

## 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) 成 宮 毅(東京都)  
博士の専攻分野 博 士(歯 学)  
学位記番号 甲 第 469 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 Orthodontic Tensile Strain Induces Angiogenesis via Col-IV Degradation by MMP-12  
(矯正学的伸展負荷は MMP12 による Col-IV の分解を介して血管新生を誘導する)  
Journal of Periodontal Research 第 52 巻 第 5 号 812 頁～ 852 頁掲載 平成 29 年 4 月 10 日発行  
論文審査委員 主査 教授 里 村 一 人  
副査 教授 五 味 一 博 副査 教授 中 村 芳 樹

### 内 容 の 要 旨

#### 【緒 言】

矯正力による歯の移動は、骨および結合組織のリモデリングの結果により生じる。マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は、細胞外マトリックスを分解する酵素であり、現在までに矯正学的歯の移動時の歯根膜組織では MMP1, 2, 8, および 13 の発現が上昇し、歯周組織のリモデリングと関連することが報告されている。今回マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子解析により、牽引側歯根膜組織で MMP12 が強発現しているデータを得た。MMP12 は肺や角膜などで炎症を伴う組織改変に関連すると報告されているが、矯正学的歯の移動時の歯周組織における MMP12 の役割についての報告はない。

MMP12 の基質として血管基底膜の構成因子である IV 型コラーゲン (Col-IV) が知られており、また血管基底膜が分解されることにより血管新生が開始することが報告されている。今回の研究の目的は、牽引側歯根膜組織で歯根膜線維芽細胞が発現する MMP12 が血管基底膜を構成する Col-IV を分解し、血管内皮細胞の出芽を促進することで牽引側歯根膜組織での血管網の再構成に関与しているかを明らかにすることである。

#### 【試料と方法】

9 週齢雄性 Wistar 系ラットの上顎第一臼歯に固定式矯正装置を装着し、10 g の力で上顎両側第一臼歯の舌側移動を行った。また、歯の移動を行っていないラットを対照群とした。歯の移動開始 5 日後、ラットを屠殺し、第一臼歯を含む上顎骨を摘出し、非脱灰凍結切片を作製した。Laser capture microdissection 法を用いて牽引側歯根膜組織を採取し、RNA を抽出後、マイクロアレイ法を用いて発現遺伝子の網羅的解析を行った。また Laser capture microdissection 法により抽出した RNA を逆転写後、リアルタイム PCR を行い MMP12 遺伝子の発現解析も行った。MMP12 の経時的変化を確認するため歯の移動を行っていない実験動物を対照群とし、歯の移動開始 1, 3, 5 および 7 日後のラットを実験群として屠殺し、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。脱灰処置後、パラフィン切片を作製し、免疫組織化学的に牽引側歯根膜組織の MMP12 および Col-IV の局在を観察した。細胞培養実験では、不死化ヒト歯根膜線維芽細胞株に 15% 伸展率で持続的伸展刺激を負荷した。24 時間後に RNA を抽出、逆転写反応後、リアルタイム PCR を用いて MMP12 の遺伝子発現の解析を行った。また Western blotting 法および ELSA 法を行い、培養上清中の MMP12 のタンパクレベルでの検討を行った。

MMP12 が Col-IV を分解するかを検討するためにリコンビナント Col-IV 添加実験を行った。不死化ヒト歯根膜線維芽細胞株に 15% 伸展率で持続的伸展刺激を負荷し、24 時間後に培養上清を回収した。回収した培養上清にリコンビナント Col-IV を添加して、37°C、6 時間インキュベートし、Western blotting を行い Col-IV の分解を検討した。対照群には持続的伸展刺

激を加えていない歯根膜線維芽細胞の培養上清を用いた。また MMP12 の特異的阻害剤 (MMP408) を用いて、MMP12 による Col-IV の分解が阻害するか否か検討した。

牽引側歯根膜組織の血管網の変化の検討には CT 造影法を行った。歯を移動していないラット、歯の移動開始後 1, 3 および 5 日目のラットに造影剤を血行性に灌流し上顎骨を摘出後、4%パラホルムアルデヒドで 48 時間浸漬固定を行った。脱灰終了後、マイクロ CT 撮影を行い、画像処理に Osirix を用い牽引側歯根膜組織の血管網の確認を行った。またパラフィン切片を用いた血管面積の変化も合わせて検討した。

#### 【結 果】

マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR の結果より、対照群と比較して牽引側歯根膜組織で MMP12 遺伝子の高発現が認められた。免疫組織化学的にも、牽引側歯根膜組織で MMP12 の強い発現が認められ、その発現のピークは歯の移動開始 3 および 5 日後であった。Col-IV の発現は血管周囲に認められ、免疫多重染色の結果から Col-IV の発現部位が MMP12 の発現部位と近接していることが観察された。

細胞培養実験では、対照群と比べて伸展刺激負荷 24 時間後の歯根膜線維芽細胞で MMP12 の mRNA およびタンパクレベルの発現上昇が認められた。

リコンビナント Col-IV 添加実験の Western blotting 結果より、対照群と比較して伸展群でバンドが薄くなり、intact Col-IV の分解が確認された。また伸展群に MMP12 特異的阻害剤である MMP408 を添加したものでは、バンドの濃さは対照群と同等であり、MMP12 活性を阻害することで intact Col-IV の分解が抑制されることが明らかになった。

CT 造影法を用いた牽引側歯根膜の血管面積の検討では、歯の移動開始 3 日後牽引側歯根膜組織の血管面積の増加傾向がみられ、5 日目に有意に増加していることが認められた。またパラフィン切片を用いた血管面積測定でも 3 日目から血管面積の増加傾向が認められた。

#### 【考 察】

牽引側歯根膜組織で MMP12 の発現上昇が観察された。また細胞培養実験において、持続的伸展刺激を負荷した歯根膜線維芽細胞で MMP12 の mRNA およびタンパクレベルでの上昇が認められ、持続的伸展負荷により歯根膜線維芽細胞が MMP12 を発現することが明らかとなった。

また牽引側歯根膜組織の血管周囲で MMP12 と Col-IV の局在が近接し、Col-IV 添加実験において歯根膜線維芽細胞が産生した MMP12 により Col-IV の分解が観察され、持続的伸展負荷により歯根膜線維芽細胞が発現する MMP12 が血管基底膜を構成している Col-IV を分解している可能性が示唆された。

CT 造影法およびパラフィン切片を用いた血管面積の測定より、歯の移動開始後 3 日目から牽引側歯根膜の血管面積の増加が認められ、MMP12 が血管形成に関与していることが示唆された。

#### 【結 論】

歯の移動時の牽引側歯根膜組織では歯根膜線維芽細胞における MMP12 の発現が上昇し、これが血管基底膜を構成している Col-IV を分解し、血管内皮細胞の出芽を促進することで血管網の再構築に関与することが示唆された。

#### 審査の結果の要旨

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、細胞外マトリックスを分解する酵素であり、歯周組織のリモデリングと関連することが報告されている。今回の研究の目的は、牽引側歯根膜で発現する MMP-12 が血管基底膜を構成する IV 型コラーゲン (Col-IV) を分解し、牽引側歯根膜組織での血管網の再構成に関与しているかを明らかにすることである。

9 週齢 Wistar 系ラットの上顎第一臼歯に固定式矯正装置を装着し、舌側移動を行った。歯の移動後 5 日目で、laser capture microdissection 法を用いて牽引側歯根膜組織を採取し、マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子解析および MMP-12 の遺伝子解析をリアルタイム PCR で行った。また歯の移動後 1, 3, 5 および 7 日後のパラフィン切片を作製し、免疫組織化学的に牽引側歯根膜組織の MMP-12 および Col-IV の局在を確認した。細胞培養実験では、歯根膜線維芽細胞 (PDLfb) に持続的伸展刺激を負荷し、リアルタイム PCR, Western blotting 法および ELISA 法を行い、MMP-12 の発現を検討した。また回収した培養上清にリコンビナント Col-IV を添加し、Col-IV の分解を検討した。牽引側歯根膜組織の血管網の変化の検討には、造影剤を血行性に灌流したラットの CT 解析にて行った。またパラフィン切片を用い、血管面積の変化を併せて検討した。

牽引側歯根膜組織で MMP-12 遺伝子の高発現が認められた。Col-IV の発現部位が MMP-12 の発現と近接していることが

観察された。細胞培養実験では伸展刺激により PDLfb で MMP-12 の発現上昇が認められた。PDLfb より発現した MMP12 が Col-IV を分解することが明らかになった。牽引側歯根膜の血管面積の検討では、歯の移動後 5 日目で通常の歯根膜と比較して有意に血管面積が増加することが明らかになった。

動物実験および細胞培養実験の結果、持続的伸展負荷により PDLfb が MMP-12 を発現することが明らかになった。牽引側歯根膜組織の血管周囲で MMP-12 と Col-IV の局在が近接し、Col-IV 添加実験において PDLfb が産生した MMP-12 により Col-IV の分解が観察され、PDLfb が発現する MMP-12 が血管基底膜を構成している Col-IV を分解しているものと思われた。CT 造影法およびパラフィン切片を用いた血管面積の測定より、歯の移動後 3 日目から牽引側歯根膜の血管面積の増加が認められ、MMP12 が血管形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。

以上より、牽引側歯根膜では PDLfb における MMP-12 の発現が上昇し、これが血管基底膜を構成している Col-IV を分解し、血管網の再構築に関与することが示唆された。

本研究は、歯の矯正治療における牽引側歯根膜組織の再構築過程において、MMP-12 の重要性を明らかとしたものであり、臨床歯科医学の発展に大きく貢献するものと考えられる。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。