

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名（本籍） 糸日谷佳菜子（千葉県）
博士の専攻分野 博 士（歯 学）
学 位 記 番 号 甲 第 467 号
学位授与年月日 平成 29 年 3 月 14 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻 鶴見大学大学院歯学研究科
（博士課程）歯学専攻
学位論文題目 Occlusal Hypofunction Mediates Alveolar Bone Apposition via Relative Augmentation of TGF- β Signaling by Decreased Asporin Production in Rats
（咬合機能低下時の新生歯槽骨形成，添加は，Asporin 発現低下により TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達が増強されることで生じる）
Dental, Oral and Craniofacial Research 第 3 巻 第 1 号 1 頁～8 頁掲載 平成 28 年 12 月 26 日発行
論文審査委員 主査 教授 山 越 康 雄
副査 教授 二 藤 彰 副査 教授 中 村 芳 樹

内 容 の 要 旨

【緒 言】

歯根膜は歯槽骨とセメント質の間に位置し，咬合力等の機械的刺激から歯を支えている．適正な機械的刺激は，正常な歯槽骨の維持に必要不可欠である．対合歯の抜歯等により機械的刺激が除去され，咬合機能が低下した歯の歯根膜線維には廃用性萎縮変化が生じ，歯根膜腔は狭窄する．その過程において歯根膜線維の萎縮だけではなく，歯根膜表層に骨新生，添加が生じていることが過去に報告されている．しかし，その制御機構は不明である．

Transforming growth factor-beta (TGF- β) スーパーファミリーは歯根膜において骨形成に重要な役割をはたしている．Asporin は歯根膜に特異的に発現し，TGF- β に直接結合し TGF- β /Smad シグナリングを競合的に阻害する分子であり，骨形成に抑制的に働くことが報告されている．本研究では，咬合機能低下により Asporin 発現が抑制され，それにより TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達が増強されることで歯槽骨新生，添加が生じると仮説を立て，その検証を *in vivo* で遂行することを目的とした．

【材料および方法】

実験動物

48 匹の Wistar 系雄性ラット（生後 12 週齢）を用いた．動物実験は，鶴見大学歯学部動物実験指針に従い実施した．

実験方法

上顎右側第一臼歯への咬合圧を除去するため，下顎右側第一臼歯の歯冠を除去した．右側上顎骨を実験側，左側を対照側とした．対合歯除去後 1，3，7，14 日目において，ラット上顎骨のパラフィン切片，および非脱灰凍結切片を作製した．

生体染色

ラットにカルセイン（0 日目），キシレノールオレンジ（13 日目）を腹腔内投与し，対合歯除去後 14 日目に屠殺をし，非脱灰凍結切片を作製した．蛍光顕微鏡下（Keyence BZ-9000）で骨添加を観察し，根間中隔より 7-800 μm の深さにおいて，遠心頰側根，遠心口蓋根それぞれの頰側，口蓋側の 4 つの点で，2 種の蛍光染色間距離を計測した．計測には Image J を用いた．

RNA 抽出

非脱灰凍結切片の遠心頰側根，遠心口蓋根より laser capture microdissection (LCM) を用い歯根膜組織（360 μm^2 ）を

取り出し、RNA を抽出した。その後逆転写し cDNA とした。

遺伝子発現解析

Real-time RT-PCR 法にて、Asporin, Smad3, Bone sialoprotein (BSP), Osteocalcin, Osteopontin, Smad1 の遺伝子発現を観察した。ハウスキーピング遺伝子として β -actin を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて発現解析をおこなった。

組織学的検討

対合歯除去後 1, 3, 7, 14 日目のラットを灌流固定後、上顎骨を取り出し 10% 中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定後、10% EDTA にて脱灰し、通法によりパラフィン切片 (5 μ m) を作製し H・E 染色、また免疫組織染色に用いた。

免疫組織染色

対合歯除去後 1, 3, 7, 14 日目のラット上顎第一臼歯遠心根のパラフィン切片を用い Asporin, TGF- β , リン酸化 (p)-Smad2/3, Osteocalcin, Osteopontin のタンパクの発現を観察した。

統計解析

統計学的有意差検定には t-test, ANOVA を用いた。

【結 果】

咬合機能低下は歯槽骨添加を促進する

H・E 染色より、実験側において多量の新生歯槽骨の添加と、それに伴う歯根膜腔の狭小がみられた。さらに生体染色において実験側でも、対照側でも新生歯槽骨の添加がみられたが、実験側における新生歯槽骨の添加は対照側に比べ有意に大きかった。

咬合機能低下は Asporin 発現を抑制する。

対照側と比較し、咬合機能低下時 1, 3, 7 日目の実験側歯根膜における Asporin の遺伝子発現は有意に減少した。免疫組織染色においても、1, 3, 7, 14 日目の実験側歯根膜で Asporin タンパク発現の低下がみられた。

咬合機能低下は TGF- β のシグナル伝達を促進する。

免疫組織染色にて対照側、実験側の両方で多くの歯根膜線維芽細胞に TGF- β の発現がみられた。Smad3 の遺伝子発現は、咬合機能低下 7 日目の実験側歯根膜組織において発現が増加した。さらに p-Smad2/3 タンパクの発現も咬合機能低下 7 日目で、実験側歯根膜の多くの細胞に発現がみられた。Asporin は TGF- β だけではなく、BMP-2 にも直接結合し、シグナル伝達を阻害することが報告されているため、Smad1 の遺伝子発現をみたところ、対照側と実験側で発現に有意差は認められなかった。

咬合機能低下は骨芽細胞への分化を促進する。

骨芽細胞分化マーカーの発現を観察したところ、Osteopontin 遺伝子は咬合機能低下 7 日目の実験側歯根膜において有意に発現が増加した。BSP, Osteocalcin 遺伝子も、咬合機能低下 7 日目の実験側において、発現が増加傾向にあった。また Osteopontin, Osteocalcin のタンパク発現を観察したところ、対照側では歯根膜の歯槽骨表面に存在する骨芽細胞と歯根膜細胞に同程度発現しているのに対し、実験側では歯根膜細胞においてより多くの発現がみられた。

【考 察】

本研究では、咬合機能低下により歯根膜における Asporin 発現が低下し、それにより TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達が増強され、新生歯槽骨の添加が促進されることを発見した。咬合機能低下は歯根膜腔の狭小や、歯槽骨の添加を引き起こすことは過去に報告されているが、そのメカニズムは明確ではない。ラットの臼歯は生理的に遠心移動する。その影響を除外するため本研究では上顎右側第一臼歯遠心根の頰側、口蓋側を観察部位とした。

過去の報告と同じように、咬合機能低下により実験側歯槽骨の添加が有意に増加し、さらに歯根膜腔の幅は対照側と比較し狭小した。この結果は咬合機能低下により歯槽骨の添加が生じ、その結果として歯根膜腔が狭小することを示唆している。

TGF- β の歯根膜での発現は実験期間を通し対照側でも実験側でも変化はなく、これは過去の報告と一致している。

TGF- β は、対照側歯根膜では線維芽細胞と骨芽細胞に発現し、実験側においても線維芽細胞と骨芽細胞に発現しているが、歯槽骨表層の骨芽細胞における発現は減少している。これは、そこに位置する細胞の骨芽細胞への分化はすでに終了し、早期の骨形成の石灰化に関与したと考えられる。

本研究では咬合機能低下により歯根膜における Asporin の発現が低下することを発見した。Asporin は骨芽細胞への分化と石灰化を抑制すること、さらに TGF- β シグナル伝達を阻害することが報告されている。Asporin は BMP-2 のシグナル伝達も阻害することが報告されているが、本研究では咬合機能低下による Smad1 の発現に変化はみられなかった。Asporin

の過剰発現は骨髄幹細胞の骨芽細胞への分化を抑制すること、逆に Asporin ノックアウトマウスでは、胚線維芽細胞の石灰化誘導培地での培養において石灰化小塊の形成が促進されることが報告されている。また歯科矯正学的歯の移動時のラット歯根膜組織圧迫側において Asporin の発現が増加し、骨形成が抑制されたとの報告がある。これらのことから、咬合機能低下は Asporin の発現を抑制し、TGF- β シグナル伝達による歯根膜細胞の骨芽細胞への分化を助長しているといえる。

咬合機能低下時の歯根膜における Smad3 遺伝子の有意な発現増加と、p-Smad2/3 タンパク陽性細胞の発現がみられた。Smad3 は TGF- β の主要なシグナル伝達分子であること、Smad3 と骨芽細胞分化には正の相関があることは過去に報告されており、咬合機能低下が骨芽細胞分化を促進するという本研究の結果と一致している。

この結果を支持するように、咬合機能低下時の歯根膜組織において骨芽細胞分化マーカーである BSP, Osteocalcin, Osteopontin の発現が増加している。咬合機能低下は明らかに歯根膜細胞の骨芽細胞への分化を促進した。

歯根膜には様々な細胞に分化する能力のある間葉系幹細胞が存在していることが報告されており、その細胞が骨芽細胞へ分化したと考えられる。

本研究では、咬合機能低下により歯根膜における Asporin 発現が低下し、それにより TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達が増強され、新生歯槽骨の添加が促進されることを発見した。この Asporin の減少は、矯正学的歯の移動後の薬理的な治療のターゲットになりうる可能性がある。

審査の結果の要旨

対合歯の抜歯等により咬合機能が低下した歯根膜表層には骨新生、添加が生じる。この骨新生にはサイトカインの一つである Transforming growth factor-beta (TGF- β) が関与しているが、通常は歯根膜に特異的に発現する Asporin によって負の制御を受けている。本研究では、咬合機能低下時における Asporin と TGF- β シグナル伝達のバランス変化による骨新生、添加機構を *in vivo* で解明することを目的とした。

上顎右側第一臼歯への咬合圧を除去するため、下顎右側第一臼歯歯冠を除去した対合歯除去モデルラットを作製し、上顎骨右側を実験側、左側を対照側とした。

組織実験では、実験側において多量の新生歯槽骨の添加と、それに伴う歯根膜腔の狭小が見られた。さらに生体染色では、実験側および対照側で新生歯槽骨の添加が見られたが、実験側における新生歯槽骨の添加が対照側に比べて有意に見られた。

Asporin の発現に対して遺伝子実験と免疫組織染色を行ったところ、実験側歯根膜における Asporin 遺伝子の発現およびタンパク質検出強度が対照側に比べて有意に減少していた。一方、咬合機能低下7日目の実験側歯根膜組織では、Smad3 遺伝子の発現上昇および p-Smad2/3 タンパクの検出強度の増加が見られた。また TGF- β は、対照側、実験側の両方で歯根膜線維芽細胞に発現が観察された。

さらに咬合機能低下7日目の実験側歯根膜組織では骨芽細胞分化マーカー遺伝子であるオステオポンチンの有意な発現増加が認められ、また骨シアロタンパク、オステオカルシンも発現増加傾向にあった。

以上より、咬合機能低下時の歯槽骨添加の促進は、Asporin の発現が抑制されることで、TGF- β シグナル伝達が増強され、それによって歯根膜組織中の細胞から骨芽細胞への分化が促進することで生じることが示唆された。

本研究により、咬合機能低下時における歯根膜組織中の Asporin と TGF- β のバランスの崩壊、すなわち Asporin 低下による TGF- β シグナル伝達が増強が新生歯槽骨添加を促進することが見出された。Asporin は、今後矯正学的歯の移動における薬理的な治療のターゲットになりうると思われる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。