

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：23792440

研究課題名(和文)メカニカルストレス下の歯周組織の骨代謝におけるオステオアクチビンの役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of Osteoactivin in the bone metabolism of the periodontal tissue under the mechanical stress

研究代表者

黒石 加代子(中尾加代子)(Kuroishi, Kayoko)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60468303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：矯正歯の移動時歯周組織の骨代謝は、歯根膜細胞により調節される。Osteoactivin(OA)は、骨硬化症モデルラットからその原因遺伝子として同定され、その骨形成性の働きが牽引側の骨形成への関与の可能性はある。また圧迫側の骨吸収は、骨吸収促進だけでなく骨形成抑制が働いている可能性がある。

この研究では、矯正歯の移動時の歯根膜細胞において、牽引側の骨形成にはADAM12、ADAM17によるシェディングを介したOAの活性化が関与し、また圧迫側の骨吸収に至適矯正力でAsporin、弱い矯正力ではSOST/sclerostinのような骨形成抑制因子の発現と放出が関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：During orthodontic tooth movement, the bone metabolism of periodontal tissue is controlled by periodontal ligament cells. Osteoactivin(OA) was identified as the causative gene in an osteosclerosis rat model, and its osteogenetic role may enable bone formation of a periodontal ligament under tension. The inhibition of bone formation may cause bone resorption on the pressure side as well as the promotion of bone resorption.

In this study, we investigated the possibility that OA activation causes bone formation on the tension side through shedding of OA extracellular domain by ADAM12 and ADAM17. We also examined whether the expression and release of bone formation inhibitory factors as Asporin or SOST/sclerostin inhibited bone formation on the pressure side under either optimal or weak orthodontic forces

研究分野：歯科矯正学

キーワード：メカニカルストレス 歯根膜

1. 研究開始当初の背景

歯に矯正力が伝わると、歯周組織にその力は伝わり、歯槽骨では圧迫側に骨吸収、牽引側では骨形成が行われ歯が移動する。この歯の移動中の骨代謝をコントロールするのは、歯と歯槽骨の間に存在する歯根膜である。これまで、矯正歯の移動時の骨代謝のメカニズムについて調べられてきたが、詳細には解明されていない。

2001年に骨硬化症のモデルラットから、その原因遺伝子として分離同定された分子・Osteoactivin (OA)は、当初骨芽細胞の骨形成を促進する分子であると考えられていたが、骨組織以外にもホモログ分子が見つかり、様々な働きを持つことが分かってきた。OAの構造は、細胞内・外ドメイン、膜貫通ドメインでからなり、レセプター、リガンド、または酵素として働く。骨芽細胞の分化および骨形成促進、破骨細胞の形成促進、ガン細胞の転移抑制などの働きが報告されている。また、無重力状態ではその発現が大きく上昇することが報告されており、無重力環境下で骨形成が抑制されることから、骨芽細胞に対する影響もメカニカルストレスの環境で異なることが示唆されている。矯正歯の移動時の歯根膜(PDL)細胞も、メカニカルストレス環境下に存在するが、OAが発現し矯正歯の移動時の牽引側の骨形成に関与しているかは不明である。

また、矯正歯の移動時の圧迫側における骨吸収は骨吸収促進と同時に、骨形成抑制が生じていると考えられる。その中でも、圧迫側のPDL細胞で、骨形成抑制因子が発現していることが予想される。Asporin(ASP)は、TGFシグナル伝達を阻害することによって骨形成阻害作用を示し、さらにSOST/sclerostinは、Wntシグナル伝達を阻害することによって骨形成阻害作用を示すことが報告されている。そこで、圧迫側のPDL細胞において、ASPおよびSOST/sclerostinのような骨形成抑制因子が発現、放出し、矯正歯の移動時の圧迫側の骨吸収に関与している可能性があるかと推測した。

2. 研究の目的

この研究で以下の項目について検討を行うことを目的とした。

- (1) 矯正歯の移動時の牽引側の骨形成に、骨形成性因子のOAが関与しているか？
歯周組織におけるOAの局在
牽引力下のPDL細胞において、OAが発現もしくは放出しているか？
OAの細胞外ドメインのシェディングによる放出はどのように起きているか？
- (2) 矯正歯の移動時の圧迫側の骨吸収に、骨形成抑制因子のASPやSOST/sclerostinが関与しているか？

歯周組織におけるASPとsclerostinの局在

圧迫力下のPDL細胞において、ASPとSOST/sclerostinが発現もしくは放出しているか？

実際に放出された濃度のASPとsclerostinタンパクは、骨芽細胞の骨形成の抑制作用を示すか？

3. 研究の方法

(1) SDラットへの矯正力の付与

オスのラットの第一・第二上顎臼歯間に歯間分離ゴムを挿入し(Waldo法)矯正歯の移動を生じさせた。その後、安楽死させ、上顎骨を採取し、固定後、急速に凍結させ、厚さ6μmの凍結切片を作成した。

(2) 免疫組織化学染色

用いた抗体は以下の通り。

- ・ヤギ抗osteactivinポリクローナル抗体
 - ・ウサギ抗asporinポリクローナル抗体
 - ・ウサギ抗sclerostinポリクローナル抗体
- ラット臼歯に矯正力を付与した時、歯周組織におけるOA、ASP、sclerostinの局在について調べた。

(3) ヒト歯根膜細胞(hPDL)細胞の培養、牽引力の付与、および遠心力の付与

矯正歯科治療を理由に抜歯した小臼歯から、歯根膜組織を剥離し、hPDL細胞を分離、培養、継代し、3~8代の細胞を用いた。

牽引力は、伸展装置を用い、5サイクル/24時間付与した。圧迫力は、遠心機を用い遠心力(40/90/135/160xg)を、24時間付与した。

(4) RT-PCR法、Real-time PCR法

hPDL細胞からRNAを回収し、OA、ASP、SOST/sclerostinの遺伝子発現についてRT-PCR法およびReal-time PCR法にて調べた。また、OAのシェディングを生じさせる酵素の候補として、ADAM12、ADAM17発現を調べた。

(5) ELISA法

培養液中に放出されるOA、ASP、SOST/sclerostinの量を測定するため、培養液を対象として、それぞれの特異抗体を用いてELISA法を行った。

(6) western blotting法

OAのシェディングを生じさせる酵素の候補としてADAM12、ADAM17のタンパク産生量について、伸展刺激を付与したhPDL細胞が

らタンパクを回収し western blotting 法を用いて調べた。

(7) ADAM 阻害薬添加実験

ADAM 阻害薬 CB-12181 を培養液に添加し、伸展刺激によって増加した培養液中への OA の細胞外ドメインの放出量の変化について ELISA 法を用いて調べた。

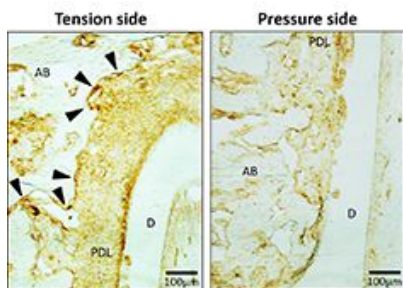
(8) 骨形成アッセイ

ヒト歯槽骨由来骨芽細胞を培養し、圧迫力を付与した時に放出された濃度の ASPN、SOST/sclerostin タンパクを添加し、骨芽細胞により形成される石灰化組織の面積の変化を von Kossa 染色を用いて評価した。

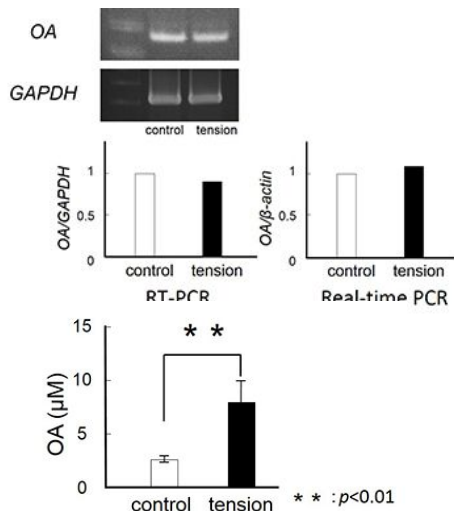
4. 研究成果

(1) 矯正歯の移動時の牽引側の骨形成への骨形成性因子 OA への関与について

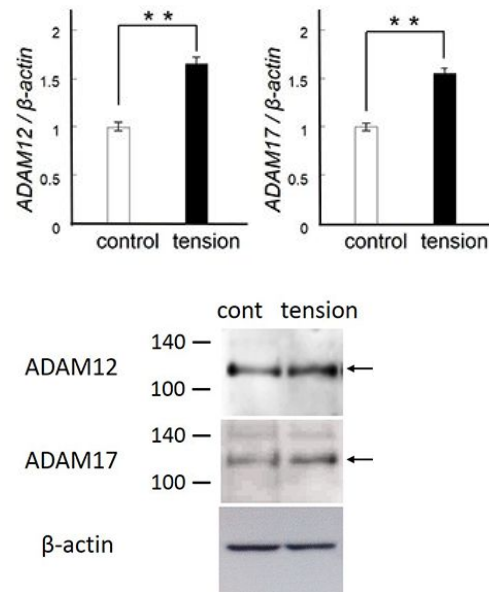
矯正力を付与した時、ラット歯周組織において、牽引側の歯根膜腔で、OA 免疫陽性反応が認められ、PDL 細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞で、強い免疫陽性反応が認められた。



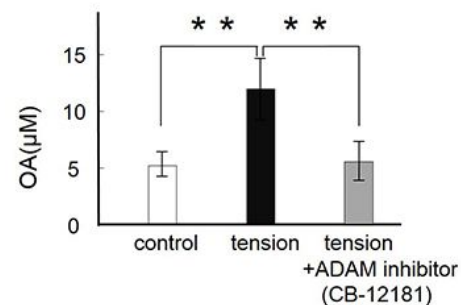
OA 遺伝子は、hPDL 細胞で発現しており、伸展刺激を付与した時、OA 発現量は変化しなかった。一方で、培養液中への OA 細胞外ドメインの放出量は、伸展群でコントロール群よりも有意に増加した。



伸展刺激によって、OA 細胞外ドメインのシェディングの酵素の候補である ADAM 12, ADAM17 mRNA レベルおよびタンパク産生量の有意な増加が認められた。



ADAM 阻害薬である、CB-12181 を培養液に添加したところ、伸展刺激によって増加した培養液中への OA の細胞外ドメインの放出量は、コントロールレベルまでに減少した。

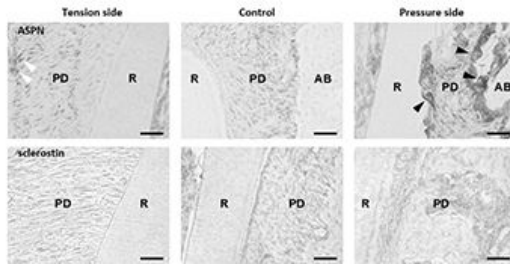


以上の所見から、矯正歯の移動時の、牽引側の骨形成に、PDL 細胞において ADAM12, ADAM17 による OA の細胞外ドメインのシェディングを介した OA の放出による活性化が関与している可能性が示された。

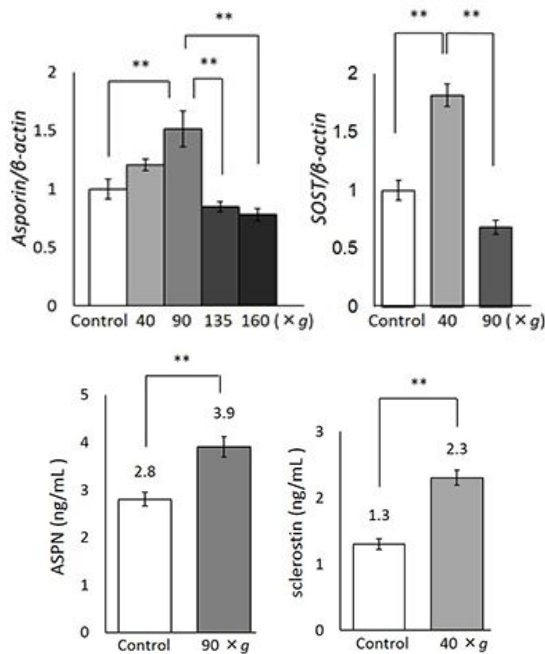
(2) 矯正歯の移動時の牽引側の骨形成への骨形成抑制因子 ASPN と SOST/sclerostin の関与について

矯正力を付与した時、ラット歯周組織において、牽引側やコントロールと比較し、圧迫側、特に PDL 細胞と破骨細胞において、強い ASPN 免疫陽性反応が認められた。牽引側の歯根膜において、sclerostin 免疫陽性反応はほとんど認められなかったが、コントロールと圧迫側において、弱

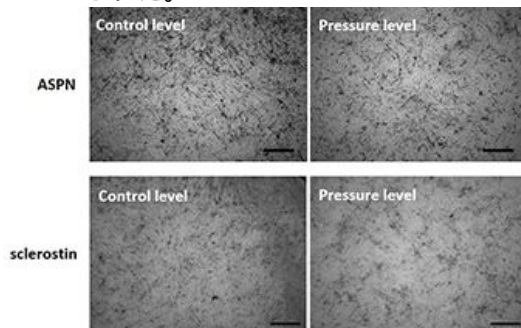
い免疫陽性反応が認められた。



ASPN、SOST 遺伝子発現は、圧迫力により増加し、それぞれ 40×g、90×g の時、その発現は最大となった。また、ASPN、sclerostin タンパクの放出量は、圧迫力（それぞれ 40×g、90×g）で有意に増加した。



ヒト歯槽骨由来骨芽細胞を培養し、ASPN 3.9ng/ml、sclerostin 2.3ng/ml 添加時に、コントロール（ASPN 2.8ng/ml、sclerostin 1.3ng/ml 添加）と比較し、それぞれ石灰化面積の有意な減少が認められた。



以上のことから、矯正歯の移動時の圧迫側の骨吸収には、至適矯正力で Asporin、弱い矯正力では SOST/sclerostin の発現と放出が関与している可能性を示した。

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 2 件)

Ueda M., Kuroishi K.N., Gunjigake K.K., Ikeda E., and Kawamoto T. Expression of SOST/sclerostin in compressed periodontal ligament cells. J Dent Sci. in press.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jds.2016.02.006>

Ueda M, Goto T., Kuroishi K.N., Gunjigake K.K., Ikeda E., Kataoka S., Nakatomi M., Toyono T., Seta Y., and Kawamoto T. Asporin in compressed periodontal ligament cells inhibits bone formation. Archives of Oral Biology. 62:86-92, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.11.010>

〔学会発表〕(計 10 件)

Ueda M.: Compressive force induces asporin in periodontal ligament cells. Interdisciplinary Medical, Dental and Soft-material Researches on the move-Showcase Review at Kitakyushu-、2016 年 1 月 22-23 日、北九州国際会議場（福岡県・北九州市）

黒石加代子: ヒト歯根膜線維芽細胞における Osteostatin の放出は伸展刺激により増加する、第 51 回日本口腔組織培養学会学術大会、2014 年 11 月 15 日、九州歯科大学講堂（福岡県・北九州市）

上田雅恵: 遠心力による機械的圧迫力を付与したヒト歯根膜線維芽細胞における Asporin と Sclerostin の発現と放出、第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20~22 日、幕張メッセ（千葉県・千葉市）

黒石加代子: 伸展刺激はヒト歯根膜線維芽細胞における Osteostatin の放出を促進する、第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20~22 日、幕張メッセ（千葉県・千葉市）

上田雅恵: 遠心力による機械的圧迫力を付与したヒト歯根膜線維芽細胞における Asporin と Sclerostin の関与について、第 50 回口腔組織培養学会学術大会、2013 年 11 月 23~24 日、日本歯科大学生命歯学部九段ホール（東京都）

上田雅恵: 機械的圧迫力によるヒト歯根膜線維芽細胞における Asporin と

Sclerostin の発現変化について、第 72 回日本矯正歯科学会大会、2013 年 10 月 7 ~ 9 日、キッセイ文化ホール松本市総合体育館（長野県・松本市）

上田雅恵：機械的圧迫力を付与したヒト歯根膜線維芽細胞における Asporin と Sclerostin の発現と放出について、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 20 ~ 22 日、岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

黒石加代子：伸展刺激を付与したヒト歯根膜線維芽細胞における Osteostatin の放出について、第 73 回九州歯科学会総会学術大会、2013 年 5 月 18 ~ 19 日、九州歯科大学講堂（福岡県・北九州市）

上田雅恵：機械的圧迫力によるヒト歯根膜線維芽細胞における骨形成調節タンパクの発現変化について、第 73 回九州歯科学会総会学術大会、2013 年 5 月 18 ~ 19 日、九州歯科大学講堂（福岡県・北九州市）

黒石加代子：伸展刺激はヒト歯根膜線維芽細胞におけるオステオアクチビンの放出を促進する、第 49 回日本口腔組織培養学会学術大会、2012 年 11 月 17 日、広島大学医学部広仁会館（広島県・広島市）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

黒石加代子（Kuroishi Kayoko）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60468303