

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893073

研究課題名(和文)咬合刺激低下歯に矯正力を加えた際に生じる虚血障害のメカニズム解明とその予防

研究課題名(英文) Mechanism elucidation and the prevention of ischemic injury that occurs upon the addition of orthodontic tooth movement under the occlusal hypofunctional condition

研究代表者

臼見 莉沙 (Usumi, Risa)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90706946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：矯正臨床において、咬合刺激低下歯に急激に矯正力を加えると歯根吸収や骨性癒着、歯髄壊死が生じる。これまでわれわれは咬合刺激低下歯に対する歯の移動を行った際、血管系に与える影響を明らかとし、歯根膜における虚血障害を提言してきた。その詳細なメカニズムは明らかとなっておらず、本研究において、虚血障害時のアシドーシスにおいて、プロトンセンサー-GPR4がcAMPをセカンドメッセンジャーとして骨破壊に関与していることが示唆された。また歯根膜組織の虚血障害における組織修復にLIPUSが有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In orthodontic clinical, root resorption, bone adhesions and pulp necrosis caused when we make sudden orthodontic force to occlusal hypofunctional teeth. We revealed the influence of the vascular system under the orthodontic hypofunctional tooth movement, and we have recommended the ischemic injury in the periodontal ligament. It is not revealed its detailed mechanism, but in this study, In acidosis during ischemic injury, it has been suggested that proton sensor GPR4 are involved in bone destruction of cAMP as a second messenger. Also, LIPUS to tissue repair in ischemic injury of periodontal ligament tissue has been suggested to be useful.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学 咬合刺激低下 LIPUS

1. 研究開始当初の背景

生体は、適度なメカニカルストレスを受けながら、細胞の構造や機能を変化させる。例えば、宇宙空間のような無重力状態、寝たきり状態やギプス固定などの不動化状態に持続的に曝されると、骨や筋肉の萎縮が起こることはよく知られている。同様に、歯の喪失により咬合力がかからなくなると歯槽骨の減少や、対合歯の歯周組織に様々な影響が及ぶ。われわれは、咬合機能の生物学的意義を明らかにするため、咬合刺激というメカニカルストレスを低下させた時の歯周組織の変化について、微小血管、歯根膜機械受容器、歯槽骨について様々な廃用性変化を明らかにしてきた。特に血管系の変化については歯周組織の変化と血管リモデリングは密接に関係していることが明らかとなっている。この中でも、血管内皮増殖因子である VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) はメカニカルストレスを受けることで産生が促され、血管新生や骨リモデリングを活性に誘導することが報告されている。歯に矯正力をかけた際には、圧迫側歯根膜における血管の圧迫により、血流の減少、酸素濃度の減少が引き起こされることで、細胞の変化がはじまり、牽引側歯根膜では逆の現象がおこり、細胞の変化が始まることは古くから血流理論として知られている。しかしながら、咬合刺激を喪失した歯にメカニカルストレスを加え、矯正学的に移動をさせた際に、血管系が受ける影響は明らかにされていない。これまで歯根膜において血管新生増殖因子である VEGF の発現に着目した報告は認められるが、その受容体である血管新生増殖因子受容体 VEGFR の発現を報告したものはなく、中でも VEGFR-2 を介する血管新生に点が本研究の特徴であり、リガンドである VEGF だけでなく VEGFR-2 に着目することでより確実に血管新生のメカニズムを明らかにできる。

2. 研究の目的

矯正臨床において、咬合刺激低下歯に急激に矯正力を加えると歯根吸収や骨性癒着、歯髄壊死が生じることが知られているが、その詳細なメカニズムについては明らかにされていない。これまでわれわれは咬合刺激低下歯に対する歯の移動を行った際、正常咬合歯とは異なる移動様相を呈し CD31・VEGF-A・VEGFR-2 の発現など血管系に影響を与えることを明らかとし、歯根膜においてさらなる虚血障害が起っていることを提言してきた。また歯の移動開始後、経時的に血管内皮細胞 (CD31 陽性細胞) だけでなく他の歯根膜細胞にも VEGF-A・VEGFR-2 の発現が多く認められ、VEGFR-2 陽性細胞が形成・修復過程に何らかの役割を担っていることも示唆された。しかし、その詳細なメカニズムは不明であり、矯正力による違いや、組織障害、ま

たその修復過程は明らかとなっていない

3. 研究の方法

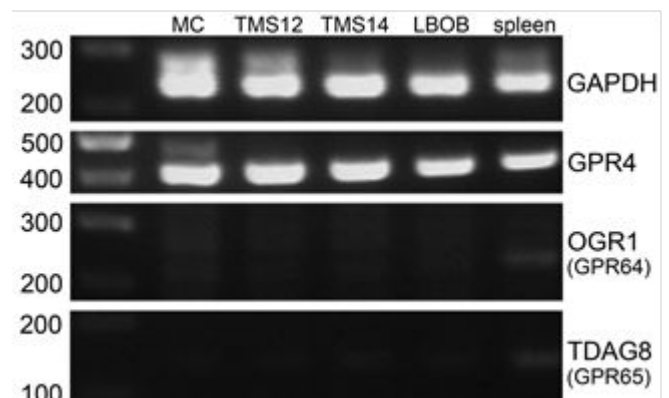
これまでわれわれはラット臼歯の咬合刺激を低下後、矯正力を用いて移動する実験系において、咬合刺激の低下が歯根膜における逆行性変化をもたらし、咬合刺激低下歯を矯正力を用いて移動した場合、正常咬合歯とは異なる移動様相を呈し CD31・VEGF-A・VEGFR-2 の発現に影響を与えることを明らかとしてきた。しかし歯根膜組織の修復・再生過程においては血管新生に関し、血管内皮細胞への VEGF-A・VEGFR-2 の関与や他組織での未分化幹細胞への発現は報告があるが、その他の歯根膜細胞への関与は報告されていない。そこで本研究では以下の

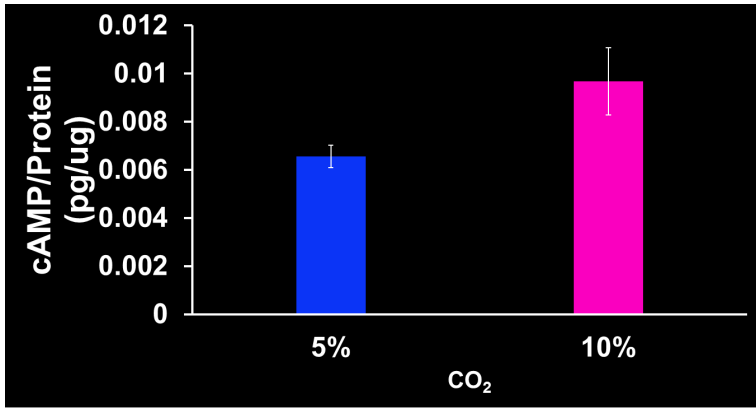
- (1) VEGF による VEGFR-2 誘導に着目した、歯根膜組織の再生・修復機構の解明
 - (2) 咬合刺激低下歯に対する適切な矯正力の検討
 - (3) 分子生物学手法を用いた咬合刺激低下歯における虚血障害の予防
- という3点について細胞培養実験、疾患動物モデルを用いて研究計画の立案を行った。

4. 研究成果

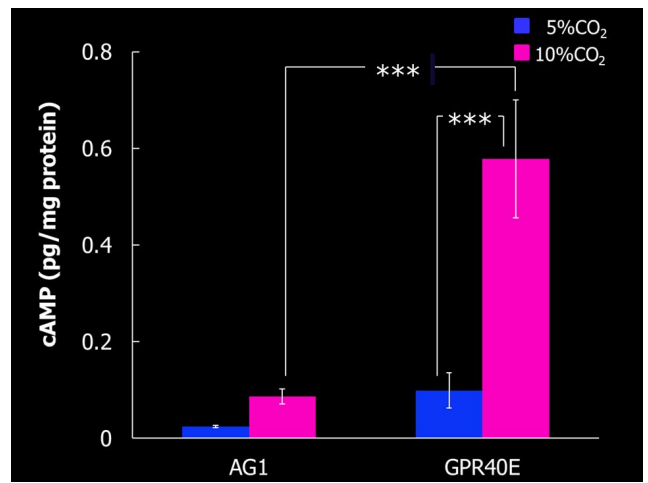
(1) ヒト・テロメアーゼ遺伝子 (hTERT 遺伝子) を安定発現させた不死化クローン歯根膜細胞クローン細胞の作製を試みたが、安定発現に難を要し、歯根膜細胞を継代培養し 3.4 世代を用いて実験を行った。虚血障害を起こすと、組織周辺は解糖系が進むことからアシドーシスになっていると考えられ、歯槽骨においてアシドーシスは骨芽細胞の石灰化抑制、骨破壊の促進を引き起こすが、その詳細なメカニズムは分かっていない。アシドーシスはプロトンセンサーを介して血管機能、免疫系、虚血、炎症、がんなど様々な病態をもたらすとされており、中でも GPR4 は、酸性環境下で cAMP を介し骨芽細胞の RANKL 発現を上昇させ、破骨細胞分化に影響することを仮説として実験を開始した。

まず歯根膜細胞においてプロトンセンサー GPR4 の発現を確認した。

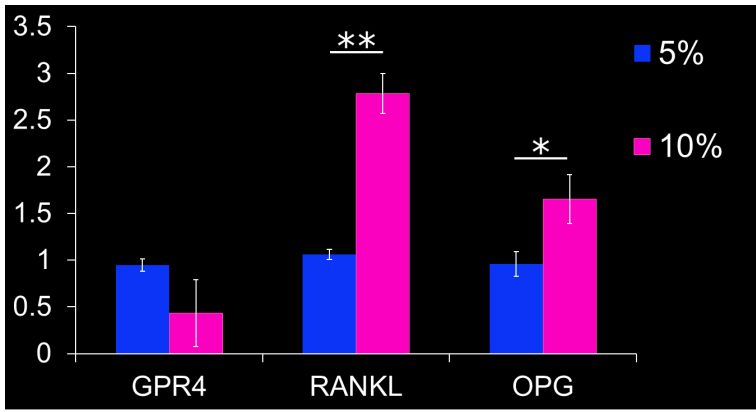




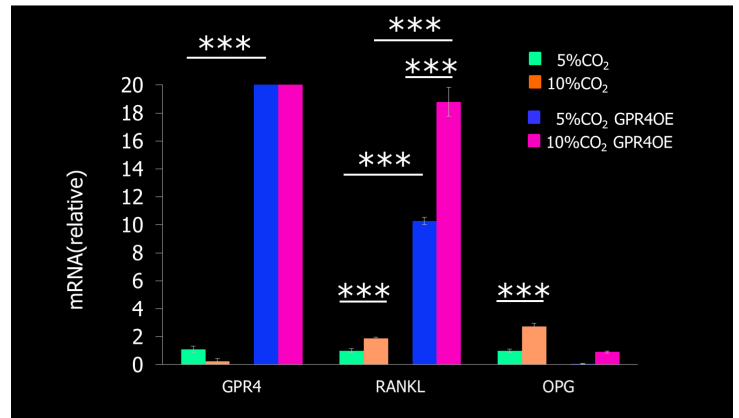
10%CO₂ 環境下で培養した TMS-12 において細胞内 cAMP 濃度の上昇が確認された



10%CO₂ 環境下で培養した TMS-12 において cAMP 濃度の上昇が確認された



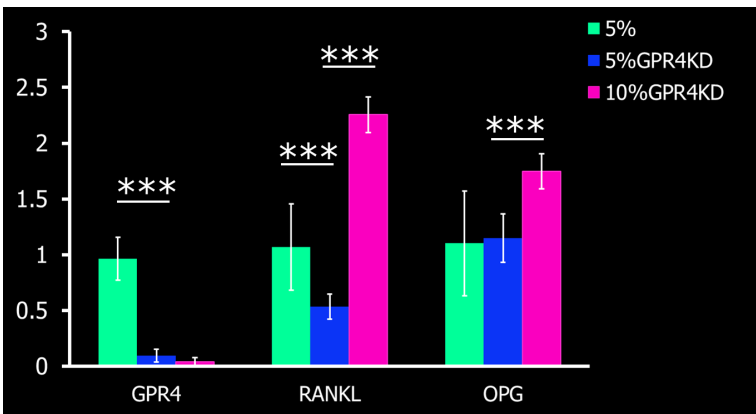
10%CO₂ 環境下で培養した TMS-12 において RANKL、OPG の mRNA の発現上昇が確認された



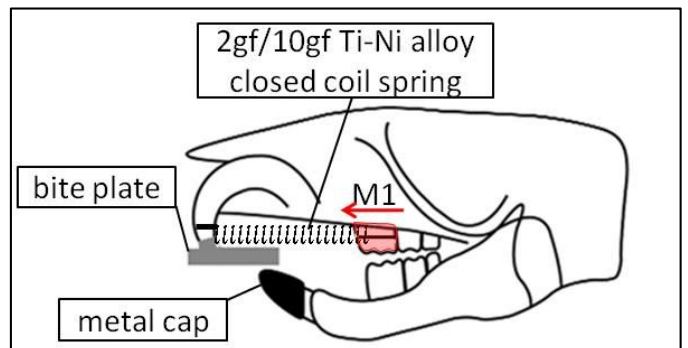
RANKL の mRNA の発現上昇が認められた

このことからアンドーシスにおいて、プロトンセンサー-GPR4 が cAMP をセカンドメッセンジャーとして骨破壊に関与していることが示唆された。

(2) まず以前よりわれわれの実験モデルとして用いているラット咬合刺激低下モデルを用い 12 週齢より 2 週間咬合刺激を低下させた。



GPR4 をノックダウンさせた TMS-12 では、RANKL mRNA の発現減少が認められた



矯正歯の移動として 2gf および 10gf の Ti-Ni コイルスプリングを用い M1 の近心移動を開始する予定であるが、現在 10gf の近心移動のみ終了し、2gf については今後比較検討する。移動開始 1、2、3 および 7 日後に、M1 の移動様相、周囲骨の骨性状をマイクロ CT を用いて評価を行う。また、非脱灰新鮮凍結切片を作製し、実験的矯正移動時における歯根膜の変化を、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、CD31 等の各種の血管新生因子および血管標識因子、フリーラジカル、炎症性サイトカイン、TUNEL 染色などの免疫組織学的解析、リアルタイム PCR によるメッセージレベルでの発現量の定量化や、イムノブロッディング法によるタンパク質レベルでの発現量の評価を予定している。

また虚血障害の予防として、前述同様、ラットの臼歯咬合刺激を低下させ 2week 経過後、LIPUS を照射しその変化を VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、CD31 等の各種の血管新生因子および血管標識因子、フリーラジカル、炎症性サイトカイン、TUNEL 染色などの免疫組織学的解析、メッセージレベルでの観察を行い、歯の移動開始後 1、2、3、7 日後での変化を同様に観察を行い、現在解析中である。

矯正臨床において未だ明らかとなっていない咬合刺激低下歯の矯正学的移動で生じる組織障害の機序の解明、分子生物学的手法を用いて、その分子機構の理解下での予防法、処置法が明らかになれば、歯科矯正分野における新たな治療法確立への一助となるであろう。

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)Chisa Shitano, Otto Baba, Sawa Kaneko, Jun Hosomichi, Yasuhiro Shimizu, Naoki Shibutani, Risa Usumi-Fujita, Yoshiro Takano, Takashi Ono. Alveolar bone loss induced by the orthodontic tooth movement under hypofunctional conditions in rats. Orthodontic Waves 12/2013; 72(4):148-155. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

(1)沖藤 明日香、中浜 健一、細道 純、舌野 知佐、白見 莉沙、清水 康広、石田 雄二、金香 佐和、森田 育男、小野 卓史 骨芽細胞の破骨細胞支持能の獲得におけるプロトンセンサーGPR4 の関与 第 73 回日本矯正歯科学会 2014 年 10 月 20~22 日 幕張メッセ (千葉)

(2)白見 莉沙、藤田 紘一、渋谷 直樹、米満 郁男、大村 進、藤内 祝、小野 卓史 重度閉塞型睡眠時無呼吸を呈する骨格性下顎前突症に対し Le Fort 型骨切り術単独で上顎骨を前方移動した 1 例 第 24 回顎変形症学会総会・学術大会 2014 年 6 月 9~11 日 アクロス福岡(福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

白見 莉沙(USUMI RISA)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：90706946

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：