

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893289

研究課題名(和文) 破歯細胞形成誘導におけるセメント細胞・セメント芽細胞とアポトーシスの関与

研究課題名(英文) Involvement of apoptosis of cementocytes and cementoblasts in inducement of odontoclastogenesis

研究代表者

清水 真美 (SHIMIZU, Mami)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号：50732856

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)：in vivoにおいて強い矯正力を負荷してから3日目で圧迫側のセメント質部にcaspase-8の発現を認めた。また5日目で歯根吸収が生じ圧迫側のセメント質にcaspase-3の発現を認めた。in vitroではcompression forceをセメント芽細胞に負荷した結果、caspase-3、8ともに3時間で発現が増加しはじめ、6時間でピークに達した。以上のことから強い矯正力を負荷した際に圧迫側のセメント芽細胞でアポトーシスが発現すること示唆された。また強い矯正力を負荷した群では歯根吸収の発現が認められアポトーシスも増加していたことより歯根吸収とセメント芽細胞の関連性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Twelve male 6-week-old Wistar rats were subjected to orthodontic force of 10 or 50 g to induce a mesially tipping movement of the upper first molars for 5 days. The expression levels of caspase-3, 8 protein were determined in cementum area by Immunohistochemical analysis. Furthermore, the effect of compression force on the expression of caspase-3, 8 were investigated using human cementoblasts in vitro. As a result, in vivo study revealed an increased caspase-8 -positive cells in 50g orthodontic force groups on day 5. The immunoreactivity for caspase-8 in 50g group was observed in resorbed root surface subjected to the orthodontic force. In the in vitro study, the compression force increased the expression of caspase-3, 8 from the human cementoblasts on 3 hours, and reached the peak on 6 hours. The results of this study suggest that apoptosis response to excessive orthodontic force may aggravate the process of root resorption in human cementoblasts.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：歯根吸収 アポトーシス セメント質 セメント芽細胞 矯正力 破歯細胞

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正学的歯の移動において患者によって個人差はあるものの多かれ少なかれ歯根吸収が生じることが知られており、矯正治療を受けたことのある人のほとんど全ての歯根に、ある程度の短小化が認められ、歯根の1/4を超える重度の歯根吸収は上顎中切歯では全体の3%に認められると報告されている。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。当講座では、歯根吸収発生のメカニズムの解明をメインテーマとして研究してきており、今までに以下のことを報告した。

(1) ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDL cells) に持続的圧迫力 (compression force) を与えるとRANKL産生が増加することを明らかにした。Nishijima Y. *Orthod Craniofac Res*, 2006.

(2) 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の発現を認めることを明らかにした。Nakano Y. *Eur J Orthod*, 2010.

(3) HPDL cells に compression force を与えるとIL-8, MIP-1産生が増加すること、および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CINK, MIP-1の発現を認めることを明らかにした。Asano M. *Oral Diseases*, 2011.

(4) ラットの実験的歯の移動時に歯根膜にアポトーシス関連因子である caspase-8, TUNEL 陽性細胞の発現を認め、矯正学的歯の移動時にアポトーシスが生じることが明らかにした。Funakoshi M. *J Hard tissue biology*, 2013.

以上のことから歯根吸収の発症に、過大な矯正力によって歯根膜(細胞)から産生されたRANKL, IL-8, MIP-1が関与すること、また歯科矯正学的な歯の移動時にアポトーシスが生じることが明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は矯正治療時の歯根吸収発生メカニズムの解明の一環として、破歯細胞形成・誘導にセメント細胞のアポトーシスが関与しているという仮説を基に、ラットを用いた実験的歯根吸収モデルにて、破歯細胞形成部にセメント細胞のアポトーシスが起きているか観察する。*in vitro* では、破歯細胞形成とセメント細胞・セメント芽細胞のアポトーシスの関係を解明するためにセメント芽細胞にアポトーシスを惹起させ破歯細胞の形成を促進する因子について検討する。さらに、破歯細胞形成とセメント細胞アポトーシスの関係を解明するために三次元歯根膜線維芽細胞・骨髄細胞・骨(セメント・セメント芽)細胞共培養系に対する加

圧刺激によるアポトーシスが破歯(骨)細胞形成を促進するかを検討する。

3. 研究の方法

平成26年度:

(1) *in vivo* でラットの上顎第一大臼歯を10g(至適矯正力)と50g(過度な矯正力)の矯正力にて牽引し、当該部の切片はH.E染色、TRAP染色、TUNEL染色にてアポトーシスの発現の検討を行う。

(2) *in vitro* においてはセメント芽細胞の単離培養を行う。

平成27年度:

(1) *in vivo* で平成26年度と同様にラットの上顎第一大臼歯を10gと50gの矯正力にて牽引し、当該部の切片は免疫組織化学染色にてアポトーシス関連因子であるcaspase-3, 8の発現を検討する。

(2) *in vitro* においては培養したセメント芽細胞に矯正力として1g(至適矯正力)と4g(強い矯正力)のcompression forceを加えPCR法にてアポトーシス関連因子であるcaspase-3, 8の遺伝子発現を検討する。

4. 研究成果

In vivo において、ラットの歯牙移動5日目のHE染色にて10g群と比較して50g群の圧迫側セメント質部に多くの吸収窩を認めた。また吸収窩にはTRAP陽性の多核の細胞が認められた。さらに10g群と比較して50g群の圧迫側セメント質部でTUNEL, caspase 3, 8陽性細胞の増加を認めた。*In vitro* においては、コントロール群と比較してcompression forceを加えた群でcaspase-3, 8の遺伝子発現が3時間で発現が増加し6時間でピークに達した。また1g群と比較した4g群でcaspase-3, 8の遺伝子発現が増加した。

以上の結果から、*In vivo* において5日目で強い矯正力を加えた群で多核のTRAP陽性の破歯細胞が生じ歯根吸収が惹起され、そのセメント質部にはTUNEL, caspase-3, 8陽性細胞が発現しアポトーシスが認められた。また、*In vitro* でも矯正力を負荷したセメント芽細胞でアポトーシスの発現が生じ、強い矯正力を負荷することでその発現が増加した。

これらのことから強い矯正力を負荷した際にセメント質でアポトーシスが多く発現することが示唆された。

また、強い矯正力を負荷した群では歯根吸収が多く認められ、さらにセメント質のアポトーシスの発現も増加していたことから歯根吸収とセメント質のアポトーシスには関連性があると考えられる。最近の研究で骨細胞のアポトーシスは破骨細胞形成を促進することが報告されており、セメント質と骨組織は極めて類似した生物学的特徴を有することから、セメント芽細胞で生じたアポトーシスが破歯細胞形成を促進する可能性がある。今後はセメント質のアポトーシスと歯根

吸収との関連性について骨髄細胞とセメント芽細胞の共培養等で詳しく検討する予定である。

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7件)

Hikida T, Yamaguchi M, Shimizu M, Kikuta J, Yoshino T, Kasai K. Comparison of orthodontic root resorption under heavy and jiggling forces during experimental tooth movement. Korean J Ophthalmol, in press. (査読あり)

Tanaka K, Yamaguchi M, Hikida T, Yoshino T, Kikuta J, Shimizu M, Takahashi M, Kasai K. Jiggling force aggravates orthodontic root resorption via TNF- during rat experimental tooth movement. Int J Oral-Med Sci, 14(4):82-90, 2016, <http://doi.org/10.5466/ijoms.14.82> (査読あり)

Ohashi M, Yamaguchi M, Hikida T, Kikuta J, Shimizu M, Goseki T, Kasai K. Jiggling Force Induces Orthodontic Root Resorption during Tooth Movement in Rats, Int J Oral-Med Sci, 14(1):13-20,2015,<http://doi.org/10.5466/ijoms.14.13> (査読あり)

Isogai N, Yamaguchi M, Kikuta J, Shimizu M, Yoshino T, Hikida T, Takahashi M, Goseki T, Kasai K. Wnt5a Stimulates the Bone Formation in Tension Side during Orthodontic Tooth Movement. Int J Oral-Med Sci, 13(3):120-127,2015,<http://doi.org/10.5466/ijoms.13.120> (査読あり)

Nakano Y, Yamaguchi M, Shimizu M,

Kikuta J, Yoshino T, Tanimoto Y, Kasai K. Interleukin-17 is involved in orthodontically induced inflammatory root resorption in dental pulp cells. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 148(2):302-309,2015,doi:10.1016/j.jado.2015.03.023 (査読あり)

Kikuta J, Yamaguchi M, Shimizu M, Yoshino T, Kasai K. Notch signaling induces root resorption via RANKL and IL-6 from hPDL cells. J Dent Res, 94(1):140-147,2015,doi:10.1177/0022034514555364. (査読あり)

Odaira-Yamazaki M, Yamaguchi M, Kikuta J, Shimizu M, Yoshino T, Hikida T, Takahashi M, Kasai K. Jagged1 Stimulates Bone Resorption during Orthodontic Tooth Movement, Int J Oral-Med,Sci,13(2):59-65,2014,<http://doi.org/10.5466/ijoms.13.59> (査読あり)

[学会発表](計7件)

杉森 匡, 山口 大, 清水 真美, 吉野 智一, 菊田 純, 疋田 拓史, 高橋 桃子, 村上嘉規, 葛西 一貴, 矯正学的歯の移動速度は皮質骨切除術により歯根膜細胞周期の活性化を介して促進する, 第74回日本矯正歯科学会大会, 2015年11月18日~20日, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

疋田 拓史, 山口 大, 清水 真美, 吉野 智一, 菊田 純, 高橋 桃子, 葛西 一貴, ジグリングおよび強い矯正力における破歯細胞の免疫組織化学的発現の比較検討, 第74回日本矯正歯科学会大会, 2015年11月18日~20日, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

Hikida T, Yamaguchi M, Shimizu M,
Kikuta J, Yoshino T, Takahashi M ,
Kasai K, Light jiggling force
aggregates orthodontic root
resorption via production of
inflammatory cytokines, 8th
International Orthodontic Congress
2015, London, UK, Sep27-30, 2015.

Kikuta J, Yamaguchi M, Shimizu M,
Yoshino T, Kasai K. The Notch
signaling response to an excessive
orthodontic force stimulates
orthodontically-induced inflammatory
root resorption via RANKL and IL-6
production from hPDL cells, 8th
International Orthodontic Congress
2015, London, UK, Sep27-30, 2015.

Yamaguchi M, Kikuta J, Shimizu M,
Hikida T, Takahashi M , Kasai K,
Low-energy laser irradiation
accelerates the velocity of tooth
movement via the expression of
osteopontin in tension side, 8th
International Orthodontic Congress
2015, London, UK, Sep27-30, 2015.

菊田 純, 山口 大, 山田 邦彦, 清水 真美, 吉野 智一, 疋田 拓史,
高橋 桃子, 葛西一貴, Notch シグナル
は Wnt シグナルを抑制することにより歯
根吸収を増悪させる, 第 73 回日本矯正歯
科学会大会, 2014 年 10 月 20 日 ~ 22 日
幕張メッセ, 千葉県千葉市

疋田 拓史, 山口 大, 清水 真美,
吉野 智一, 菊田 純, 高橋 桃子,
葛西 一貴, シグリングがヒト歯根膜
線維芽細胞の炎症性サイトカインの遺
伝子発現に及ぼす影響, 第 73 回日本矯
正歯科学会大会, 2014 年 10 月 20 日 ~ 22
日, 幕張メッセ, 千葉県千葉市

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

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)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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

清水 真美 (SHIMIZU, Mami)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号: 50732856

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし