

*In vivo* micro-CT による正中口蓋縫合急速拡大後の  
長期定量評価について

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

竹之内 裕行

(指導：清水 典佳 教授，馬谷原 琴枝 助教)

## 目 次

---

概 要	..... 2
緒 言	..... 6
材料および方法	..... 8
成 績	.....16
考 察	.....24
結 論	.....29
謝 辞	.....30
文 献	.....31
基幹論文	.....36

Takenouchi *et al.* Archives of Oral Biology, 2014 (in press)

## 概 要

上顎の急速拡大は狭窄した上顎骨を短期間で側方に拡大する目的で用いられ、拡大後の離開した正中口蓋縫合は骨の増生で修復されることが知られている。臨床的には、急速拡大後の後戻りを防ぐために、固定式装置を用いて少なくとも 3 ヶ月間保定することが推奨されている。そのため、急速拡大によって引き起こされる正中口蓋縫合における形態学的変化とその後の骨形成、ならびに生物学的反応について理解することは重要である。

急速拡大後の正中口蓋縫合の経日的変化については十分に解明されておらず、従来型の micro-CT を用いた研究では唯一、急速拡大後 14 および 28 日の縫合部の修復過程が検討されている。しかし、従来型の micro-CT では、X 線照射時間が長く照射線量が大きいため、同一の動物を麻酔下で多数回にわたって経日的に観察することは不可能であった。

近年、*in vivo* micro-CT が開発され、実験動物を麻酔下で多数回にわたって撮影することが可能となり、同一個体の長期観察ができるようになった。急速拡大後の縫合部では、膜内骨化の機序による骨形成が生じ、その過程で強力な骨形成関連因子として知られている bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)、insulin-like growth factor I (IGF-I) および transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) の発現が増加すること、また、これらの発現はメカニカルストレスによって誘

導されることが報告されている。しかし、その詳細については不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、ラットの正中口蓋縫合を実験的に急速拡大し、*in vivo* micro-CT 画像を用いて縫合部の形態学的変化を、real time RT-PCR および免疫組織化学にて縫合部の骨形成関連因子の発現について経日的に検討した。

正中口蓋縫合の拡大はラットの上顎切歯間に 1.5 mm の金属リングを挿入することで行った。正中口蓋縫合の形態学的変化は拡大前 0 日、拡大後 1, 3, 6, 9, 12, 18 および 24 日に *in vivo* micro-CT で撮影し、縫合部骨体積、縫合部幅径および上顎切歯間距離を調べた。また、正中口蓋縫合部での BMP-2, IGF-I および TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現は 0, 1, 3, 5 および 7 日に real time RT-PCR によって、タンパク発現は 0, 5 および 7 日に免疫組織化学によって検討した。

*In vivo* micro-CT で測定した正中口蓋縫合部骨の体積は、経日的に減少し、拡大後 12 日では最小 ( $-0.34 \text{ mm}^3$ ) となったが、その後骨形成に伴ってしだいに増加し、拡大後 24 日には  $-0.13 \text{ mm}^3$  となり拡大前の 63% まで修復された。上顎切歯唇舌径中間点における縫合部幅径は、拡大前は 0.18 mm であったが、経日的に増加し、拡大後 12 日で最大 (0.38 mm) となった。一方、上顎切歯間距離は、拡大前は 1.3 mm であったが、拡大後 1 日で 1.80 mm に増加し、その後はわずかに増加した。

BMP-2 と IGF-I の遺伝子発現は拡大前と比較して拡大後 3 日に、TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現は拡大後 5 日に有意に増加し、その後これらの遺伝子発現量は経日的に減少し、拡大後 7 日では拡大前とほぼ同じレベルあるいはそれ以下のレベルとなった。

免疫組織化学的には、BMP-2 と IGF-I および TGF- $\beta$ 1 の正中口蓋縫合部の発現は拡大前ではほとんど観察されず、骨芽細胞層におけるわずかな発現のみであった。BMP-2、IGF-I および TGF- $\beta$ 1 の発現は拡大後 5 日と 7 日の骨芽細胞層で観察され、これらの発現は 5 日より 7 日で強かった。7 日では縫合部の骨芽細胞層だけではなく、血管内皮細胞と線維芽細胞においても発現が観察された。

以上の結果から、単回の急速拡大によって正中口蓋縫合の拡大は 12 日間持続し、その修復には 30 日以上必要であることが明らかになった。この修復期間はヒトに置き換えるならば 2 年から 3 年となる。このことは、臨床的に上顎急速拡大後の動的矯正治療および保定期間が 3 年から 4 年必要であることと整合性があると考えられた。さらに、拡大後の正中口蓋縫合部において、BMP-2、IGF-I および TGF- $\beta$ 1 が強く発現していたことから、これらは拡大後の骨形成において重要な役割を担うことが示唆された。従って、本研究結果と臨床における正中口蓋縫合急速拡大後の長期保定とは整合性があると考えられた。

なお、本論文は、2014 年に掲載予定の原著論文 (Takenouchi *et al.* Archives of

Oral Biology) を基幹論文とし, これに TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現と免疫組織化学のデータを加え, 総括したものである。

## 緒 言

上顎の急速拡大は狭窄した上顎骨を短期間で側方に拡大する目的で用いられ、拡大後の離開した正中口蓋縫合部は骨の増生で修復されることが知られている<sup>1)</sup>。臨床的には、急速拡大後の後戻りを防ぐために、固定式装置を用いて少なくとも3ヵ月間保定することが推奨されている<sup>2,3)</sup>。そのため、急速拡大によって引き起こされる正中口蓋縫合における形態学的変化とその後の骨形成、ならびに生物学的反応について理解することは重要である。

急速拡大後の正中口蓋縫合の経日的変化については十分に解明されておらず、従来型の micro-CT を用いた研究では唯一、急速拡大後 14 および 28 日の縫合部の修復過程が検討されている<sup>4)</sup>。しかし、従来型の micro-CT では、X 線照射時間が長く (10 分から 1 時間) 照射線量が大きいため<sup>5,6)</sup>、同一の動物を麻酔下で多数回にわたって経日的に観察することは不可能であった。

近年、*in vivo* micro-CT が開発され、実験動物を麻酔下で多数回にわたって撮影することが可能となり、同一個体の長期観察ができるようになった<sup>7,8)</sup>。さらに、専用ソフトウェアを使用することで、同一個体の観察部位における骨量の減少や増加を定量的に評価することも可能となった<sup>9,10)</sup>。*in vivo* micro-CT を用いて同一個体における急速拡大による縫合部の拡大とその後の骨形成過程を定量的に評価することは、矯正治療の進行やその後の保定期間を考慮する一助と

なるであろう。

急速拡大後の縫合部では、膜内骨化の機序による骨形成が生じ、その過程で bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), insulin-like growth factor I (IGF-I) および transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1) の発現が増加する<sup>11,12)</sup>。また、BMP-2<sup>13,14)</sup>, IGF-I<sup>15,16)</sup> および TGF- $\beta$ 1<sup>17)</sup> は強力な骨形成関連因子としてメカニカルストレスによって誘導されることが報告されている<sup>18-21)</sup>。しかし、その詳細については不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、ヒト思春期に相当する 8 週齢のラット<sup>22)</sup> の正中口蓋縫合部を実験的に拡大し、*in vivo* micro-CT 画像を用いて急速拡大後の縫合部の形態学的変化について、また、RT-PCR と免疫組織化学にて縫合部の骨形成関連因子の発現について経日的に検討した。



## 材料および方法

### 1. 実験動物

本研究ではSD系雄性ラット (8週齢, 230~250 g; 三協ラボサービス, 東京) 59匹を使用した。具体的には, *in vivo* micro-CT 撮影のための実験群とインタクト群に各4匹, 遺伝子発現検討のために45匹, 免疫組織化学のために6匹を使用した。ラットは動物実験室 (22°C, 湿度 55%, 室内灯は午前7時点灯, 午後7時消灯の12時間サイクル) にて飼育し, 飼料と水は自由に摂取させた。なお, 本研究は日本大学歯学部動物実験委員会によって承認されている (承認番号: 第AP10D035号)。

### 2. 上顎正中口蓋縫合の拡大

ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与後 (30 mg/kg, ソムノペンチル; Schering-Plough, Munich, Germany), Saito と Shimizu<sup>23)</sup> の方法に従い, 1.5 mm 厚のメタルリング (外径 3.0 mm, 内径 2.0 mm のステンレススチール製パイプを切断して作製) を上顎の切歯間に挿入することで, 正中口蓋縫合の急速拡大を行った。両側切歯歯肉乳頭部にラウンドバーで側方から穴をあけ, 0.01 inch のステンレススチール製ワイヤー (TOMY, 東京) を用いてメタルリングを固定した (Fig. 1)。

### 3. 体重測定

健康状態を評価するために、拡大群 (n=4) とインタクト群 (n=4) の体重を測定した。

### 4. *In vivo* micro-CT 撮影と画像評価

*In vivo* micro-CT 撮影は拡大前 0 日、拡大後 1, 3, 6, 9, 12, 18 および 24 日に各 1 回行った。ラットをペントバルビタールナトリウムにて腹腔内麻酔後 (30 mg/kg), 固定台に伏臥位に固定し, Bouxsein ら<sup>24)</sup> のガイドラインに従い, 撮影倍率 6.7 倍, voxel サイズ:  $30 \times 30 \times 30 \mu\text{m}^3$ , 90 kV, 100 mA, 17 秒 X 線走査; プロジェクション: 512 *n* の条件で CT 撮影 (型番: R\_mCT, リガク, 東京) を行った。撮影範囲は上顎骨全体を含む  $480 \times 480 \times 480$  voxel とした。撮像データは I-View ソフトウェア (リガク) を用い三次元的に観察した。骨体積はデータ解析ソフトウェア (3 by 4 viewer ソフトウェア; 北千住ラジスト歯科, 東京) を用いて測定し, 測定領域 (ROI) は正中口蓋縫合を含む上顎切歯舌側歯槽骨縁から  $2.40 \times 0.90 \times 0.60$  mm の範囲とした (Fig. 2)。

測定領域における新生骨量を評価するために, 標準となるファントム 300, 400, 500, 600, 700 および  $800 \text{ mg/cm}^3$  (ラトックシステムエンジニアリング, 東京) を

ラット正中口蓋縫合撮影時と同条件で撮影した結果、新生骨の X 線吸収閾値を  $400 \text{ mg/cm}^3$  に設定した。そして、縫合部 ROI における CT データを二値化した。各計測時点における骨を示す voxel は急速拡大開始前と比較して、増加した部位を緑色、減少した部位を赤色で示し、骨体積の変化量はこの増減の和として算出した。

二次元計測では、縫合部骨水平面上の以下に示す 4 か所の計測点上の拡大幅径 (縫合部骨縁間距離) を計測した。

- ・ S1, 上顎切歯唇舌径の中間点
- ・ S2, 上顎切歯舌側歯槽骨縁
- ・ S3, S2 と S4 の中間点
- ・ S4, 前口蓋孔の前縁

各計測点上で左右の縫合部骨縁のポイントをプロットし、I-View ソフトウェアにて 2 点間距離を自動計測した。さらに、正中口蓋縫合の拡大幅径と上顎切歯の移動量を比較するために、同様の方法で S1 での上顎切歯間距離 (DI) を測定した (Fig. 3)。

## 5. RNA 抽出および real time RT-PCR 解析

拡大前 0 日、拡大後 1, 3, 5 および 7 日に、拡大群およびインタクト群各 9 匹

のラットの遺伝子発現解析を行った。ラットをペントバルビタールナトリウムの腹腔内過剰投与にて屠殺後、メスで口蓋粘膜を剥離して縫合部骨を露出させ、縫合部骨と縫合部軟組織（上顎切歯舌側歯槽骨縁から深さ 0.5 mm; 幅 0.7 mm; 長さ 2.5 mm）を TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を滴下しながらカーバイトバー (#1700, φ 0.7 mm; Emesco, Singen, Germany) で切削し回収した (Fig. 4)。

9匹のラットから 3 sample を得た後、各 sample から通法にて全 RNA を抽出した。全 RNA から cDNA への逆転写は、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて行った。real-time RT-PCR は、SYBR Green I を用いたインターカレーター法で目的遺伝子の増幅を行った。反応条件は、熱変性を 95°C 5 秒、アニーリングおよび伸長反応を 60°C 20 秒に設定し、サーマルサイクラー (Smart Cycler II System; Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) を用いて、このサイクルを 40 回繰り返した。結果の解析は、Smart Cycler ソフトウェア (ver. 2.0) を用いて行った。増幅物の特異性は 60°C から 95°C 間のメルトカーブ解析によって確認した。すべての解析はトリプリケイトで行い、各目的遺伝子の mRNA 発現量は各時点のグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 発現量で標準化して求めた。Table 1 に使用したプライマーの配列を示す。なお、各プライマーは Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA) を用いて National Center for Biotechnology Information のウェブサイトから得たシ

ークエンスデータをもとに設計し、BLASTにて配列を照合した。

## 6. 免疫組織化学

拡大前 0 日、拡大後 5 および 7 日に拡大群およびインタクト群の各 2 匹のラットを免疫組織化学に供した。ラットをペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与 (30 mg/kg) により麻酔後、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。縫合部骨を含む上顎を摘出し、4.5% EDTA を含む 4%パラホルムアルデヒドにて 4°C で 4 週間脱灰した。その後、sample をエタノールにて脱水、キシレンで透徹後、パラフィン包埋した。S2 から S3 の範囲において、4  $\mu$ m の前頭断面連続切片を作成し、切片を脱パラフィン処理、水洗後ヘマトキシリン - エオジン (H-E) 染色した。また、切片を 1% 牛血清アルブミンでブロッキングを行った後、BMP-2, IGF-I および TGF- $\beta$ 1 の 1 次抗体 (ウサギ抗ラット抗体; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を 300 倍希釈して 4°C の加湿された容器内で反応させた。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体 (マウス抗ウサギ抗体; Simple Stain Rat MAX-PO; ニチレイ, 東京) を用い、室温で 30 分間反応させた後、3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride 液で発色させた。PBS で洗浄後、切片はヘマトキシリンにより対比染色し、脱水、透徹後、マリノール (武藤化学, 東京) により封入した。ネガティブコントロールとして、1 次抗体との反応を省

略した標本を作成した。

## 7. 統計処理

拡大群およびインタクト群のデータはブラインド下で集計した。統計処理は SPSS ソフトウェア (ver. 16 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用し、体重測定の統計処理は unpaired Student's *t*-test を用いた。CT 画像評価の統計処理は一元配置分散分析後、ボンフェローニ補正 paired Student's *t*-test を用いた。遺伝子発現の統計処理は一元配置分散分析後、ボンフェローニ補正 unpaired Student's *t*-test を用いた。また、棄却率は 0.05 未満とした。



Figure 1. Midpalatal suture expansion in rat by inserting a 1.5-mm-thick circular metal ring between the maxillary incisors.

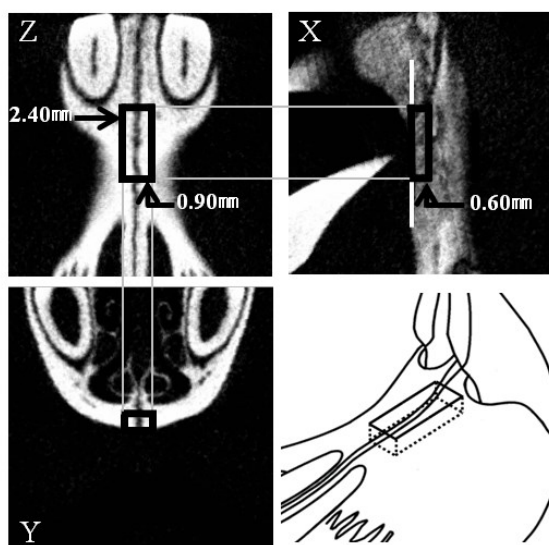


Figure 2. Diagram of the region of interest (ROI;  $2.40 \times 0.90 \times 0.60$  mm).

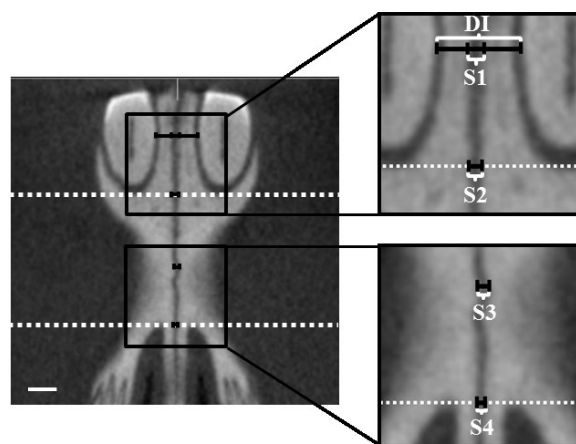


Figure 3. Diagram of two-dimensional measurements of expanded suture width (distance between the palatal bones) S1: the center of labiolingual thickness of the incisors, S2: the lingual alveolar bone margin of the maxillary incisors, S3: the midpoint of S2 and S4, S4: the anterior margins of the palatine foramina and DI: the distance between maxillary incisors at S1. Scale bar: 1 mm.

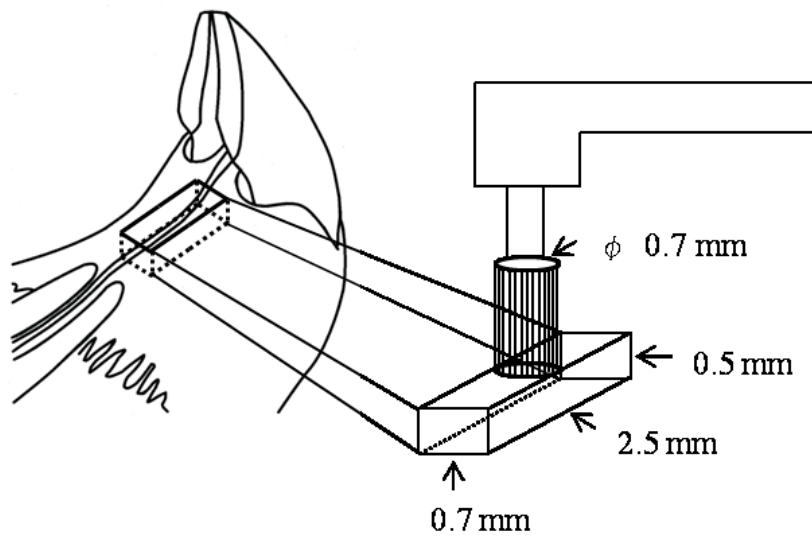


Figure 4. Diagram of the marginal region of the palatal bone and soft tissue of the suture for RNA extraction (depth, 0.5 mm; width, 0.7 mm; length, 2.5 mm from the distal alveolar bone margin of the maxillary incisors).

Table 1 Polymerase chain reaction (PCR) primer used in the experiments

Target	Forward primer	Reverse primer	Genbank acc no.
GAPDH	5'-AACCCATCACCATCTTCCAGG-3'	5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'	NM_017008.3
BMP-2	5'-TGAACACAGCTGGTCTCAGG-3'	5'-GCTGTTTGTGTTTGGCTTGA-3'	NM_017178
IGF-I	5'-GTGATCTGAGGAGGCTGGAG-3'	5'-TCTGAGTCTTGGGCATGTCA-3'	NM_178866
TGF-β1	5'-CAACAATTCCTGGCGTTACC-3'	5'-TGGGACTGATCCCATTTGATT-3'	NC_005100.3



## 成 績

### 1. 実験期間中の体重変化

拡大後 1, 3 および 6 日の拡大群ラットの体重は、インタクト群のラットと比較して有意に減少し、拡大後 1 日にはインタクト群より 5.6%減少した。しかし、拡大後 9 日にはインタクト群とほぼ同じレベルまで回復し、24 日までほぼ同じ体重を維持していた (Fig. 5)。

### 2. *In vivo* micro-CT による縫合部の形態学的変化の観察

急速拡大後の正中口蓋縫合の形態学的変化は、*in vivo* micro-CT を用いて CT 画像の差分から観察した。正中口蓋縫合の ROI における骨は、拡大前 0 日と比較して増加した領域は緑色で、減少した領域は赤色で表示した。その測定領域の代表的な図を Fig. 6A に示す。拡大後は赤色領域がしだいに増加し、拡大後 12 日では赤色領域が全ての骨表面を覆う状態となった。しかし、拡大後 18 日から 24 日にかけては緑色領域が増加した。ROI における緑色領域と赤色領域の差分で表される縫合部の骨体積は経日的に減少し、拡大後 12 日では $-0.34 \text{ mm}^3$  ( $-12600 \text{ voxel}$ ) と最小になったが、その後はしだいに増加し、拡大後 24 日では $-0.13 \text{ mm}^3$  ( $-4700 \text{ voxel}$ ) に増加した (Fig. 6B)。拡大前 0 日と比較した骨体積の有意差は、拡大後 3, 6, 9, 12 および 18 日にみられた ( $p < 0.05, p < 0.01$ ; Fig. 6B)。

縫合部骨水平面上における正中口蓋縫合幅径の二次元計測では、全ての計測点 (S1～S4) のうち S1 が常に最大の拡大量を示し、S1 の幅径は経日的に増加して拡大後 12 日では 0.35 mm に拡大した ( $p < 0.01$ ; Fig. 7A)。拡大後 1 日の上顎切歯間距離は、拡大前 0 日 (1.30 mm) と比較して有意に増加し 1.80 mm となり ( $p < 0.01$ ; Fig. 7B)、その後はわずかではあるがしだいに増加した。

### 3. BMP-2, IGF-I および TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現

BMP-2 の遺伝子発現は拡大前 0 日と比較して拡大後 3 日で約 5 倍有意に増加したが、その後はしだいに減少し、拡大後 7 日では拡大前とほぼ同じレベルになった ( $p < 0.01$ ; Fig. 8A)。

IGF-I の遺伝子発現は拡大前 0 日と比較して拡大後 3 日で約 28 倍有意に増加したが、その後はしだいに減少し、拡大後 7 日では拡大前と同じレベルになった ( $p < 0.05$ ; Fig. 8B)。この変化のパターンは BMP-2 に類似していた。

TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現は拡大前 0 日と比較して拡大後 5 日で約 3 倍有意に増加したが、拡大後 7 日では拡大前よりも減少した ( $p < 0.05$ ; Fig. 8C)。

### 4. 免疫組織化学

H-E 染色標本において、拡大後 5 および 7 日の正中口蓋縫合の幅径は、拡大前

0日と比較してそれぞれ1.5および2.0倍に増加した。拡大後5および7日では、骨表面に接する厚い類骨層(赤矢印)と、類骨表面の骨芽細胞層が観察された。対照的に、拡大前0日では類骨層はほとんど観察できず、単層の骨芽細胞層のみが観察された(Fig. 9A-C)。免疫組織化学的には、BMP-2、IGF-IおよびTGF- $\beta$ 1の発現は、拡大前0日では正中口蓋縫合にはほとんど観察されず、骨芽細胞層にわずかに観察された(Fig. 9D, G, J)。BMP-2の発現は拡大後5および7日の骨芽細胞層(赤矢頭)で観察され、その発現は5日より7日で強く(Fig. 9E, F)、7日では縫合部の骨芽細胞層だけでなく、血管内皮細胞(黒矢印)と線維芽細胞(黒矢頭)にも観察された(Fig. 9F)。また、IGF-IおよびTGF- $\beta$ 1の発現はBMP-2の発現に類似していたが、TGF- $\beta$ 1の発現は他の2因子と比較して軽度であった(Fig. 9E, F, H, I, K, L)。なお、ネガティブコントロールでは、正中口蓋縫合部に特異的な免疫反応は検出されなかった(Fig. 9M)。

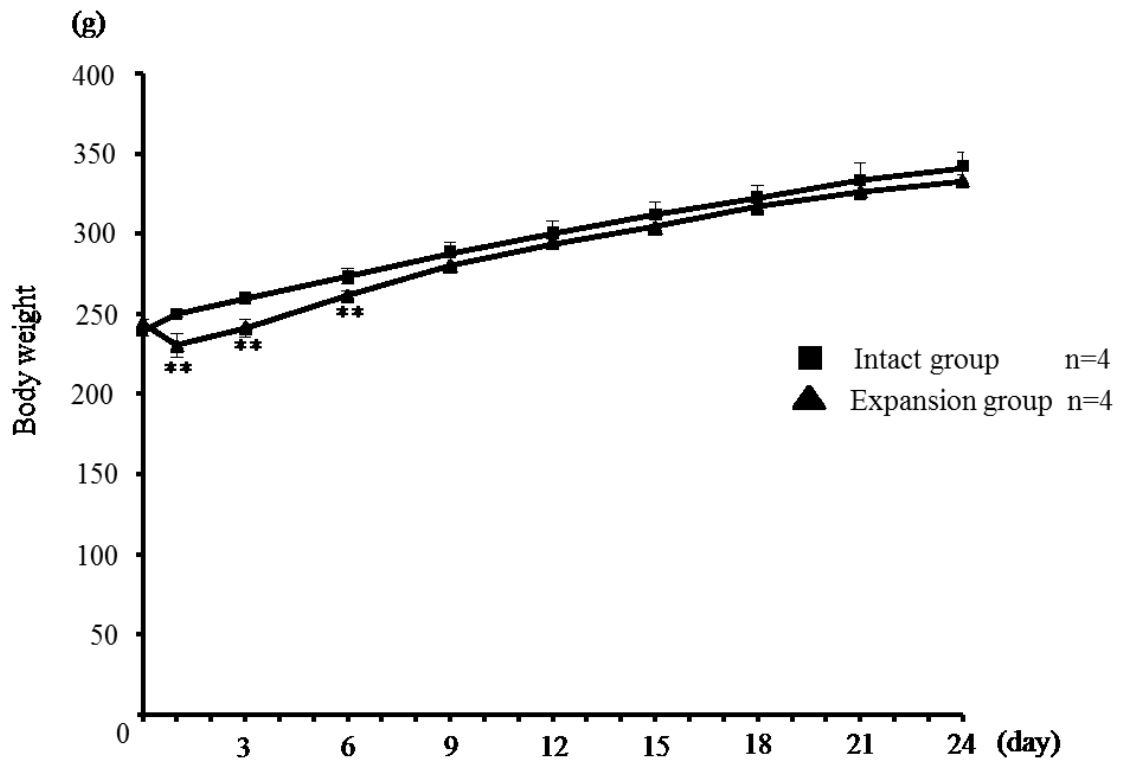


Figure 5. Changes in body weight during the experimental period. The body weights of rats in the expansion group were significantly decreased on days 1, 3, and 6 ( $p < 0.01$ ). Then, the weights of rats in the expansion groups had recovered to the same level as the intact group by day 9. \*\*  $p < 0.01$ , significant decrease versus intact group.

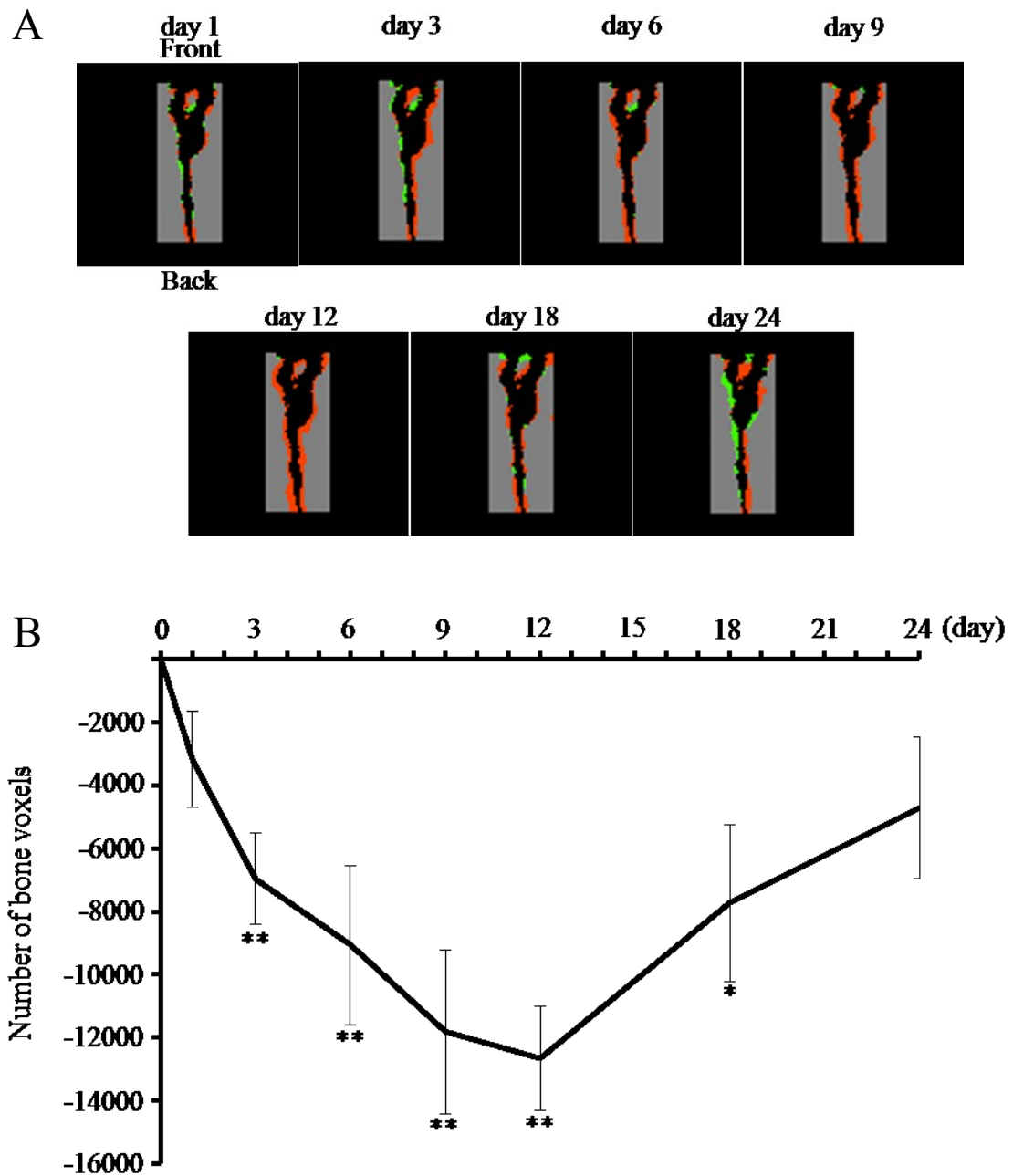


Figure 6. Morphological change in mid-palatal suture after rapid mid-palatal expansion (RME) using CT image. (A) Measurement area from a representative animal. The increase (green) and the decrease (red) compared day 0 are shown. The red area had increased to cover all domains of the bone surface on day 12. Then the green area increased to day 24. (B) Bone volume change in the measurement area, calculated by using 3 × 4 viewer software. The bone volume reached the lowest value,  $-0.34 \text{ mm}^3$  ( $-12,600$  voxels), on day 12. Then, the bone volume increased with bone formation between the palatal bones symmetrically over time until it reached  $-0.13 \text{ mm}^3$  ( $-4700$  voxels) on day 24. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significant decrease versus day 0.

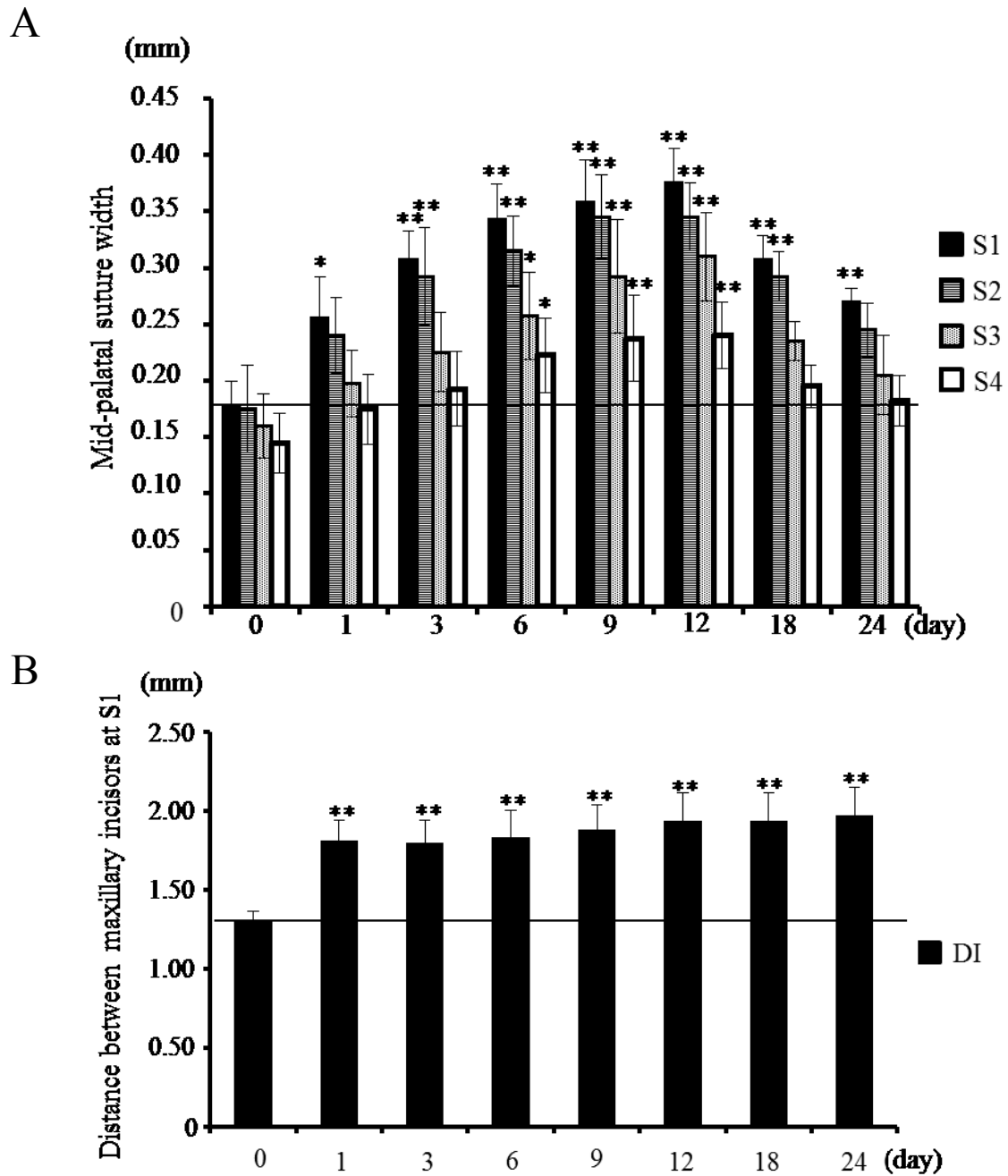


Figure 7. Expanding width change at each suture section.

(A) Expanding width change at four points. S1 showed the most expansion of all measurement points (S1–S4) on all days (days 1–24); the width of S1 increased to 0.35 mm on day 12 in a time-dependent manner. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significant increase versus day 0. (B) The distance between maxillary incisors at S1 (DI). DI significantly increased to 1.80 mm on day 1. \*\*  $p < 0.01$ , significant increase versus day 0.

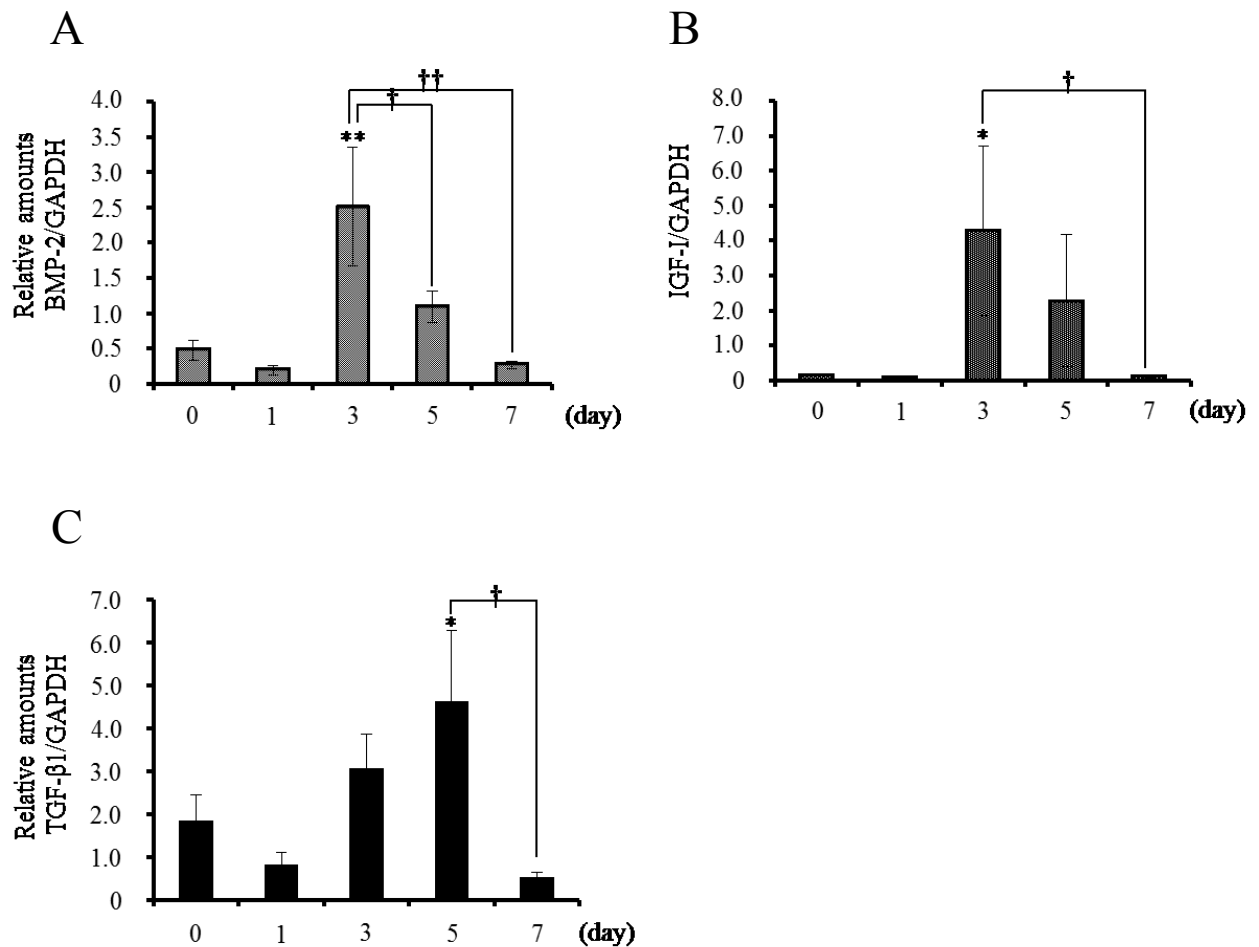


Figure 8. Gene expressions in mid-palatal suture. (A) Gene expression of BMP-2 in mid-palatal suture. A significant increase in BMP-2 mRNA expression after RME was found on day 3; it was five-fold higher than that on day 0. Then, BMP-2 mRNA expression decreased time-dependently, reaching the same level as day 0 on day 7 ( $p < 0.01$ ).  $**p < 0.01$ , significant increase versus day 0.  $†p < 0.05$ ,  $††p < 0.01$ , significant decrease versus day 3. (B) Gene expression of IGF-I in mid-palatal suture. A significant increase in IGF-I mRNA expression after RME was found on day 3; it was 28-fold higher than on day 0. IGF-I mRNA expression then decreased time-dependently, reaching the same level as day 0 on day 7 ( $p < 0.05$ ).  $*p < 0.05$ , significant increase versus day 0.  $†p < 0.05$ , significant decrease versus day 3. (C) Gene expression of TGF-β1 in mid-palatal suture. A significant increase in TGF-β1 mRNA expression after RME was found on day 5; it was 3-fold higher than on day 0. TGF-β1 mRNA expression then decreased time-dependently, reaching the same level as day 0 on day 7 ( $p < 0.05$ ).  $*p < 0.05$ , significant increase versus day 0.  $†p < 0.05$ , significant decrease versus day 5.

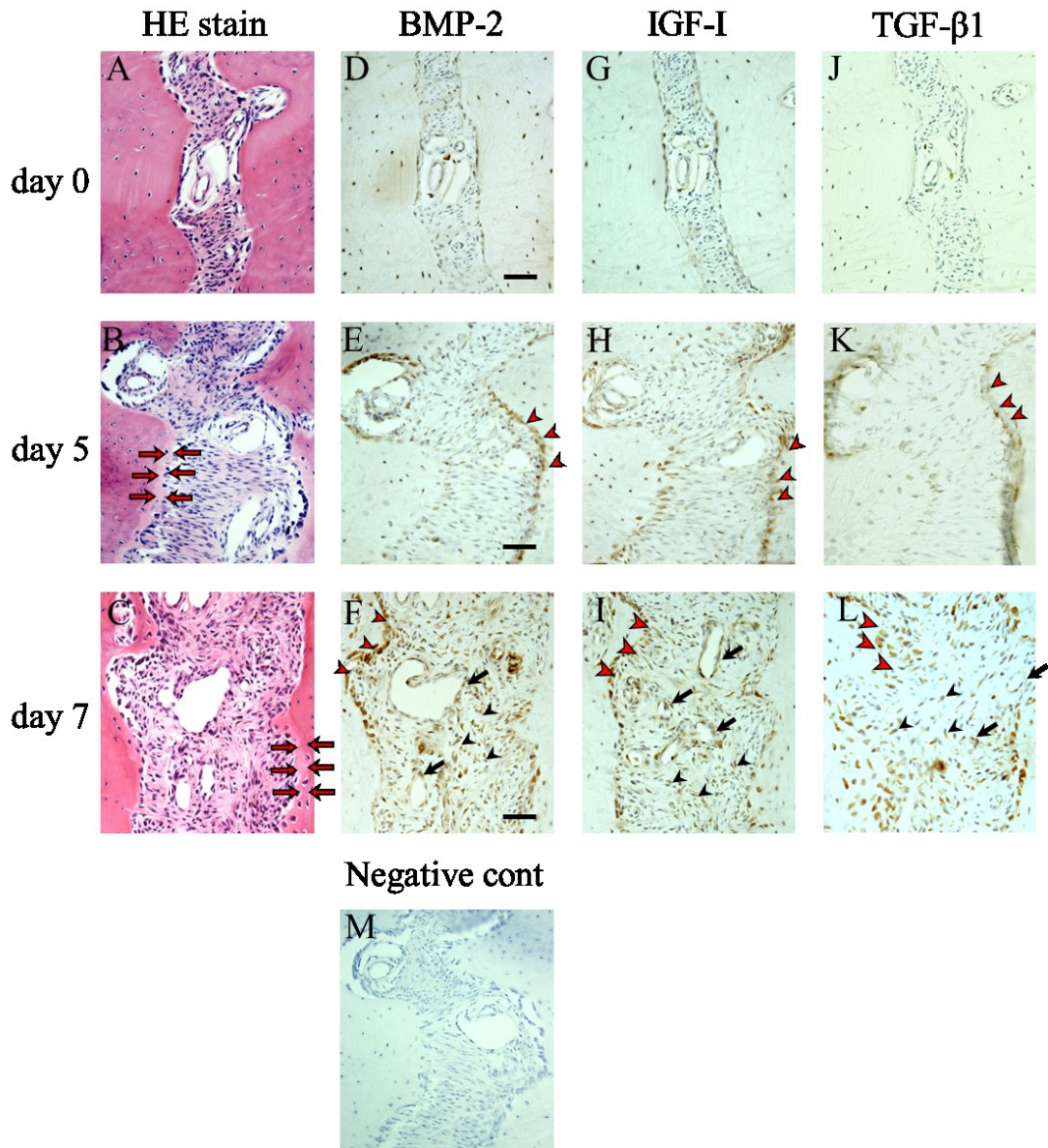


Figure 9. Histological findings in mid-palatal suture. Thick osteoid layers (red arrows) were observed in contact with the bone surface on days 5 and 7, and layer of osteoblasts were found along the osteoid surface. In contrast, little osteoid and a single layer of osteoblasts were observed on day 0 (Fig. 9 A, B, C). Very little expression of BMP-2, IGF-I and TGF- $\beta$ 1 was detected in the mid-palatal suture on day 0 (Fig. 9 D, G, J). BMP-2, IGF-I and TGF- $\beta$ 1 expressions were detected in osteoblastic layers (red arrowheads) on days 5 and 7, and was more intense on day 7 than on day 5 (Fig. 9 E, F, H, I, K, L). Expression was found also in endothelial cells inside blood vessels (black arrows) and fibroblasts (black arrowheads) in the suture on day 7 (Fig. 9 F, I, L). The expression of IGF-I and TGF- $\beta$ 1 in response to RME were similar to that of BMP-2, but TGF- $\beta$ 1 expression was weaker than others. In the negative control, no specific immunoreactivity was present in any structure on day 5 (Fig. 9 M). Scale bar: 100  $\mu$ m.



## 考 察

本研究では *in vivo* micro-CT を使用し、同一個体のラットの急速拡大による正中口蓋縫合の拡大量とその後の骨形成量を連続的に評価した。これまでに、Houら<sup>4)</sup>は従来型の micro-CT を使用し、拡大後 14 および 28 日の骨組織を定量的に評価した。しかし、従来型の micro-CT では、正中口蓋縫合を含む摘出した上顎骨を撮影しなければならなかったため、同一個体における正中口蓋縫合拡大後の経日的変化を検討することはできなかった。しかし近年、*in vivo* micro-CT が開発されたことによって、同一の実験動物を麻酔下で経日的に長期間にわたって撮影し画像を得ることが可能となった<sup>7,8)</sup>。また、同一個体の同一測定領域の骨体積減少と増加の差分を定量的に評価するソフトウェアも利用できるようになった。ROI の三次元計測では、骨体積は経日的に減少し、拡大後 12 日に最小値 ( $-0.34 \text{ mm}^3$ ) を示した(Fig. 6A, B)。また、二次元計測においても、S1 での幅径は経日的に増加し、拡大後 12 日に最大となった (Fig. 7A)。これらの結果から、正中口蓋縫合は切歯間へのメタルリング挿入後急速に拡大されるのではなく、その拡大には約 12 日間かかることが明らかになった。二次元計測では拡大後 6 日の拡大幅径 (S1 における拡大後 6 日の縫合部幅径から 0 日の縫合部幅径を引いた幅径) は  $170 \mu\text{m}$  であった。Saito と Shimizu<sup>23)</sup> は、同様の拡大実験で骨生体染色法による定量的な骨組織形態計測を行い、急速拡大後 6 日の縫合部骨前

頭断面観における骨添加は 49.2  $\mu\text{m}$  と報告した。本研究において、拡大後 12 日まで縫合部の骨体積が減少したことから (Fig. 6B), 正中口蓋縫合の拡大量は、拡大後 12 日まで骨形成による補償量を超えていたと考えられる。拡大後 12 日以降骨形成が優位になったことから、この 12 日が縫合部の骨体積が増加し始める変曲点であると考えられた。なお、拡大後 24 日には、縫合部の骨体積は 63% まで修復された。

S1 の幅径は拡大後徐々に増加し 12 日で最大となったが、切歯間距離は拡大後 1 日で急速に増加し、3 日以降は徐々に増加した (Fig. 7A, B)。この結果は、上顎切歯の拡大は短期間 (1 日) で急速な歯の移動を引き起こすが、正中口蓋縫合の拡大は 12 日間続き、その後さらに時間をかけて骨形成によって閉鎖されることを示唆している。骨体積の増加曲線を考慮すると、骨が修復されるまでには 30 日以上必要であると推測される (Fig. 6B)。この期間をヒトに置き換えると、ヒト思春期の 1 年間はラットの 1.5 週から 2 週に相当するので<sup>22,25)</sup>、2 年から 3 年間となる。臨床的には、上顎急速拡大後、トランスパラタルアーチを 3 カ月間装着し、さらに 3 年から 4 年間の固定式矯正装置と保定装置を装着することになる<sup>26)</sup>。また、上顎急速拡大後は 4 年以上の保定を行うことも推奨されている<sup>27)</sup>。したがって、1 回の拡大で骨修復が 30 日以上必要であるという本研究結果は、上顎骨狭窄歯列弓症例に対する矯正治療に対して、臨床的にも整合性がある

ると考えられる。しかし、本研究では単回で 1.5 mm の拡大を行っており、1 回 0.2 mm の拡大を連続して行う臨床での急速拡大法とは異なるため、今後さらなる検討が必要である。

本研究では急速拡大後の正中口蓋縫合部において BMP-2, IGF-I および TGF- $\beta$ 1 が強く発現したため、これらの因子は縫合部での骨形成において重要な役割を担う可能性が考えられた。正中口蓋縫合急速拡大後の骨形成では BMP-2 は膜内骨化を誘導し<sup>11)</sup>、骨修復期間中に BMP-2, IGF-I および TGF- $\beta$ 1 の発現量が増加したと報告されている<sup>12)</sup>。BMPs は TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する糖タンパク質であり、強力な骨芽細胞分化促進因子として、骨リモデリングにおける骨形成において重要な役割を担っている<sup>13)</sup>。BMP-2 は、BMP ファミリーの中で最も重要な因子の一つであり、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導させる主要な転写因子 Runx2 の発現を増加することによって、骨形成を促進する<sup>14)</sup>。さらに、BMP-2 はメカニカルストレスによってその発現が誘導され、骨芽細胞への分化を促進させることが報告されている<sup>18,21)</sup>。IGF-I もまた *in vivo*<sup>15)</sup> や *in vitro*<sup>16)</sup> の研究において、骨形成の強力な刺激因子として知られており、間葉系間質細胞の増殖や分化を増強させる。また、IGF-I はラットの頭蓋縫合の組織培養で縫合部に引張力を負荷することによって誘導され<sup>20)</sup>、石灰化を促進する BMP-2 の機能を増強する<sup>16)</sup>。一方で TGF- $\beta$ 1 は、BMP-2 によって誘導される異

所性の骨形成を強力に助長する作用を有し<sup>17)</sup>、骨芽細胞様細胞に牽引力を加えることによって誘導されることが報告されている<sup>19)</sup>。本研究では、正中口蓋縫合急速拡大後、BMP-2、IGF-I および TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現は有意に増加し、その最大発現レベルは BMP-2 および IGF-I では拡大後 3 日でそれぞれ拡大前の 5、28 倍となり ( $p < 0.01, p < 0.05$ ; Fig. 8A, B), TGF- $\beta$ 1 では拡大後 5 日で拡大前の 3 倍となった ( $p < 0.05$ ; Fig. 8C)。また、免疫組織化学的検討から、拡大後 5 日に正中口蓋縫合部骨縁に沿った骨芽細胞層で BMP-2、IGF-I および TGF- $\beta$ 1 のタンパク発現が観察され、拡大後 7 日においては縫合部軟組織内の血管内皮細胞や線維芽細胞でもそれらの陽性反応がみられた (Fig. 9)。これらの結果から、メカニカルストレスに対する応答性は細胞の種類や組織内環境によって異なり、骨芽細胞は他の細胞より強く影響を受けることが示された。

Mukherjee ら<sup>28)</sup> は、IGF-I は PI3 キナーゼ Akt シグナル経路を介して、BMP-2 に誘導された骨芽細胞の分化、成熟に影響を及ぼすと報告した。一方、Yu ら<sup>29)</sup> は、IGF-I は ERK1/2 シグナル経路を介して、Runx2 の発現を亢進させ、骨芽細胞分化を促進させると報告した。これらの報告は、骨修復において BMP-2 と IGF-I を含むいくつかのシグナル経路が存在することを示唆しているが、急速拡大後の骨修復における詳細なシグナル経路やクロストークを評価するためには、さらなる研究が必要と考えられる。

以上のことから、単回の急速拡大による正中口蓋縫合の拡大は 12 日間持続し、その修復には 30 日以上必要であり、その骨修復過程には、BMP-2、IGF-I および TGF- $\beta$ 1 が重要な役割を担うことが示唆された。また、本研究結果は、臨床における正中口蓋縫合急速拡大後の長期保定の必要性を裏付けるものであると考えられた。

## 結 論

急速拡大によって引き起こされる正中口蓋縫合における形態学的変化とその後の骨形成，ならびに生物学的反応について明らかにするために，ヒト思春期に相当する 8 週齢ラットの正中口蓋縫合を実験的に拡大し，*in vivo* micro-CT 画像を用いて急速拡大後の縫合部の形態学的変化について経日的に検討した。また，*real time* RT-PCR と免疫組織化学にて縫合部の骨形成関連因子の発現についても併せて検討した。

その結果，以下の結論を得た。

1. ラット上顎中切歯間 1.5 mm 急速拡大によって，正中口蓋縫合部は経日的に拡大され，その拡大量は 12 日で最大となり，24 日には拡大前の 63%まで修復された。
2. 拡大後の修復過程において，正中口蓋縫合部の BMP-2, IGF-I および TGF- $\beta$ 1 の発現は有意に増加した。

以上のことから，ラットにおける単回の急速拡大による口蓋縫合拡大は，12 日間持続し、その修復には 30 日以上必要であり，その修復過程には BMP-2, IGF-I および TGF- $\beta$ 1 が重要な役割を担うことが示唆された。また，本研究結果と臨床における正中口蓋縫合急速拡大後の長期保定の必要性とは整合性があると考えられた。

## 謝 辞

本研究遂行にあたり，格別なるご指導ご校覧を賜りました日本大学歯学部歯科矯正学講座の清水典佳教授，馬谷原琴枝助教，日本大学歯学部の新井嘉則特任教授に謹んで心より感謝申し上げます。また，本研究を通じ多大なるご協力と助言を賜りました本学部病理学講座の松本直行助教をはじめ，歯科矯正学講座，歯科放射線学講座の皆様は深く感謝いたします。

本研究は平成 23～24 年度大学院歯学研究科研究費 (学生分：竹之内裕行) および平成 23～24 年度日本大学歯学部佐藤研究費 (研究代表者：清水典佳) によってなされた。

本研究の要旨は，第 72 回日本矯正歯科学会大会 (2013，松本) において発表した。

## 文 献

- 1) Thilander B, Rygh P, Reitan K (2005) Tissue reactions in orthodontics: Orthodontics current principles and techniques, C.V. Mosby Publishing Company, St. Louis, 186-191
- 2) Ekström C, Henrikson CO, Jensen R (1977) Mineralization in the midpalatal suture after orthodontic expansion. Am J Orthod 71, 449-455
- 3) Gill D, Naini F, McNally M, Jones A (2004) The management of transverse maxillary deficiency. Dent Update 31, 516-523
- 4) Hou B, Fukai N, Olsen BR (2007) Mechanical force-induced midpalatal suture remodeling in mice. Bone 40, 1483-1493
- 5) Pickhardt PJ, Halberg RB, Taylor AJ, Durkee BY, Fine J, Lee FT Jr, Weichert JP (2005) Microcomputed tomography colonography for polyp detection in an in vivo mouse tumor model. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 3419-3422
- 6) Behr B, Sorkin M, Manu A, Lehnhardt M, Longaker MT, Quarto N (2011) Fgf-18 is required for osteogenesis but not angiogenesis during long bone repair. Tissue Eng Part A 17, 2061-2069
- 7) Arai Y, Yamada A, Ninomiya T, Kato T, Masuda Y (2005) Micro-computed tomography newly developed for *in vivo* small animal imaging. Oral Radiol 21,



14-18

- 8) Arai Y, Ninomiya T, Tanimoto H (2007) Development of *in vivo* micro computed tomography using flat panel detector. *Dent Jpn* 43, 109-111
- 9) Omasa S, Motoyoshi M, Arai Y, Ejima K, Shimizu N (2012) Low-level laser therapy enhances the stability of orthodontic mini-implants via bone formation related to BMP-2 expression in a rat model. *Photomed Laser Surg* 30, 255-261
- 10) Saito Y, Sato S, Oginuma T, Saito Y, Arai Y, Ito K (2013) Effects of nicotine on guided bone augmentation in rat calvarium. *Clin Oral Implants Res* 24, 531-535
- 11) Stoeger T, Proetzel GE, Welzel H, Papadimitriou A, Dony C, Balling R, Hofmann C (2002) *In situ* gene expression analysis during BMP2-induced ectopic bone formation in mice shows simultaneous endochondral and intramembranous ossification. *Growth Factors* 20, 197-210
- 12) Kuroda S, Viridi AS, Dai Y, Shott S, Sumner DR (2005) Patterns and localization of gene expression during intramembranous bone regeneration in the rat femoral marrow ablation model. *Calcif Tissue Int* 77, 212-225
- 13) Gaggero E, Canalis E (2006) Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 51-65
- 14) Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ,

- Gaur T, Lengner CJ, Young DW (2006) Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 1-16
- 15) Jiang J, Lichtler AC, Gronowicz GA, Adams DJ, Clark SH, Rosen CJ, Kream BE (2006) Transgenic mice with osteoblast-targeted insulin-like growth factor-I show increased bone remodeling. *Bone* 39, 494-504
- 16) Doorn J, Roberts SJ, Hilderink J, Groen N, van Apeldoorn A, van Blitterswijk C, Schrooten J, de Boer J (2013) Insulin-like growth factor-I enhances proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells *in vitro*. *Tissue Eng Part A* 19, 1817-1828
- 17) Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, Tsukasaki H, Inoue T, Shintani S, Koike T, Honda Y, Suzuki O, Baba K, Kamijo R (2010) Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Tissue Eng Part A* 17, 597-606
- 18) Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Yasui N (1999) Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 14, 1084-1095
- 19) Cillo JE Jr, Gassner R, Koepsel RR, Buckley MJ (2000) Growth factor and cytokine

- gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: implications for distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90, 147-154
- 20) Hirukawa K, Miyazawa K, Maeda H, Kameyama Y, Goto S, Togari A (2005) Effect of tensile force on the expression of IGF-I and IGF-1 receptor in the organ-cultured rat cranial suture. *Arch Oral Biol* 50, 367-372
- 21) Wang L, Li JY, Zhang XZ, Liu L, Wan ZM, Li RX, Guo Y (2012) Involvement of p38MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoblasts differentiation in response to mechanical stretch. *Ann Biomed Eng* 40, 1884-1894
- 22) Quinn R (2005) Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 21, 775-777
- 23) Saito S, Shimizu N (1997) Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 111, 525-532
- 24) Boussein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25, 1468-1486
- 25) Sengupta P (2013) The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev* 4,

624-630

- 26) Gurel HG, Memili B, Erkan M, Sukurica Y (2010) Long-term effects of rapid maxillary expansion followed by fixed appliances. *Angle Orthod* 80, 5-9
- 27) Haas AJ (1980) Long-term posttreatment evaluation of rapid palatal expansion. *Angle Orthod* 50, 189-217
- 28) Mukherjee A, Rotwein P (2009) Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *J Cell Sci* 122, 716-726
- 29) Yu Y, Mu J, Fan Z, Lei G, Yan M, Wang S, Tang C, Wang Z, Yu J, Zhang G (2012) Insulin-like growth factor 1 enhances the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK and JNK MAPK pathways. *Histochem Cell Biol* 137, 513-525

## 基幹論文

Hiroyuki Takenouchi, Kotoe Mayahara, Yoshinori Arai, Yoko Karasawa, Noriyoshi Shimizu. Longitudinal quantitative evaluation of the mid-palatal suture after rapid expansion using in vivo micro-CT. *Archives of Oral Biology*, 2014 (in press)