

論 文 要 旨

Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice

〔 歯周炎モデルマウスにおける
矯正的歯の移動速度の減弱 〕

岡 本 敦 子

【序論および目的】

口腔衛生状態不良な歯周炎患者では矯正治療は禁忌である。その理由は、歯周プラークが付着した活動性の歯周炎において、矯正力をかけると歯槽骨の吸収が進むことが実験的にも証明されているからである (*Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993; 103: 313-319)。しかし、歯周炎が矯正治療に及ぼす影響に関してはほとんど報告がない。そこで、歯周炎モデルマウスを作製し矯正処置を行うことによって、歯周炎が歯の移動に及ぼす影響について検討することとした。

【方法および結果】

C57BL/6 マウス (10 週齢/雄) をセボフルレンにて全身麻酔した後、上顎切歯と上顎第一臼歯に 10gf Ni-Ti クローズドコイルスプリングをレジン固定し、切歯を固定源とした第一臼歯の近心側への移動を行った。また、歯周炎の誘導は第一臼歯歯頸部をワイヤーで結紮することにより行った。この二つの処置を組み合わせ 4 群の実験グループを作成した。つまり、何も処置しないコントロールグループ (C グループ)、第一臼歯歯頸部を結紮した歯周炎のみのグループ (L グループ)、矯正処置だけを行った矯正力のみグループ (OF グループ)、矯正処置と第一臼歯歯頸部の結紮を両方行った矯正力+歯周炎のグループ (L+OF グループ) の 4 群を作製した。

まず、上顎第一臼歯の歯頸部を結紮することで歯周炎が生じていることを確認するため、装置を装着して 14 日後の第一臼歯の歯槽骨吸収をみた。C グループと比べて OF グループでは骨吸収量に有意差は認められなかったが、L グループ及び L+OF グループは骨吸収量に有意差を認めた。また、上顎第一臼歯部での前頭断を HE 染色した結果、L グループ及び L+OF グループの歯槽骨上縁で炎症性細胞浸潤及び骨吸収を認めた。このことより、結紮が歯周炎を誘発することを確認した。

次に、これら実験グループの、上顎第一臼歯の移動速度を調べた。その結果、歯の移動距離は L+OF グループが OF グループに比べ有意に小さい値となり、歯周炎により歯の移動が阻害されることが示唆された。

更に、歯周炎による移動距離減少の原因を調べるため、上顎歯槽骨の脱灰標本を作製し、上顎第一臼歯矢状断の HE 染色を行った。OF グループでは、圧迫側の歯槽骨の骨表面に浸食が認められたのに対し L+OF グループでは吸収窩がほとんど認められなかった。そこで、浸食の差の原因を調べるため、

破骨細胞の分布を調べた。第一臼歯周囲歯槽骨の3箇所つまり圧迫側歯槽骨、歯根中隔歯槽骨上縁、牽引側歯槽骨上縁を調べた。OFグループでは圧迫側において破骨細胞が多いが、L+OFグループではあまり破骨細胞が認められなかった。一方、歯根中隔歯槽骨上縁および牽引側歯槽骨上縁ではOFグループに比べL+OFグループでは破骨細胞が多く認められた。破骨細胞の分布にOFグループとL+OFグループとの間に差が生じた原因を調べるため、破骨細胞分化誘導因子であるRANKLの局在を免疫組織学的に検索した。OFグループでは圧迫側においてRANKLの発現が強く認められたが、L+OFグループではあまり認められなかった。また、歯根中隔歯槽骨上縁および牽引側歯槽骨上縁ではOFグループに比べL+OFグループのほうがRANKLの発現が強く認められた。これらのことから、移動距離の減少は、圧迫側でのRANKL発現減少による破骨細胞の減少によると考えられた。

L+OFグループの圧迫側歯槽骨で破骨細胞が少なく、RANKLの発現も弱くなったメカニズムを考えるため、更に以下の実験を行った。そのメカニズムを考えるとき、本研究においては炎症性因子であるプロスタグランジンE₂ (PGE₂)とその合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ2 (COX2)に注目することとした。

まず、実際にPGE₂産生をOFグループとL+OFグループで比較するため、第一臼歯の周囲歯肉を摘出し、COX2 m-RNAの発現量をリアルタイムRT-PCRにて調べた。Cグループ及びOFグループに比べてL+OFグループはCOX2の発現量が多くなっていた。

ところで、メカニカルストレスを細胞に加えると、細胞内シグナル伝達系の一つであるMAPキナーゼカスケードが活性化されることが知られている。そしてMAPキナーゼであるERK1/2がリン酸化され、このことがRANKLの発現を上昇させる (*Cell Signal* 2000; 12: 435-445)。そこで、PGE₂がメカニカルストレスにより活性化される細胞内シグナル伝達にどの様にかかわってくるか調べるため、骨芽細胞をPGE₂で前処理した後メカニカルストレスを加えERK1/2のリン酸化をウエスタンブロットにて調べた。その結果、PGE₂はメカニカルストレスにより誘導されたERKのリン酸化を低下させた。また、PGE₂・メカニカルストレスの有無とRANKL発現量についてリアルタイムRT-PCRにて調べた。メカニカルストレスにより上昇したRANKLの発現はPGE₂の処理により抑制された。このことは、歯周炎を伴った歯の圧迫側において破骨細胞が減少しRANKLの発現が減弱したことを説明する仮説の1つとなる。つまり、PGE₂が歯周炎時にメカニカルストレスによるERKのリン酸化を抑制し、RANKLの発現を減弱させる炎症性メディエーターを合成・発現させるためではないかということが1つのモデルとして考えられた。

【結論及び考察】

歯周炎が存在すると歯の移動距離が減少した。これは圧迫側歯槽骨における破骨細胞の減少、また圧迫側歯槽骨でのRANKLの発現の減弱のためであり、その原因の1つにPGE₂とメカニカルストレスの相互作用が考えられた。

矯正臨床において、歯周炎の存在は骨吸収の進行を招くだけでなく移動速度を低下させる。このことより口腔衛生管理は治療期間の短縮につながると考える。また、このことを患者説明に用いることが出来れば口腔衛生に対するモチベーションの更なる向上につながるのではないかと期待致す。

論文審査の要旨

報告番号	総研 第 64 号	学位申請者	岡本 敦子
審査委員	主査	野口 和行	学位
	副査	於保 孝彦	副査
	副査	三浦 裕仁	副査
			博士 (歯学)
			小松澤 均
			徳田 雅行

Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice

(歯周炎モデルマウスにおける矯正歯の移動速度の減弱)

歯周炎患者の矯正歯科治療において口腔衛生状態が不良の場合、歯周炎が悪化することが知られている。しかし、活動期の歯周炎が矯正歯の移動速度に及ぼす影響についてはほとんど調べられていない。そこで実験的歯周炎を惹起させたマウスに矯正的処置を行い、歯の移動速度を調べた。

実験はマウスを、処置をしないコントロール群、矯正力のみ群、歯周炎のみ群、矯正力+歯周炎群の4群に分けて行った。矯正的処置は上顎切歯と第一臼歯にクローズドコイルスプリングをレジン固定することにより、また、歯周炎の誘導は第一臼歯歯頸部をワイヤーで結紮することにより行った。矯正歯の移動速度は、切歯を固定源とした第一臼歯の近心側への移動距離を測定することにより示した。組織学的に検討するため HE 染色、破骨細胞の発現を調べるため TRAP 染色、RANKL 発現解析のために免疫染色を行った。さらに、炎症性因子である PGE2 がメカニカルストレスにより活性化される細胞内シグナル伝達にどの様に影響するか調べるため、骨芽細胞を PGE2 で前処理した後メカニカルストレスを加え、ERK1/2 のリン酸化(ウエスタンブロット)および RANKL の mRNA 発現量(リアルタイム RT-PCR)を調べた。これらの解析により以下の結果が得られた。

- 1) 矯正力のみ群より矯正力+歯周炎群では歯の移動速度が有意に減少していた。コントロール群及び歯周炎のみ群では歯の移動は認められなかった。
- 2) 矯正力のみ群では、圧迫側歯槽骨に吸収窩が認められ破骨細胞が多数確認された。一方、矯正力+歯周炎群では、圧迫側歯槽骨において破骨細胞が少なく吸収窩はほとんど認められなかった。さらに、圧迫側における RANKL の発現においても矯正力+歯周炎群の方が矯正力のみ群に比べ低下していた。
- 3) PGE2 は、メカニカルストレスにより誘導された ERK1/2 のリン酸化を低下させた。
- 4) メカニカルストレスにより上昇した RANKL の発現は、PGE2 の処理により抑制された。

以上の結果より、歯周炎が存在すると歯の移動速度が減弱することが明らかにされた。これは圧迫側歯槽骨における破骨細胞の減少、また圧迫側歯槽骨での RANKL の発現の減弱によるものであり、そのメカニズムには歯周炎で産生される PGE2 が関与している可能性が示された。

本研究は、歯周炎時の歯の移動速度を調べた初めての研究であり、口腔衛生管理が歯の移動速度に与える影響が確認されるだけでなく、矯正治療における歯の移動の反応機構のさらなる解明の一助となると考えられ、意義がある。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 64 号		学位申請者	岡本 敦子
審査委員	主査	野口 和行	学位	博士 (歯学)
	副査	於保 孝彦	副査	小松澤 均
	副査	三浦 裕仁	副査	徳田 雅行

主査および副査の5名は、平成21年3月10日、学位申請者 岡本 敦子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 本実験で調べたのは歯周炎が移動速度に及ぼす影響についてか？

(回答) はい。歯周病患者の矯正歯科治療において口腔衛生状態が不良の場合、歯周炎が悪化することが知られているが、活動期の歯周炎が矯正的歯の移動に及ぼす影響についてほとんど報告が無いことから歯周炎が歯の移動速度に及ぼす影響に注目し実験を行った。

質問2) 矯正力は歯の移動方向に対して水平にかけられているか？また回転力はかかっているか？

(回答) 歯の移動方向に対して水平に矯正力がかかるようにし、近心へ歯体移動をするようにした。矯正力を負荷した後の組織切片 (矢状断) の所見より、近心への回転 (傾斜) はおこらずほぼ歯体移動していたことから矯正力は移動方向に対してほぼ水平にかかっていたと考えられる。

質問3) 矯正装置を第一臼歯に装着するときレジンで接着しているがこれにより外傷性咬合となっているのではないか？

(回答) 実験側とは反対側の臼歯 (第一、第二、第三臼歯) の咬合面にレジンを築盛し咬合挙上を行い実験側の第一臼歯が対合歯と咬合しないよう調整した。また餌も粉餌に変更しているため、外傷性咬合とはなっていないと考える。

質問4) 歯周炎の誘導のためにワイヤーを結紮するのは一般的か？細菌が集積して歯周炎をおこしているか？

(回答) ワイヤーの結紮で歯周炎を誘発させる報告は過去に無く、シルクリガチャーが一般的である。しかし、マウスの歯冠の高さは1mmもなく、それにシルクを結紮するのは困難であることより、ワイヤーを結紮して歯周炎を誘発した。また、歯周炎は細菌の集積により生じ、進行したものと考える。何故なら、これまでの研究で Toll-like receptor のシグナル伝達タンパクのノックアウトマウスでワイヤー結紮による歯周炎を誘発させた時、ワイルドタイプでの歯周炎に比べ骨吸収の程度が弱く、またそのとき血中にエンドトキシンが検出されるためである。よって歯周炎の誘導は咬合性外傷には因らないと考える。

質問5) 実験動物としてマウスを選んだのは何故か？またマウスの10週齢はヒトでは何歳くらいか？

(回答) マウスは体が小さく同じ環境で多数の個体を同時に実験できるため、よりよい統計解析が可能となること、更に遺伝子の改変が可能であり、将来的にノックアウトマウスを用いて実験が出来ることで様々な遺伝子の機能を調べていくことが可能となると考えられるため、実験動物にマウスを使用した。また、マウスの10週齢は、6~8週齢で生殖が可能となることから推測してヒトの20~25歳に相当するのではないかとと思われる。

質問6) 歯周炎による歯槽骨の吸収の程度はどのくらいか？

(回答) 歯根長の1/4~1/3ほどの骨吸収が認められるため軽度~中等度と考える。

質問7) TRAP染色において破骨細胞数をArbitrary unitで示しているが、unitの1は何か？

(回答) コントロールの組織標本の単位面積あたりで確認された破骨細胞数を1とした。

質問8) PBS(-)の(-)とはなにか？

(回答) PBSとはDulbecco's phosphate-buffered salineのことであり、Caイオン、Mgイオンを含む。PBS(-)

とは Ca イオン、Mg イオンを含まないリン酸緩衝生理食塩水をいい、(-)は Ca イオン、Mg イオンを含まないことを指す。

質問 9) ワイヤの太さや歯冠幅径と比べて移動距離はどのくらいか?

(回答) 第一臼歯歯冠の近遠心径は約 1.2 mm で、ワイヤの太さは直径約 0.2 mm であり、それと比較すると移動距離は約 0.15 mm である。

質問 10) 歯周炎のみの TRAP 染色と抗 RANKL 抗体での染色が無いが何故か?

(回答) 矯正力のみと矯正力+歯周炎の 2 群で歯の移動距離に差が生じた原因を調べることを目的としたため歯周炎のみの TRAP 染色と抗 RANKL 抗体での染色は行っていない。

質問 11) COX2 の mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR にて調べているがこれは第一臼歯のどこの組織を抽出して調べているのか? COX1 についてはみていないがそれは何故か?

(回答) 第一臼歯周囲の歯肉組織を抽出して調べた。COX1 については恒常的に発現している酵素のため調べなかった。

質問 12) 遠心力をメカニカルストレスとしているが、遠心力はメカニカルストレスに相当するのか?

(回答) 300 rpm (日立 himac CF7D2 遠心機) で 1.8 ml の培養液を入れた場合の細胞の受ける圧力は 10 g/cm² であり、矯正力により圧迫側にかかる圧力とほぼ同じであることより同等とみなした。

質問 13) PLC Buffer とはどのような buffer か?

(回答) PLC とは phospholipase C の略で、PLC Buffer は本来は PLC 活性を調べる目的で用いられる buffer であるが、今回は骨芽細胞からタンパク質を抽出するのを目的に使用した。

質問 14) メカニカルストレスにより RANKL の発現が誘導されるということだが ERK が RANKL の発現に関連していることを確かめたか? 一般に矯正力が加わったときの RANKL の発現は ERK で説明されるのか?

(回答) 本実験ではメカニカルストレス負荷後 10 分でリン酸化された ERK のタンパク質の量が亢進し 180 分で RANKL の mRNA の発現が亢進しており、RANKL は ERK の下流であることと合致していた。また、過去にメカニカルストレスが Ras-Raf-ERK の MAP キナーゼカスケードを通じて RANKL の転写活性を亢進させるという報告(BANDOW, et al. *J Cell Physiol* 2007; 211: 392-398/LI, et al. *Cell Signal* 2000; 12: 435-445) がある。このことより ERK が RANKL の発現に関連していると考えた。矯正力が負荷されたときの RANKL 発現のメインストリームの 1 つに ERK を介した誘導が考えられる。

質問 15) 骨芽細胞に PGE2 とメカニカルストレスを加えたときの OPG の発現はどうであったか?

(回答) PGE2、メカニカルストレスをそれぞれ単独で加えた場合 OPG の発現は何も負荷しない場合に比べて低下した。PGE2 とメカニカルストレスを同時に加えた場合も OPG の発現は低下し、PGE2、メカニカルストレスをそれぞれ単独で加えた場合と OPG の発現量はあまり変わらなかった。

質問 16) 一般的に歯周炎では歯が簡単に動きそうだがそれについてはどう考えるか?

(回答) 歯周炎に罹患した歯は速く動くように感じるが、歯周炎時に矯正力をかけて歯の移動速度を調べ統計学的処理をした論文を探したが見当たらなかったため移動速度を検証するために本実験を行った。その結果、歯周炎時において矯正歯の移動速度が減弱することが明らかとなった。

質問 17) 今回炎症性メディエーターとして PGE2 のみを調べているが他の因子については調べたか?

(回答) ERK のリン酸化について、他の炎症性メディエーター (TNF α , IL-1, IL-6) についても、同様の実験を行い検討した。PGE2 では ERK のリン酸化が亢進したが、TNF α , IL-1, IL-6 の発現レベルは control とほぼ同程度であったので、他の因子は関係ないと考えた。

質問 18) メカニカルストレスと PGE2 の両方で骨芽細胞を刺激した場合、MAPK カスケードを PKA が阻害することで RANKL の誘導は抑制されるが、PGE2 単独では RANKL が誘導される。PGE2 による RANKL 誘導はどのようにになっているか?

(回答) メカニカルストレスと PGE2 の両方で刺激した場合 RANKL の発現は抑制される。メカニカルストレスのシグナル伝達には Ras-Raf-ERK の経路だけでなく、様々な経路が見つかっており、その経路で活性化された物質が PGE2 の RANKL 誘導を抑制すると考える。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力、識見を有しているものと認め、博士 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。