

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861802

研究課題名(和文) 歯の移動時の牽引側歯根膜で惹起される骨芽細胞分化のエピジェネティクス制御の解明

研究課題名(英文) Study of osteoblasts differentiation of periodontal ligament fibroblasts by epigenetic control in tension zone during orthodontic tooth movement

研究代表者

石川 美佐緒 (Ishikawa, Misao)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90582445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯科矯正治療における歯の移動時の牽引側歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞への分化について、ヒストン3の9番目のリジン(H3K9)のメチル化修飾に焦点を絞り、エピジェネティクスという観点からその分化を明らかにすることを目的とした。

その結果、歯の移動後7日目をピークとして歯根膜線維芽細胞でメチル化修飾を受けるという変化が観察された。また、牽引側の歯根膜線維芽細胞でH3K9メチル化修飾酵素が働き、経時的なH3K9メチル化修飾変化が生じていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the osteoblasts differentiation of periodontal ligament fibroblasts in tension zone during orthodontic tooth movement, focusing on methylation modification at histone H3 lysine 9 (H3K9) from the view point of epigenetics control. We observed the changes that localization of methylated H3K9 modifications with peak at 7th days after tooth movement in periodontal ligament fibroblasts. In addition, it was suggested that the H3K9 methyltransferases acted in the periodontal ligament fibroblasts in the tension zone and the H3K9 methylation modification change was occurred in time-dependent.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯科矯正治療 歯根膜線維芽細胞 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療における歯の移動には、歯周組織である歯肉・歯根膜・歯槽骨・セメント質の中でも歯根膜が重要な機能を果たしている。歯の移動時の歯根膜は、圧迫側と牽引側に分かれる。牽引側歯根膜では歯根膜線維は牽引され、歯槽骨表面で類骨の形成・石灰化により骨形成が促進し、歯根膜の恒常性が維持されて歯の移動が完了する。この歯の移動の際、従来から骨表面にあった lining osteoblasts が活性化されて active osteoblasts へと移行し骨を形成するばかりでなく、歯根膜中の線維芽細胞が骨芽細胞へ分化し骨の形成を促進するという報告や、歯根膜線維芽細胞はセメント芽細胞に分化する多能性を有するという報告がある。

研究代表者も歯を移動した際の歯根膜組織の組織学的、分子生物学的研究から、歯根膜線維芽細胞が皮下や歯肉下の線維芽細胞とは異なり、骨芽細胞と同様の alkaline phosphatase 活性を有すること、iPS 細胞作製時の cell source としても非常に高い作製効率を示すことなどを明らかにし、歯根膜線維芽細胞が多能性を有するという結果を得ている。このことから、歯の移動において歯根膜線維芽細胞から骨芽細胞へと分化し、あるいは形質転換が起こるということは十分予想されるが、この線維芽細胞から骨芽細胞への分化の制御機構については明らかになっていない。

最近、エピジェネティクスが細胞や組織の発生・分化・リプログラミングなどにおいて、さまざまな生命現象に関与することが明らかになっており、成体では組織幹細胞や細胞分化の制御のために必須の機構である。このエピジェネティクスはヒストン修飾、DNA メチル化修飾、クロマチンリモデリング因子によって担われ、組織特異的な遺伝子発現に関与している。そのため、歯を移動した際、骨表面で歯根膜線維芽細胞から骨芽細胞への分化もこの制御（特にヒストン化学修飾）を受けているものと考えられる。

### 2. 研究の目的

歯科矯正治療における歯の移動時の牽引側歯根膜に生じる歯槽骨(類骨)形成に際し、歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞への分化について不明な点が多い。本研究は、牽引力を受けたことで惹起される歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞への分化やその多能性について、エピジェネティクスという観点から捉え、その分化の過程を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)実験動物としてラットまたはマウスを用い、実験群は口腔内に矯正装置を装着し、上

顎第一臼歯に矯正力を加えて歯を移動させ(1、3、7、14、21日間)その牽引側歯根膜を実験対象とした。矯正装置を装着し、矯正力を加えない群を対照群とした。

(2)実験動物の歯の移動を経時的に  $\mu$ CT 撮影を行い、形態学的変化を観察した。

(3)歯の移動後、第一大臼歯を含む周囲組織を摘出し、脱灰および paraffin 包埋を行った。連続切片を作製し、H-E 染色で形態学的変化、免疫組織化学染色で H3K9 のメチル化修飾 (-me1, -me2, -me3) の発現局在について検討した。同時に、ヒストン(H3) リジン(K9) methyltransferases 群の G9a, GLP, Setdb1, PRDM2 (RIZ1), SUV39H1, SUV39H2 の発現局在についても観察をおこなった。

(4)免疫組織化学染色結果をもとにクロマチン凝集について、実験群と対照群の歯根膜線維芽細胞の核内について電子顕微鏡(TEM)にて観察をおこなった。

(5)マウスの凍結非脱灰切片を作製し、laser capture microdissection 法を用いて牽引側歯根膜組織を採取し、real-time PCR 法にて、H3K9 methyltransferases の発現を検討した。

### 4. 研究成果

(1)実験動物ラットとマウスの矯正装置について

本研究では、これまで通り、実験動物としてラットに矯正装置を装着し実験途中まで用いてきたが、研究方法(5)PCR 法で発現実験をおこなう際、ラットのプライマー設計が難しく、実験途中から実験動物をマウスに変更せざるをえなかった。そのため、これまでのラットの矯正装置同様の歯の動きがマウスでも行っているか  $\mu$ CT 撮影をおこない、歯の動きについて確認した(Fig.1)。

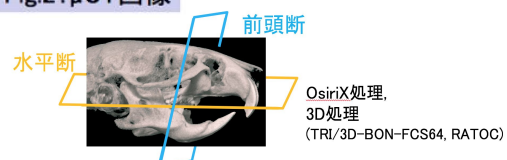
Fig.1: Mouseの歯の移動法

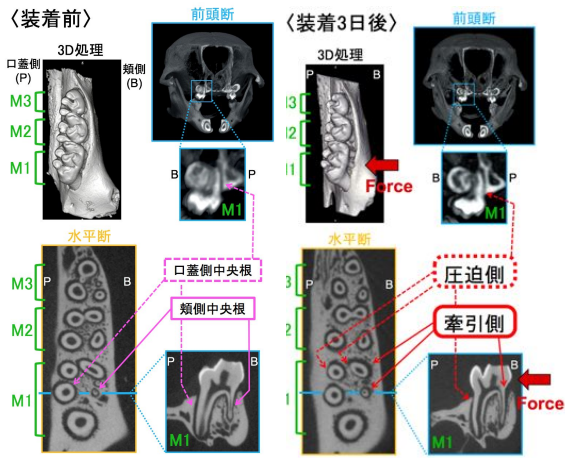


(2)  $\mu$ CT 画像結果

経時的なマウスの  $\mu$ CT 撮影より、矯正装置装着3日後では第一臼歯(M1)の中央根と遠心根で、矯正力に応じた牽引/圧迫側が区別され、牽引側では歯根膜腔の拡大が確認できた(Fig.3)。しかし、近心根では牽引/圧迫側が区別されず、近心根は実験対象とはならないことが分かった。

Fig.2:  $\mu$ CT画像

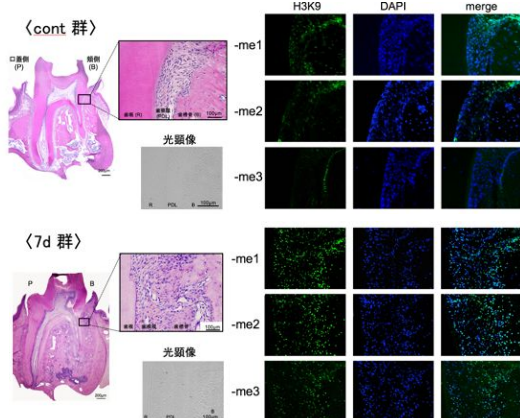




### (3)形態組織学的変化と免疫組織化学染色結果

H-E 染色形態学的所見より、実験群の歯の移動7日目までに牽引側歯根膜腔の著しい拡大とそれに伴う歯根膜線維の伸展を認め、歯槽骨側では活性型骨芽細胞の増加を確認した(Fig.3)。それと同時に、免疫組織化学染色より、対照群の歯根膜線維では H3K9 メチル化修飾 (-me1, -me2, -me3) の発現を認めしたが、-me2,3 の発現は弱かった(Fig.3)。実験群7日目をピークに-me2,3 も歯根膜線維芽細胞や歯槽骨表面の活性型骨芽細胞に強い発現を認めた。実験群 21 日目では、-me1 の発現を認めるが、-me2,3 の発現は弱く、対象群と同様の発現局在を示した。H3K9 メチル化修飾(特に-me2,3)は遺伝子発現を抑制すると言われているが、歯根膜組織と歯槽骨のリモデリングを活性化する働きがあると考えられる。以上の結果より、対象群とメチル化修飾発現の強い実験群7日目の H3K9 methyltransferases の発現局在について免疫組織化学染色を行ったところ、G9a と GLP にて H3K9 メチル化修飾局在と同様の発現局在を確認できた。発現強度を計測したところ、G9a では有意差はみられなかったが、GLP にて有意差があった。

Fig.3:H-E染色、H3K9メチル化修飾免疫組織化学染色



### (4)TEM 画像結果

TEM による核内のクロマチンを観察した結果、実験群7日目の牽引側歯根膜線維芽細胞のクロマチン凝集が確認でき、対象群と比べると凝集像が多く確認できた(Fig.4)。そのため、メチル化修飾を牽引側歯根膜線維芽細胞が受けているという、免疫組織化学染色結果を裏付ける結果を得た。

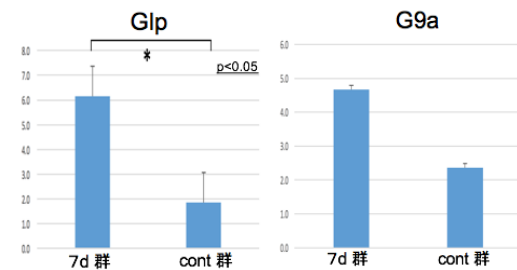
Fig.4:TEM像



### (5)H3K9 methyltransferases の発現結果

対照群と実験群7日目の牽引側歯根膜組織を採取し、real-time PCR 法にて、H3K9 methyltransferases 群の G9a, GLP, Setdb1, PRDM2 (RIZ1), SUV39H1, SUV39H2 の発現を検討した。その結果、実験群にて、G9a と GLP にて発現が優位に出たため、これら2つの酵素が優位に働き H3K9 メチル化修飾を牽引側歯根膜線維芽細胞が受けていることが考えられた(Fig.5)。

Fig.5:real-time RT-PCR結果



以上の結果より、歯の移動初期の牽引側歯根膜線維では、H3K9 methyltransferases の活性により一時的な H3K9 メチル化修飾の変化による遺伝子の発現制御がなされていることが考えられた。この歯根膜線維芽細胞のメチル化修飾変化は、常に強い発現局在を示していた歯槽骨表面の骨芽細胞とは異なる変化であったため、歯根膜線維芽細胞と同様の遺伝子発現を示しているとは考えにくかった。しかし、この歯根膜線維芽細胞は歯の移動という変化に迅速に対応できる細胞であり、それは一時的なメチル化修飾変化を起こしていることから多能性を有する細胞であることが示唆された。

今後、*in vitro*での歯根膜線維芽細胞培養実験による遺伝子発現と H3K9 メチル化修飾の変化を合わせながら、歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞分化についてさらなる探索をおこなっていきたい。

## 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)

Tsuyoshi Narimiya, Satoshi Wada, Hiroyuki Kanzaki, Misao Ishikawa, Atsushi Tsuge, Yuuki Yamaguchi, and Yoshiki Nakamura, Orthodontic force induces angiogenesis via Col-IV degradation by MMP-12, *J Periodont Res.* 2017;1-11, DOI: 10.1111/jre.12453, 査読(有)

Kanako Itohiya, Hiroyuki Kanzaki, Misao Ishikawa, Satoshi Wada, Yutaka Miyamoto, Tsuyoshi Narimiya, and Yoshiki Nakamura, Occlusal hypofunction mediates alveolar bone apposition *via* relative augmentation of TGF- $\beta$  signaling by decreased Asporin production in rats, *Dent Oral Craniofac Res*, 3(1):2-8, 2016, DOI: 10.15761/DOCR.1000192, 査読(有)

[学会発表](計6件)

石川 美佐緒、松澤 綾美、千葉 敏江、下田 信治、歯の移動時の歯根膜におけるメチル化修飾に関する免疫組織化学的研究、第122回日本解剖学会、2017年3月28~30日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

糸日谷 佳菜子、菅崎 弘幸、石川 美佐緒、下田 信治、中村 芳樹、Asporinは咬合機能低下に伴う新生歯槽骨添加における制御因子である、第75回日本矯正歯科学会大会、2016年11月7~9日、アスティとくしま(徳島県徳島市)

Ishikawa Misao, Itohiya Kanako, Takano Yoshiro, Nakamura Yoshiki, Shimoda Shinji, Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters, Pit-1 and Pit-2, are essential in the Calcification by human Periodontal Ligament Cell, 第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年8月24~26日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

梅木 大輔、大貫 芳樹、伊藤 愛子、八木澤 由佳、成山 明具美、石川 美佐緒、他(3名)、咬筋および心筋における咬合挙上の筋肥大効果とデキサメタゾンの拮抗作用、第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年8月24~26日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

関水 健宏、塩崎 一成、石川 美佐緒、他(7名)、歯髓内血管および全身の動脈の石灰変性との関連に関する研究、第121回日本解剖学会、2016年3月29~30日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

石川 美佐緒、糸日谷 佳菜子、菅崎 弘幸、高野 吉郎、中村 芳樹、下田 信治、歯の移動時における歯根膜中の H3K9 メチル化修飾の免疫組織化学的研究、第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月18~20日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 美佐緒(ISHIKAWA, Misao)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号: 90582445