1/CXCR2, MCP-1 and RANKL were detected in odontoclasts and PDL fibroblasts by the orthodontic force of 50 g on day 7. CF increased the production of IL-8, MCP-1 and RANKL from hPDL cells in a magnitude-dependent manner. Moreover, CINC-1, MCP-1 and RANKL stimulated osteoclastogenesis from rat osteoclast precursor cells.

Conclusion: IL-8 (CINC-1), MCP-1 and RANKL may facilitate the process of root resorption due to excessive orthodontic force.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

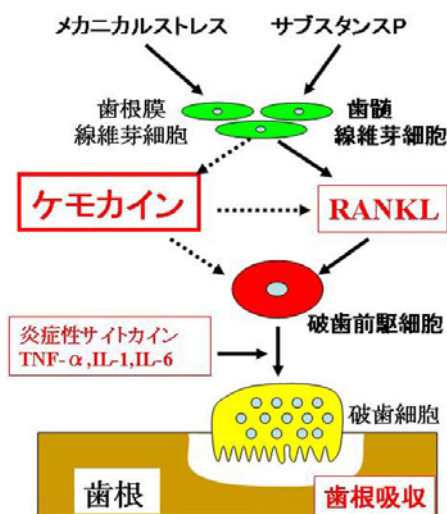
キーワード：歯科矯正，歯根吸収，ケモカイン，RANKL

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正学的歯の移動中における歯根吸収は偶発症のひとつで、平均1.5mmの歯根吸収もしくは上顎4前歯以上の歯根吸収が研究対象患者の4.1%、2mm以上の歯根吸収もしくは上顎4前歯に1本以上の歯根吸収が15.5%の頻度で発生する。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。最近の研究で、破骨細胞形成支持細胞において破骨細胞の分化に必須なRANKLと腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor-alpha; TNF- α)が歯根吸収に関与することが報告されている。当講座でも、HPDL cellsにcompression force

を与えると RANKL 産生が増加すること、重度歯根吸収患者由来の HPDL cells に compression force を負荷したとき RANKL が多量に増加し、歯根吸収の発症に RANKL が関与することを報告している。さらに、ラットに過度の矯正力を加えて歯根吸収を惹起させた時に、破骨細胞、破歯細胞、歯根膜線維芽細胞に RANKL の発現を認めた。一方、ケモカインは白血球の遊走および活性化を促進する低分子タンパク質の総称であり主に塩基性およびヘパリン結合性の炎症性サイトカインの一群である。現在までに、ヒトでは 50 種以上のケモカインと 18 種以上の受容体が同定されており、様々な炎症性刺激によって免疫担当細胞における産生が誘導され、これが局所に遊離されるとケモカインレセプターと結合し、細胞遊走および活性化のみならずインテグリンの活性を介する細胞接着も引き起こすとされている。矯正歯科領域では、ヒト口腔内にて矯正力を与えた歯根より採取した human periodontal ligament (hPDL) cells から macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α /CCL3、monocyte chemotactic protein (MCP)-1/CCL2 ならびに regulated upon activation normal T expressed and presumably secreted (RANTES)/CCL5 の遺伝子発現の上昇が認められたとの報告や、矯正歯科治療患者の gingival crevicular fluid (GCF) より多量の IL-8 の存在が認められたとの報告があることから、歯の移動にケモカインが関係していることが示唆されている。破骨前駆細胞は破骨細胞への分化の過程において MCP-1、RANTES を誘導し、破骨細胞自体も MCP-1 を発現し、破骨細胞形成を促進することから、ケモカインは破骨細胞の分化を誘導し、骨の吸収に関係していると考えられる。しかしながら、歯根吸収の発症とケモカインの関係については明らかにされていない。



.....▶ : 本研究の検討事項

2. 研究の目的

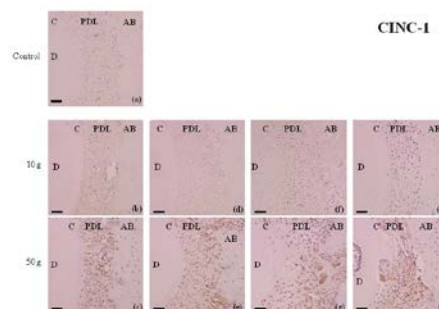
本研究の目的は矯正治療後の歯根吸収発生メカニズムにおける RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) とケモカインの発現に焦点を当て、ラットとケモカイン関連遺伝子 knock out マウスを用いた実験的歯根吸収モデルにて、RANKL とケモカインの発現を検討する。さらに、そのメカニズムを解明するために in vitro でヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDL cells) に compression force を、ヒト歯髄線維芽細胞 (HDP cells) にサブスタンス P を加え、RANKL とケモカインの産生量と遺伝子発現量について検討する。

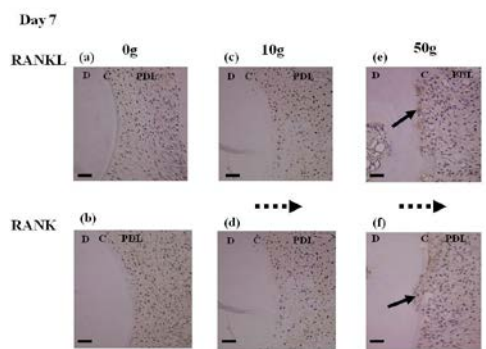
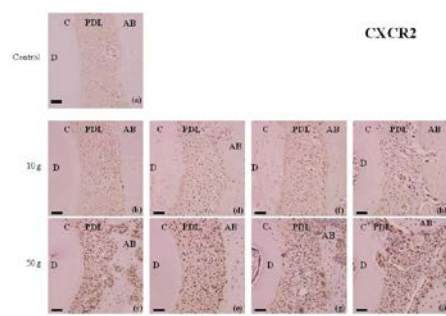
3. 研究の方法

平成 22 年度：in vivo ではラットを用いた実験的歯根吸収モデルにて、免疫組織化学染色法で CINC-1, MIP-1, MCP-1, RANTES の発現を検討し、さらに CINC-1, MIP-1, MCP-1, RANTES の knock out マウスを用いた実験的歯根吸収モデルにて歯根吸収にこれらのケモカインが関与しているか、検討を行う。
平成 23 年度以降：ヒト歯根膜線維芽細胞に compression force を加え、RANKL とケモカイン (IL-8, MIP-1, MCP-1, RANTES) の産生量と遺伝子発現量、および骨吸収能について検討する。ヒト歯髄線維芽細胞にサブスタンス P を加え、RANKL とケモカイン (IL-8, MIP-1, MCP-1, RANTES) の産生量と遺伝子発現量および骨吸収能について検討する。

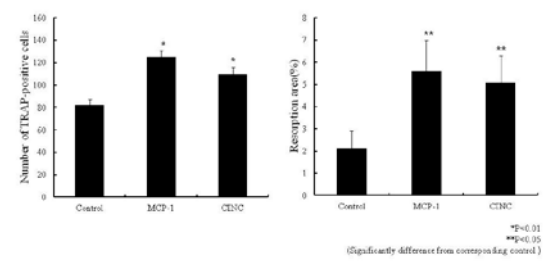
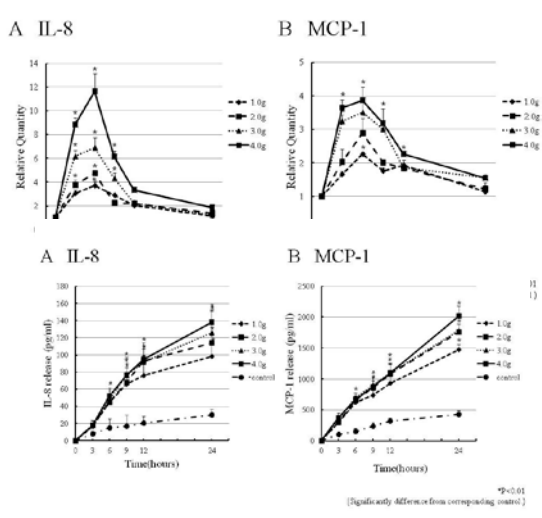
4. 研究成果

In vivo において 10 および 50 g 群間に歯の移動量の計測では差は認められなかった。10 g 群ではセメント質の吸収は認められなかったが、50 g 群では 7 日目にセメント質の吸収と吸収窩における TRAP 陽性破歯細胞の出現を認めた。また、50 g 群では 10 g 群と比較して CINC-1 陽性細胞、CXCR2 陽性細胞、MCP-1 陽性細胞および RANKL 陽性細胞の増加を認めた。





*In vitro*において、hPDL cells の IL-8 および MCP-1 の遺伝子発現量は、6 時間をピークに加重依存的に増加し、それらの産生量は経時・加重依存的に増加した。ラット破骨前駆細胞において CINC 添加群ならびに MCP-1 添加群は control 群と比較して、TRAP 陽性細胞数は増加した。また Pit formation assay において CINC または MCP-1 添加群は、象牙質吸収能の促進を多く認めた。



以上の結果から、IL-8(CINC)、MCP-1 および RANKL は過度の矯正力により歯根膜細胞から多量に産生され、破歯細胞分化を促進することにより歯根吸収を発生させる可能性が示唆された。

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 13 件)

- ① Yamaguchi M, Yamada M, Asano M, Fujita S, Kasai K. Immunohistochemical localization of T-helper 17 cells, IL-17, and RANKL during root resorption induced by excessive orthodontic force in a mouse model of T cell-mediated autoimmune disease. *Int J Oral-Med Sci*, 11, 249-260, 2012.
- ② Shimizu M, Yamaguchi M, Utsunomiya M, Yamamoto H, Kasai K. IL-17/Th17 cells in an atopic dermatitis mouse model aggravate orthodontic root resorption in dental pulp. *Eur J Oral Sci*, 121(2):101-10. doi:10.1111/eos.12024.
- ③ Yamada K, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Kobayashi R, Kasai K. Th17-cells in atopic dermatitis stimulate orthodontic root resorption. *Oral Dis*, doi: 10.1111/odi.12053.
- ④ Ando J, Yamaguchi M, Fujita S, Kawamura A, Utsunomiya T, Kasai K. Morphological and Histological Changes in the Mandibular Condyle after Plate Removal in Experimental Models of Short- and Long-term Mandibular Lateral Displacement. *J Hard Tissue Biol*, 22, 201-210, 2013.
- ⑤ Funakoshi M, Yamaguchi M, Asano M, Kasai K. Effect of compression force on apoptosis in human periodontal ligament cells. *J Hard Tissue Biol*, 22, 41-50, 2013.
- ⑥ Funakoshi M, Yamaguchi M, Fujita S, Kasai K. Localization of TNF- α and macrophages in the periodontal

ligament during orthodontic tooth movement. Int J Oral-Med Sci, 11, 182-181, 2012.

- ⑦ Shimizu M, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Orthodontic root resorption was associated with the secretion of IL-6 and IL-8 stimulated by IL-17 in dental pulp cells. Int J Oral-Med Sci, 11, 172-189, 2012.
- ⑧ Hayashi N, Yamaguchi M, Nakajima R, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. T-helper 17 cells mediate the osteo/odontoclastogenesis induced by excessive orthodontic forces. Oral Dis, 18(4), 375-388, 2012.
- ⑨ Asano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. IL-8 and MCP-1 induced by excessive orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. Oral Dis, 17(5):489-498, 2011.
- ⑩ Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, Kasai K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption by excessive orthodontic force. Eur J Orthod. 33(4):335-343, 2011.

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① 清水真美, 山口 大, 浅野正貴, 葛西一貴. ヒト歯髓組織中の IL-17 が炎症性サイトカイン産生および歯根吸収に及ぼす影響. 第 71 回日本矯正歯科学会大会, 2012.9.27, 盛岡.
- ② 山田邦彦, 山口 大, 小林良喜, 浅野正貴, 安藤 淳, 宇都宮忠彦, 山本正文, 山本浩嗣, 葛西一貴. アレルギーは矯正学的歯の移動時に生じる歯根吸収を増悪する. 第 71 回日本矯正歯科学会大会, 2012.9.27, 盛岡.
- ③ 船越麻理, 山口 大, 小林良喜, 浅野正貴, 葛西一貴. メカニカルストレスがヒト歯根膜線維芽細胞の細胞死に与える影響. 第 71 回日本矯正歯科学会大会, 2012.9.27, 盛岡.
- ④ 吉野智一, 山口 大, 菊田 純, 葛西一貴. TNF- α が矯正学的歯の移動時に生じる歯根吸収に及ぼす影響. 第 71 回日本矯正歯科学会大会, 2012.9.27, 盛岡.
- ⑤ 山口 大. 次世代歯科矯正学の研究シリーズ戦略—歯根吸収発現予測診断と後戻り抑制薬—. BIO tech 2012 第 11 回バイオテクノロジー展/技術会議 2012.4.25, 東京.
- ⑥ Yamaguchi M, Mituhashi M, kasai K. HSP70 inhibits the compression

force-induced TNF- α and RANKL expression. 10th World of congress on inflammation, 25 - 29, June, 2011. paris, France.

- ⑦ Shimizu M, Yamaguchi M, kasai K. Effects of IL-17 on the expression of RANKL from human dental pulp cells. 10th World of congress on inflammation, 25-29, June, 2011. paris, France.
- ⑧ Funakoshi M, Yamaguchi M, Asano M, nakojima R, Fujita S, kasai K. IL-8/RANKL increased by excessive orthodontic force in periodontal ligament induces orthodontically-induced inflammatory root resorption. 10th World of congress on inflammation, 25-29, June, 2011. paris, France.
- ⑨ Yamada K, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Ando J, Utsunomiya T, Yamamoto H, kasai K. The participation of interleukin 17 and RANKL in root resorption of the allergic mouce. 10th World of congress on inflammation, 25-29, June, 2011. paris, France.
- ⑩ Hayashi N, Yamaguchi M, kasai K. IL-17 stimulates IL-6 production and osteoclastogenesis in human periodontal ligament cells. 10th World of congress on inflammation, 25-29, June, 2011. paris, France.

[図書] (計 1 件)

- ① Yamaguchi M, 他、InTech, External Apical Root Resorption in Patients Treated with Passive Self-Ligating System. In Principles in Contemporary Orthodontics. 2011、43-52.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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