

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593052

研究課題名(和文) 歯の移動初期の牽引側歯根膜に発現する免疫関連因子の機能解析

研究課題名(英文) Function of immunocompetent cells in the tension zone of periodontal ligament in tooth movement

研究代表者

中村 芳樹 (Nakamura, Yoshiki)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：10097321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：歯の移動初期の牽引側歯根膜における免疫系細胞の関与について形態学的、免疫組織化学的検討した。歯の移動6時間で歯根膜腔は30%以上の拡大を示し、歯根膜線維も著しく牽引されていた。免疫系細胞ではED1陽性細胞(単球、マクロファージ)の増加がみられた。MMP12の免疫組織化学所見ではED1陽性細胞ばかりでなく、多くの線維芽細胞にも反応がみられ、牽引側歯根膜では骨形成に至る前に何らかの組織防御的な反応が生じていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Tissue reaction of the tension zone of periodontal ligament (PDL) during orthodontic tooth movement has been simplified as tugging of PDL fibers and bone formation. However, PDL fibers in the tension zone are forced to strong tugging, which causes involvement of defense system. We examined an involvement of immune system in the tension zone of PDL in early stage of tooth movement, using histological and immunohistochemical methods. Periodontal space was enlarged to more than 130% and the PDL fibers showed a strong tugging aspect 6 hours after initiation of tooth movement. ED1 positive cells (macrophage and monocyte) were increased. However, fibroblasts also showed localization of IL-1B and MMP12. This indicates that fibroblasts involve in defense reaction of the PDL, prior to rearrangement of the PDL and bone formation on the alveolar bone in the very early stage of periodontal reaction in the tension zone.

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：形態学 分子生物学

キーワード：歯の移動 牽引側歯根膜 初期変化 免疫系細胞 単球、マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

歯を移動した際の歯根膜の反応については、Sandstedt や Reitan 以来多くの研究がなされてきた。これらの研究の示唆するところは、圧迫側では歯根膜の変性壊死、炎症の発生と破骨細胞による骨吸収、牽引側では歯根膜線維の牽引と骨芽細胞の活性化による骨形成という図式として描かれている。

われわれは、歯の移動初期の歯根膜をレーザーマイクロダイセクション法により、圧迫側歯根膜と、牽引側歯根膜をそれぞれ直接採取し ( Nakamura Y, Nomura Y *et al.* Biotech Histochem, 2007 )、それら採取された歯根膜内の細胞の発現遺伝子のマイクロアレイ解析結果から、歯の移動は、細胞レベルでは非常に複雑な過程をたどることを報告してきた。特に圧迫側歯根膜では、その部位の歯根膜線維芽細胞に今まで全く報告されてこなかった遺伝子である熱ショック蛋白遺伝子 ( HSP ) の発現がみられ、遺伝子レベル ( RT-PCR ) とタンパクレベル ( 免疫組織化学的所見 ) でその発現が確認されたことから、HSP が圧迫側歯根膜で生じる細胞死や引き続いて起こる組織変性や破骨細胞の出現の Key 遺伝子になるのではないかと、いうことを学会や論文 ( Arai T, Nakamura Y *et al.* Histochemistry & Cell Biology, 2010 ) で報告してきた。

一方、牽引側歯根膜についても、その遺伝子発現においてその複雑性が指摘された。牽引側歯根膜のマイクロアレイの結果では、牽引側では歯の移動初期では骨芽細胞の分化や成熟に関する遺伝子 Runx2 や Osterix 等の遺伝子の発現はなく、免疫や炎症にかかわる Matrix metaroproteinase 12 ( MMP12 ) と Fibrinogen-like protein 2 ( FGL2 ) や炎症に関わる Interleukin-1 beta ( IL-1 ) などの遺伝子の発現がみられた。

MMP12 は歯の移動 6 時間でコントロール ( 歯の移動していない歯根膜 ) と比較して 8.49 倍、歯の移動 5 日で 134 倍の強発現を示した。MMP12 はマクロファージなどの免疫系細胞から分泌される酵素であり、エラスチンや細胞外マトリックスの分解に関与して

いると言われている。IL-1 は歯の移動 6 時間でコントロール ( 歯の移動していない歯根膜 ) と比較して 7.61 倍、歯の移動 5 日で 56.9 倍の強発現を示した。IL-1 は interleukin 1 cytokine family に属し、炎症反応の重要な mediator であるばかりでなく、細胞の増殖、分化やアポトーシスに関連している。FGL2 は歯の移動 6 時間でコントロール ( 歯の移動していない歯根膜 ) と比較して 17.9 倍、歯の移動 5 日で 10.4 倍の強発現を示した。FGL2 は多面発現作用を持ち、先天性と後天性免疫の重要な制御因子であり、マクロファージ表面に観察される蛋白である。

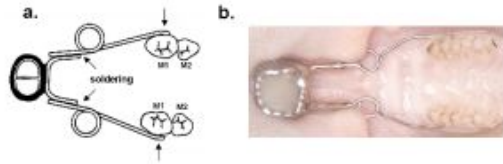
これらの事実は、歯の移動の牽引側歯根膜では免疫系関連因子が歯の移動初期の牽引側の組織反応に何らかの重要な役割を演じていることを示唆するものであり、これらの関連因子が働くことにより牽引側の歯槽骨を含めた歯根膜の改造が歯根吸収などを生ずることなくスムーズに進むものと考えられる。すなわち、牽引側歯根膜では単に歯根膜線維が「牽引された」や「骨芽細胞が活性化され、骨の添加を生じた」という表現以上の複雑な要因により制御されていることが示唆される。

### 2. 研究の目的

本研究では牽引側歯根膜の以上で述べた所見に着目し、牽引側の歯槽骨を含めた歯根膜の改造のメカニズムを分子生物学的の明らかにする目的で、以下の研究を行う。歯の移動初期に発現した免疫系関連因子である MMP12, FGL2, Il1b の中で MMP12 と IL-1B に着目し、さらに骨芽細胞の分化に関係する Osterix について形態学的、免疫組織化学的、分子生物学的に解析し、これらの遺伝子が、牽引側歯根膜の改造と骨形成にいかなる役割を果たしているのかを明確にし、歯の移動のメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

本研究では、歯の移動を行ったラット ( **6 時間、12 時間、24 時間、2 日間、5 日間** ) を実験群として、移動を行っていない群を対照群として、以下の検索を行う。実験群として使用するラットの歯の移動方法は、申請者が過去に報告した方法 ( 図 3 ) に準じて行う ( Nakamura Y *et al.* Eur J Orthod 2008 )、



(ラット臼歯の移動装置)

### (1)形態学的研究

歯の移動後、麻酔科にて上顎第一臼歯部をマイクロCTで撮影する。

その後、各群のラットをグルタルアルデハイド固定液で還流固定を施し、EDTA脱灰し、パラフィン包埋とエポン包埋する。

光学顕微鏡的観察 (歯科矯正学講座)

電子顕微鏡的観察 (鶴見大学歯学部電子顕微鏡室)

歯の移動時の牽引側歯根膜の変化を組織レベルから細胞の微細構造レベルにわたって明らかにしていく。

### (2)酵素組織化学的研究

各群のラットをグルタルアルデハイド固定液で還流固定を施し、EDTA脱灰した後、アルカリホスファターゼの活性と、酸性ホスファターゼの活性局在について検討する。

光顕酵素化学的観察 (歯科矯正学講座)

電顕細胞酵素組織学的観察 (鶴見大学歯学部電子顕微鏡的観察)

牽引側歯根膜の細胞について酵素組織化学的にその性質を明らかにしていく。

### (3)免疫組織化学的観察

歯を移動した際のラットを1.0%パラホルム固定液で還流固定を施し、EDTA脱灰、パラフィン包埋し切片を作製した。

また、非脱灰切片の観察も行った。すなわち、各群のラットを液体窒素下で冷却したイソペンタン中で上顎第一臼歯部を凍結固定し、クリオスタット(歯科矯正学講座)内で無固定非脱灰凍結切片を作製し(Nakamura Y et al, Biotech Histochemistry 2000)免疫関連因子とRunx2, Osterixについて免疫組織化学的にその局在を明らかにしていく。

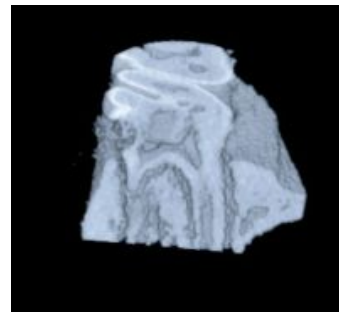
形態を中心とした観察と、各種の遺伝子のタンパクの局在について時系列に整理し、

歯根膜の組織レベルと細胞レベルの形態変化とアルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ活性の局在、ならびに免疫関連因子MMP12, IL-1の免疫組織学的局在について、それらの関連性について検討する、

これらの形態学的所見とMMP12, IL-1、およびOsterixのmRNA量の発現量を統計学的に処理し、両者の関連性について検討を加える、3)免疫系関連因子MMP12, IL-1のmRNA量とOsterixのmRNA量との相関関係を調べ、これらの因子が骨芽細胞の分化成熟といかなる関係があるかを解析する。

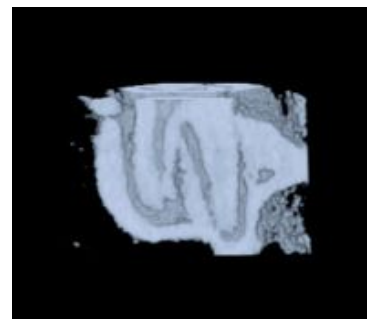
### 4. 研究成果

歯を移動した際の歯根膜の形態的な所見では、歯の移動6時間で牽引側歯根膜はコントロール(歯を移動していない歯根膜)と比較して、その歯根膜腔の明らかな拡大がみられ、歯根膜組織が拡張されていることがわかる。



(歯の移動6時間の歯根膜:マイクロCT像)

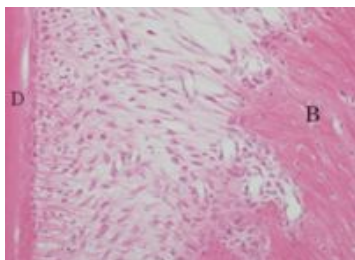
歯の移動24時間後では牽引側では更なる歯根膜腔の拡大を示し、圧迫側では既に変性組織が出現し、歯の移動が一時的にほぼ停止したことを示していた。



(歯の移動24時間の歯根膜:マイクロCT像)

組織所見では牽引側では歯の移動6時間で明らかに歯根膜線維の牽引された様相が

みられ、24時間後でもその状況は変わらない。



(歯の移動24時間の牽引側歯根膜: HE染色)

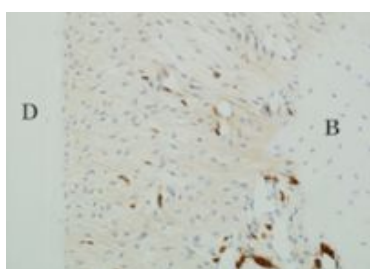
電子顕微鏡所見においても引き延ばされた collagen fiber bundles の様相がみられ、その bundle 間に扁平にのばされたような線維芽細胞細胞が介在していた。

酵素組織学的所見ではアルカリフォスファターゼの活性が歯根膜全体にみられ、コントロール所見と比較して、その局在に大きな変化は認められなかった。



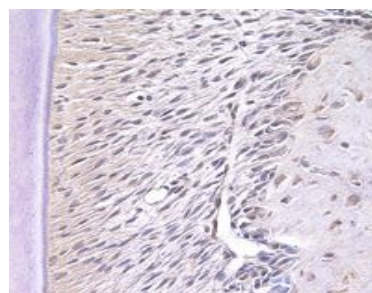
(歯の移動6時間の牽引側歯根膜におけるアルカリフォスファターゼ活性の局在)

免疫組織学的所見においても脱灰切片では歯根膜は牽引された様相を示し、ED1陽性細胞は歯根膜の血管周囲や、歯根膜線維間に観察された。



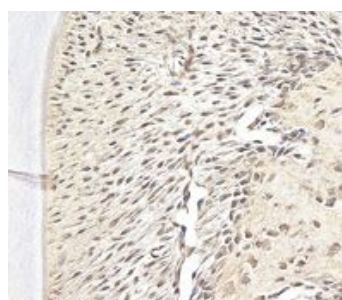
(牽引側歯根膜におけ ED1 陽性細胞の局在)

IL-1B の免疫染色による観察では、やはり血管周囲や歯根膜線維間の線維芽細胞細胞にも観察され、コントロールとは異なっていた。



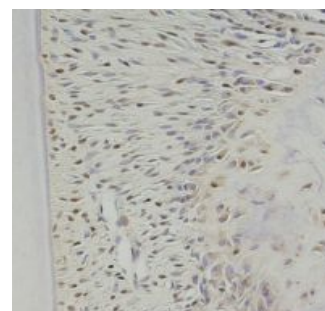
(牽引側歯根膜における IL-1 の局在)

また、MMP12 の免疫染色による観察でも、やはり血管周囲の細胞ばかりでなく、多くの線維芽細胞に局在がみられた。



(牽引側歯根膜における MMP12 の局在)

一方、骨芽細胞の分化マーカーである Osterix の局在は、骨表面の骨芽細胞ばかりでなく、セメント質表面のセメント芽細胞にみられた。また、歯根膜の線維芽細胞細胞にもその局在が散見された。



(牽引側歯根膜における Osterix の局在)

無固定非脱灰による観察では、明確な局在性が認められなかった。今後、免疫染色における方法論の確立が必要と思われる。

以上から、歯の移動初期の牽引側歯根膜では免疫系の ED1 陽性細胞である単球やマクロファージ出現による炎症系因子 MMP12 や IL-1beta の分泌ばかりでなく、多くの線維芽細胞にも上記の両因子の局在が認められた。

従って歯の移動した際の歯根膜牽引側の初期反応は歯根膜線維の牽引と骨芽細胞の活性化により骨形成という単純な図式ではなく、炎症因子の関与はもちろんのこと、線維芽細胞などの合成系の細胞の機能変化を含めた複雑な経過を辿ることが明らかとなった。

#### 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 7 件)

Yuichi Yashiro, Yoshiaki Nomura, Koji Noda, Nobuhiro Hanada, Yoshiki Nakamura, Function of chemokine (CXC motif) ligand 12 in periodontal ligament fibroblasts, PLOS One, In press, 査読有り

Hisashi Ideno, Akemi Shimada, Taichi Kamiunten, Kazuhiko Imaizumi, Yoshiki Nakamura, et al. Search for conditions to detect epigenetic marks and nuclear proteins in immunostaining of the testis and cartilage, Journal of Histology, In press, 査読有り, DOI: 10.1155/2014/658293

Akemi Shimada, Satoshi Wada, Kouji Inoue, Hisashi Ideno, Taichi Kamiunten, Koichiro Komatsu, Akira Kudo, Yoshiki Nakamura, et al. Efficient expansion of mouse primary tenocytes using a novel collagen gel culture method, Histochem Cell Biol, In press, 査読有り, DOI: 10.1007/S00418-014-1191-4

Umeki D, Ohnuki Y, Mototani Y, Nakamura Y et al. Effect of Chronic Akt/mTOR Inhibition by Rapamycin on Mechanical Overload-Induced Hypertrophy and Myosin Heavy Chain Transition in Masseter Muscle, J Pharmacol Sci 122, 278-288, 2013 査読有り  
Nomura Y, Ishikawa M, Arai C, Noda K, Nakamura Y et al.: Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells, Histochem Cell Biol 137: 719-732, 2012 査読有

Choi J W, Arai C, Ishikawa M, Shimoda S, Nakamura Y: Fiber system degradation, and periostin and connective tissue growth factor level reduction, in the periodontal ligament of teeth in the absence of masticatory load, J Periodontal Res. 46(5): 513-521, 2011 査読有

Baba S, Kuroda N, Arai C, Nakamura Y, Sato T: Immunocompetent cells and cytokine expression in the rat periodontal ligament at the initial stage of orthodontic tooth movement, Arch Oral Biol. 56(5):466-473, 2011. 査読有

[学会発表](計 15 件)

上運天 太一、島田 明美、出野 尚、中村 芳樹、木村 宏、中島 和久、二藤 彰: Histone 3 lysine 9 methyltransferases, G9a, GLP, SUV39h1, and PRDM2, are expressed during mouse tooth development. 第36回日本分子生物学会年会、12月3日、神戸国際会議場、2013

Satoshi Wada, Akemi Shimada, Hisashi Ideno, Yoshiki Nakamura, Kazuhisa Nakashima, Akira Nifuji: Tenocytes regulate cell survival of osteoblasts in vitro. 国際骨代謝学会 (IBMS)・日本骨代謝学会 (JSBMR) 第2回合同国際会議、5月28日、神戸国際会議場、2013.

Y. YASHIRO, C. ARAI, S. WADA, Y. MIYAMOTO, Y. NAKAMURA: Function of CXCL12 in Periodontal ligament fibroblasts. 国際骨代謝学会 (IBMS)・日本骨代謝学会 (JSBMR) 5月28日、第2回合同国際会議 神戸国際会議場、2013.

石川 美佐緒、野田 晃司、八城 祐一、宮本 豊、馬場 俊輔、木暮 杏太郎、和田 悟史、新井 千博、中村 芳樹: 歯の移動時に発現する bFGF の免疫組織化学的研究. 第71回日本矯正歯科学会大会、9月26日、盛岡市アイスアリーナ、2012.

野田 晃司、八城 祐一、宮本 豊、馬場 俊輔、石川 美佐緒、木暮 杏太郎、和田 悟史、新井 千博、中村 芳樹: 歯の移動時に発現する ICAM-1 の免疫組織化学的研究. 第71回日本矯正歯科学会大会、9月26日、盛岡市アイスアリーナ、2012.

花田 信弘、野村 義明、石川 美佐緒、  
八城 祐一、新井 千博、山口 貴央、村  
田 貴俊、野田 晃司、高野 吉郎、中村  
芳樹：レトロウイルスベクターによる歯  
根膜細胞由来の iPS 細胞の樹立とその安全  
性の検討。第 54 回歯科基礎医学会、9 月  
14 日、奥羽大学、ビッグアイ、2012。  
石川 美佐緒、野村 義明、八城 祐一、  
Seetala Sanggarnjanavanjch、山口 貴央、  
新井 千博、野田 晃司、花田 信弘、中  
村 芳樹：ヒト歯根膜線維芽細胞からの  
iPS 細胞の樹立。第 53 回歯科基礎医学会  
学術大会、9 月 30 日、岐阜、2011。  
梅木 大輔、大貫 芳樹、新井 千博、中  
村 芳樹：2 アゴニストによるラット咬  
筋の肥大と速筋化に対する糖質コルチコ  
イドの拮抗作用。第 53 回歯科基礎医学会  
学術大会、9 月 30 日、長良川国際会議場、  
2011。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 芳樹 (NAKAMURA Yoshiki)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：10097321

### (2) 研究分担者

野田 晃司 (NODA Kouji)  
鶴見大学・歯学部・臨床教授  
研究者番号：10148059

新井 千博 (ARAI Chihiro)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号：10460221

花田 信弘 (HANADA Nobuhiro)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：70180916

野村 義明 (NOMURA Yoshiaki)  
鶴見大学・歯学部・准教授  
研究者番号：9035587

和田 悟史 (WADA Satoshi)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号：20581119

### (3) 連携研究者

なし