

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592301

研究課題名（和文） 歯根膜血管組織の遺伝子発現様相から効率的な歯の移動を評価する研究

研究課題名（英文） A study evaluating efficient tooth movement from comprehensive gene expression related in blood vessels of periodontal ligament

研究代表者

野田 晃司（NODA KOJI）

鶴見大学・歯学部・臨床教授

研究者番号：10148059

研究成果の概要（和文）：Waldo 法を用いて歯の移動を行った際の歯根膜に発現する血管関連遺伝子の免疫組織化学および網羅的遺伝子解析の結果から、①血管関連遺伝子の発現比率が歯の移動後6時間に目立って増加した、②変性組織が生じる歯の移動の方が生じない方よりも血管関連遺伝子の発現比率が大きい傾向が認められた。これらの結果から、変性組織が形成される程度の強い矯正力は血管の新生を促し、効率的に歯の移動を生じさせる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the immunohistochemical findings and comprehensive gene expression related in blood vessels of periodontal ligament (PDL) using experimental tooth movement by Waldo's method, gene expression ratio increased notably at 6 hours after tooth movement in both experimental groups with and without degenerating tissue, and the former showed the higher ratio compared to the later. It was suggested that orthodontic force which is induced degenerating tissue promotes vascular formation, leading to an efficient tooth movement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：断続的矯正力、強い圧迫、弱い圧迫、歯根膜、血管関連遺伝子、免疫組織化学、網羅的遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 矯正治療は歯根膜構造が生体の恒常性により維持されるのを利用して歯の移動を行い、不正咬合の治療を行っている。歯科矯正学では、Burstone が提唱した歯周組織への損傷なく効率的に歯を移動することのでき

る「至適矯正力」の実現を目指し、歯の移動法や矯正力の強さ等について臨床および基礎研究の両面から数多く行われているが、未だに正当な解決策を見いだせていないのが実情である。他方、歯根吸収や歯肉退縮等の病理的発現を必然的なリスクファクターと

考え、それらを最小限に止めつつ効率的な歯の移動を目指す「至適矯正力」の考え方もある。これはニッケル-チタン合金線を主体とした超弾性素材を用いた歯の移動法であり、現在の矯正臨床の主流となっている。この両者の違いは圧迫歯根膜に変性組織が出現するか否かの点である。Rygh らは変性組織の出現・形成と歯根吸収との間には密接な関係があることを動物による歯の移動実験で示したが、その実験系は血液循環を阻害する強い矯正力を用いたものであった。ことから、「至適矯正力」を実現させるためには、圧迫歯根膜領域の血液循環を可能な限り維持することができる歯の移動メカニズムを考案することが必要であろうと思われる。

(2) 我々の歯根膜の血管構造と矯正力の関係について調査した過去の研究(基盤研究(B)/研究課題番号:07457513/平成7~8年度;基盤研究(C)/研究課題番号:17592154/平成17~19年度)では次の結果を得た:①持続的な矯正力は歯根膜の圧迫が継続するため歯根膜の回復を遅らせる、②断続的な矯正力は歯根膜の回復(再構築)が持続的なものより早く生じる、③血流を阻害しない断続的矯正力は変性組織を生じさせることなくスムーズな歯の移動を行うことができる、④歯の移動量をコントロールすることにより断続的矯正力を発揮することのできる矯正装置(ラチェットブラケット装置)により痛みの無い歯の移動を行うことができる。特に、これら実験結果の中で特徴的であったのが歯根膜組織再構築の際に認められた血管網のダイナミックな変化であった。これらの結果から、我々は血液循環の維持と合わせて、歯根膜における血管網再構築の様相が歯の移動効率を左右する重要な要素であると考え、歯根膜最大圧迫領域付近の血管新生に関連した遺伝子の経時的発現様相を網羅的遺伝子解析によって調査する必要があると考えた。更に、歯の移動様相と血管新生関連遺伝子発現の局在や分布の関係を調査するために、代表的な血管関連遺伝子を免疫組織化学的に検出し、形態機能的観点から歯根膜組織の経時的変化を知る必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、歯の移動の際に認められる歯根膜再構築の先駆的役割を担う血管の新生・形成に密接な関わりがある遺伝因子発現の特徴を網羅的遺伝子解析により明らかにすることである。

(2) 更に、血管関連の代表的な遺伝子である VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A)、bFGF (basic fibroblast growth factor / FGF-2)、JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase / stress activated protein kinase)、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1/ CD54)について、免疫組織化学的に歯の移動期間中の発現様相を形態局的に観察することにより、効率的な歯の移動を考えることである。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学:Wistar系ラット(雄/10週齢)の上顎左右第一、第二臼歯間にブラケット結紮用エラストックリング (mini stick ligature ties/T. P. Japan)(図1)をWaldo法に準じて挿入し、歯の移動を行った。実験群はエラストック挿入後6時間(6h)、12時間

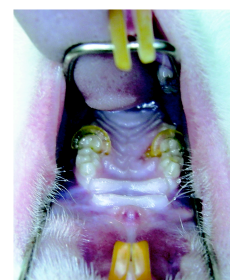


図1 ラット上顎第一・第二臼歯間にエラストックを挿入した図

(12h)、1日間(1d)、3日間(3d)、7日間(7d)、10日間(10d)、14日間(14d)、21日間(21d)の8群、各群に4匹を割り当て、対照群と合わせて合計36匹のratを実験に用いた。歯の移動後、4% paraformaldehydeによる灌流固定を行い、同第一臼歯を含む周囲組織を摘出した。実験群の1d、3d、7d、14d、21dの1匹(2資料)についてはmicro CTを用いて非脱灰で形態観察し、残りは0.25M EDTA(7% sucrose/pH 7.4/4-8°C)で2週間脱灰の後、形態観察と免疫組織化学のためのparaffin包埋を行った。切片は咬合平面と平行になるように厚さおよそ5 μmの横断切片を作製した。検鏡部位はmicro CTおよびtoluidine blue染色切片による観察から、圧迫歯根膜に変性組織が認められなかった第一臼歯の舌側中央(LC)根および変性組織が認められた舌側遠心(LD)根の最大圧迫領域を観察部位とした。採取、切片化した資料は、DAB法を用いて免疫染色を行った後、Carrazziのhematoxylinにて対比染色を行い、免疫反応産物の局在および形態観察を行った。

(2) 免疫組織化学の結果から、歯の移動時の変化が特徴に認められた6h、1d、3d、7d、14dの実験群および対照群(合計11領域/

各群にラット3匹を充当)のLC根およびLD根の最大圧迫領域をCryostatとLaser Micro-dissectionを用いて採取し、網羅的遺伝子解析(Agilent Technologies DNA micro array-whole rat/44k×4/解析依託:北海道システムサイエンス)を行い、血管新生に関係した遺伝子発現を中心に比較、検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) micro CTによる形態観察

エラスティックを上顎第一臼歯と第二臼歯間に挿入したWaldo法による歯の移動では、両歯に傾斜移動が認められた。その際、LD根には強い矯正力の際に出現する歯根と骨が著しく近接した歯根膜の圧迫様相が1dおよび3dの近心歯槽頂付近に認められた。それに対し、舌側中央根LM根では同歯槽頂付近に歯根膜腔の狭窄は認められるものの、遠心根ほどの近接は同じ実験期間に認められなかった。7d以降では、両歯根ともその空隙に差はあるものの著しい狭窄は認められなかった。

##### (2) 光顕による形態観察

Toluidine blue染色による観察では、実験群6h~3dのLD根圧迫側歯根膜は狭窄し、最大圧迫領域に変性組織が認められた。その後、7dおよび10dの穿下性骨吸収領域に歯根膜の拡大傾向が認められ、14dおよび21dでは血管の拡張様相が認められた。他方、LM根では6h~7dにかけて歯根膜の圧迫や血管構造の縮小などが認められたが、変性組織は認められなかった。その後、7d以降の圧迫歯根膜領域では穿下性骨吸収や目立った骨吸収は認められず、14dおよび21dでは圧迫側歯根膜の血管に拡張傾向が認められた他、対照群と比較して形態的有意差は認められなかった。

##### (3) 免疫組織化学

① VEGF-A (図2): DAB-peroxidase 標識によるVEGFの局在について、実験群のLD根では6h~3dに発現した変性組織には陽性反応はほとんど認められず、変性組織が消失した7dおよび14dの圧迫歯根膜領域では陽性単核細胞の増加が認められた。21dは対照群に類似した染色性を示した。他方、変性組織の認められなかったLC根では、6h~3dにかけて陽性単

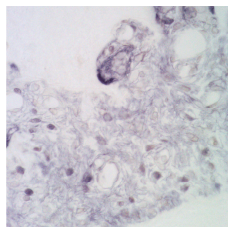


図2 ラット歯根膜組織/免疫組織化学 VEGF-A

核細胞の減少傾向が認められ、7d~10dにかけて同細胞の増加傾向が認められた。21dではLD根同様、対照群に類似した染色性を示した。

VEGFは血管内皮細胞の新生・誘導や毛細血管の透過性亢進などに関与する。特に、線維芽細胞は低酸素状態でVEGFを産生することが知られている。歯の移動の際の圧迫された歯根膜では血流停滞や停止によって低酸素状態となり、同領域にある線維芽細胞からVEGFの生産・分泌が促進されるものと推測される。本実験では、VEGFの免疫染色が実験群および対照群共に歯根膜全体にびまん的に認められ、両者の差をその染色性で評価することは困難であった。過去の報告でも同様の所見が報告されており、このような染色性が歯根膜におけるVEGFの特徴であろうと思われる。この染色性が非特異的である可能性は否定できないが、骨および歯根には同様の染色性が認められなかったことから、歯根膜には微量のVEGFが常時発現しているものと考えられる。

他方、破骨細胞の他、肥満細胞に類似した単核細胞に比較的強い免疫染色性が認められた。この陽性細胞がVEGFの分泌に積極的に関与しているものと思われるが、歯根膜の中でどのような役割を担っているのかは不明である。しかしながら、これら細胞が歯根膜に満遍なく散在していることから、感圧センサー的な役割があるものと推測される。

② bFGF (図3): 実験群のLD根では変性組織は無構造的で低い免疫染色性を示した。1dでは変性組織周囲の圧迫歯根膜全体にびま

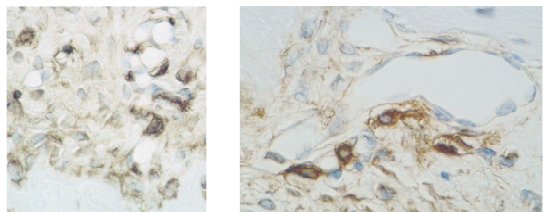


図3 ラット歯根膜組織/免疫組織化学 bFGF

んな染色性の増加が認められたが、その他は全体として対照群と同様の染色性を示した。一方で7d~14dでは強い染色性を示す細胞が血管周囲付近に多数認められ、特に10dおよび14dでは血管と離れた場所にある複数の細胞に同様の強い染色性が認められた。21dは対照群に類似した構造および染色性を示した。他方、LC根では12hと1dの圧迫側歯根膜全体に染色性の増加が認められた。LD根で認められた染色性の強い特徴的な細胞は14dに認められた。21dではLD根同様、対照群に類似した染色性を示した。



bFGF は多種の細胞に分布・発現し、特にマクロファージを中心とした炎症系細胞にヘパラン硫酸と結合（ヘパラン硫酸プリテオグリカン）した状態で細胞内外に存在する。その機能は VEGF ファミリー等血管新生因子の発現・誘導の制御や血管内皮細胞の増殖促進および血管形成の促進であることから、DAB 染色性の増加は歯根膜の回復過程における血管新生を反映しているものと考えられる。LC 根の 12h、1d および LD 根の 1d に認められた bFGF の圧迫歯根膜全体のびまん的染色性の増加については、免疫組織化学的所見として歯の移動後 12～24 時間に bFGF の発現が増加したとも解釈できるが、その染色性と実際の遺伝子発現との間にタイムラグがあることも考慮する必要があり。

一方、血管周囲に発現した強い染色性を示す細胞は形態的な特徴からマクロファージであろうと考えられ、血管の分岐的血管形成（angiogenesis）がその細胞周囲にある血管で生じるものと推察される。今回の実験結果において LC 根よりも LD 根に同様の細胞が多く認められたことは、矯正力によって大きなダメージを受けた歯根膜の方によりダイナミックな angiogenesis が生じるものと推測される。他方、血管と離れ強い染色性を示す細胞について、その発現が回復過程の拡大した歯根膜中に認められたことから、腫瘍形成で認められる angiogenesis とは異なる、創傷治癒過程で認められる非分岐的血管新生 vasculogenesis の可能性が考えられる。また、LD 根が 10d および 14d に同細胞が認められたのに対し、LC 根では、14d のみに認められた。この差について、変性組織が生じる歯の移動の方が生じない方よりもダイナミックな歯根膜の再構築がより早く、長時間に渡って生じることを示唆しているのではある。

③ JNK/SAPK (図4): 実験群の LD 根では、6h および 12h の変性組織およびその付近に陽性細胞が集中して認められた。その他の LD 根および LC 根では、21d を除き、免疫染色性のばらつきが大きく、対照群との有意な差は認められなかった。21d では LD 根、LC 根とも対照群に類似した染色性を示した。

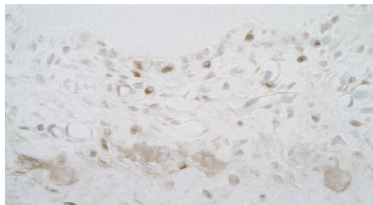


図4 ラット歯根膜組織/免疫組織化学 SAPK/JNK

JNK/SAPK は MAPK ファミリーに属し、多様

な刺激、炎症性サイトカイン、成長因子等により細胞内で活性化され、GCK ファミリーのメンバーにより更に活性化された後、核へ移行し、様々な転写因子の活性を制御する。実験群および対照群に認められた JNK/SAPK 陽性細胞の形態や分布が VEGF 陽性細胞と類似していたことから、歯根膜が機械的刺激を受けた際に同様の発現メカニズムが起動するものと推測される。実験群 LD 根の 6h および 12h の変性組織およびその付近に陽性細胞が集中して認められた点については、変性組織形成初期の様相を反映しているものと推察される。

④ ICAM-1 (図5): 免疫染色所見では、対照群の歯根膜、歯髄、harversian 管内の血管内皮細胞に強い免疫染色性が認められ、血管組織の区別、形態、分布、量等を観察することができた。合わせて、LC 根の 10d および LD 根の 7d および 10d に血管組織とは異なった DAB 染色性を示す細胞が最大圧迫部付近に認められた。

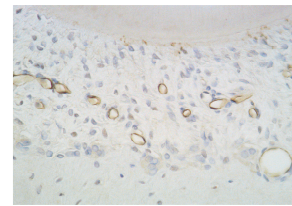


図5 ラット歯根膜組織/免疫組織化学 ICAM-1

インテグリンリガンドである ICAM-1 は膜貫通型の細胞接着分子で免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。血管内皮細胞に常時発現するため、歯根膜血管ネットワークの評価に有用なマーカーである。変性組織の認められた実験群の LD 根と認められなかった LC 根の間の染色性の違いは圧迫様相および歯根膜再構築時期の違いを反映したものであり、特に LD 根の特徴は変性組織の発現・消失とその傾向が一致する。LC 根では歯の移動後 12h から 7d の間に染色性の減少が認められたのに対し、LD 根では 7d の染色性に増加が認められた。この結果は、変性組織が生じない圧迫環境では断続的な矯正力であっても長い時間その影響が残るものと考えられる。ICAM-1 の発現について無酸素/再酸素化により増加するといった報告がある。LC 根の 10d と 14d、LD 根の 7d と 10d に認められた染色性の増加については血管内皮細胞の増加に加えて LD 根の方が前者より血管の再構築が早く生じる可能性を示唆しているのではあると思われる。他方、血管内皮細胞とは異なった強い染色性を示す細胞が LC 根の 10d および LD 根の 7d と 10d の最大圧迫領域に認められた。これは、創傷治癒過程で認められる血管新生の様相 (vasculogenesis) に



類似しており、LD、LC 両根の 10d 以降に認められる血管新生による血管拡張との関連性を裏付けるものと考えられる。

#### (4) 網羅的遺伝子解析

①解析遺伝子数 (44256) の中で対照群に対し実験群が 2 倍以上の遺伝子発現比率数 (図 6) :

実験群の対照群に対する発現比率が 2 倍以上の遺伝子数は 6h/C 根:1829、6h/D 根:2532、1d/C 根:1746、1d/D 根:2154、3d/C 根:1921、3d/D 根:3116、7d/C 根:894、7d/D 根:1378、

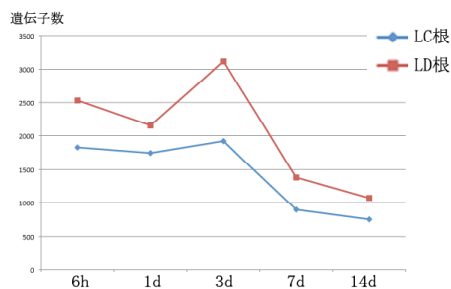


図 6 発現比率が 2 倍以上の遺伝子

14d/C 根:751、14d/D 根:1068 であった。この結果は、全ての実験群において強い力により変性組織が発現した方が変性組織が発現しなかったものよりも多くの遺伝子が高い発現比率を示しており、圧迫歯根膜において前者の方が後者よりダイナミックな再構築が生じていることを示唆している。また、遺伝子発現ピークが両実験群の 3d に認められたことについては、3d に多数の破骨細胞による骨吸収様相が認められたことから、その旺盛な歯根膜再構築を遺伝子発現が反映しているものと推測される。

#### ② VEGF-A (図 7) :

実験群では、LC 根および LD 根の 6h および 1d に遺伝子発現比率の増加が認められ、特に LD 根の 1d において発現比率が LC 根のおよそ 2 倍であった。他方、その特徴に一致し

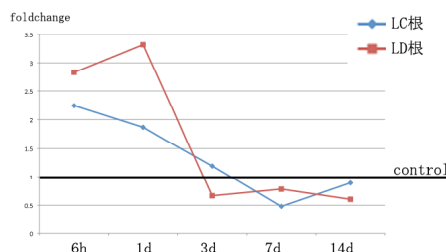


図 7 VEGF-a の遺伝子発現比率 (foldchange)

た免疫染色性の増加は認められなかった。この遺伝子発現の特徴と免疫染色性との違いについては、凍結未固定資料の使用も含め再検討の必要があると思われる。他方、強い断

続的な矯正力を発揮する Waldo 法を用いた今回の実験では、移動後 1 日目の LD 根に穿下性骨吸収や血管の新生・拡張が認められたことから、この遺伝子発現が形態変化に反映されるのに少なくとも 18 時間程度の時間が必要であったものと思われる。

#### ③ bFGF (図 8) :

実験群では、LC 根および LD 根の 6h に遺伝子発現比率のピークが認められ、その比率は LD 根が LC 根を大きく上回った。その後の LD 根、LC 根とも対照群に近い比率に減少し、両

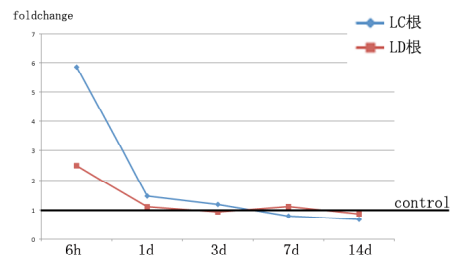


図 8 bFGF の遺伝子発現比率 (foldchange)

者間にほとんど差は認められなかった。免疫染色との比較では、VEGF-A と同様に 6h に一致したの染色性の増加は認められなかった。染色陽性を示したマクロファージ様細胞については、単なるマーカー染色性と考えられ、圧迫歯根膜領域の遺伝子発現比率を左右するようなものではないと考えられる。合わせて、歯の移動後 6 時間に発現のピークが認められた結果は、歯根膜の圧迫により炎症系細胞が惹起されるといった従来の考え方を支持するものである。

#### ④ ICAM-1 (図 9) :

実験群では、LC 根および LD 根の 6h に遺伝子発現比率のピークが認められ、その比率は LD 根が LC 根をわずかに上回った。その後の LD 根、LC 根とも対照群に比較的近い比率に減少

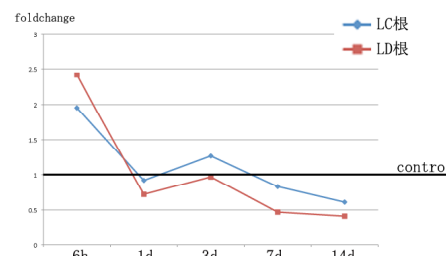


図 9 ICAM-1 の遺伝子発現比率 (foldchange)

し、両者間にほとんど差は認められなかった。他方、6h の免疫染色所見では、歯根膜の圧迫により血管の減少が生じ、結果として染色性が低下した。無酸素状態で ICAM-1 の発現が増加するといった報告があることから、歯根膜の圧迫により無酸素に近い環境が

出現し、実験群では発現比率が増加した可能性が考えられる。合わせて、LC 根と LD 根の遺伝子発現比率の差は圧迫の強さを反映しているものと推察される。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 野田晃司、歯の移動時に発現する ICAM-1 の免疫組織化学的研究、第 7 1 回 日本矯正歯科学会大会、2012 年 09 月 26 日～2012 年 09 月 28 日、岩手県盛岡市アイスアリーナ
- ② 石川美佐緒、歯の移動時に発現する bFGF の免疫組織化学的研究、第 7 1 回 日本矯正歯科学会大会、2012 年 09 月 26 日～2012 年 09 月 28 日、岩手県盛岡市アイスアリーナ

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

##### (2) 研究分担者

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

##### (3) 研究分担者

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