

セメント芽細胞のアポトーシスは RANKL 発現を介して歯根吸収を悪化させる

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

湊 友香里

(指導：葛西 一貴 教授)

本稿は、主となる参考論文 Effect of caspases and RANKL induced by heavy force in orthodontic root resorption (*Korean Journal of Orthodontics* 共著 掲載予定) および副となる参考論文 Caspase-mediated apoptosis by compressive force induces RANKL in cementoblasts (*International Journal of Oral-Medical Sciences* 共著 掲載予定) をまとめたものである。

Abstract

Orthodontic root resorption (ORR) is one of the serious adverse events related to orthodontic treatment. Caspases are important effector molecules for apoptosis. In present, little is known about the mechanisms of ORR and apoptosis in the cementum.

In vivo, we used male Wistar rats to investigated expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), caspase 3, 8 and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) induced by heavy or optimum forces in the cementum. In vitro, we cultured human cementoblast-like cells (HCEM) and the pressure conditions were reproduced during orthodontic tooth movement. We examined the effect of compressive force on caspase 3, 8, RANKL and osteoprotegerin (OPG) release. Furthermore, the association between root resorption and caspase was examined using Z-ValAla-DL Asp-fluoromethylketone (z-VAD-fmk) which is a caspase inhibitor.

Studies, on day 7, hematoxylin and eosin staining revealed that an orthodontic force of 50 g induced numerous root resorption lacunae with odontoclasts on the root. Immunohistochemistry, they were increased TRAP-positive cells and RANKL-positive cells in the 50 g group on day 7. Caspase 3 and 8-positive cells were increased on the cementum surface in the 50 g group on days 3 and 5. Furthermore, it was significantly increased caspase-3 and 8-positive cells and RANKL-positive cells in 50 g group

compared with that of 10 g group. Studies, the application of heavy force (HF) induced higher levels of caspase 3 and 8 than optimum force (OF). The expression of RANKL in cementoblasts was observed after the release of caspase 3 and 8 in the HF group. In the HI group administered z-VAD-fmk, the expression of RANKL was significantly decreased, and the production was suppressed compared with the HF group. The difference in the RANKL/OPG protein ratio was significantly decreased to about 57% at 9 h and 40% at 12 h in the HI group compared to the HF group.

These findings suggested that cementoblasts produced caspases 3 and 8 in heavy forces to activate the apoptotic pathway and then induce osteoclasts via RANKL, as part of cause ORR.

緒言

歯科矯正治療は顎口腔機能の改善や審美性の回復など多くのメリットを有するが、程度の差はあるものの、歯根吸収を生じることが知られている。歯科矯正治療における歯根吸収は、予測することが困難な偶発症の一つであり、多くが歯根表層や歯根尖に限局した小さなもので、最終的にはセメント芽細胞による吸収部位の修復機転が生じる。しかし、歯根が広範に吸収されることにより歯の動揺をきたし、咀嚼機能に大きな影響を及ぼすことがある。Kaley ら (1) は、歯科矯正治療を受けたほとんどの患者に歯根吸収が認められ、その中の 3% が上顎中切歯において重度歯根吸収 (根長の 4 分の 1 以上の吸収) が出現したと報告している。歯根吸収の原因について、治療期間の長期化 (2)、歯根の形態異常 (2)、外傷の既往 (3)、遺伝的要因 (4)、矯正力の大きさ (5) および歯の移動様式 (ジグリングなど歯の往復運動) (6) などが報告されているが、明確な原因は未だ解明されていない。最適な歯科矯正力の適用は適度な骨代謝サイクルを促す。しかし、強い歯科矯正力の適用は、歯根膜組織における局所虚血、組織治癒およびアポトーシスを誘発すると考えられる。

アポトーシスは、プログラムされた細胞死であり、実行には多くの構成要素が必要である。最近の研究では、ラットの実験的歯牙移動において、硝子様変性が起きた歯根膜線維芽細胞 (PDL) に隣接する歯槽骨の骨細胞がアポトーシス

によって細胞死を引き起こすことが示唆されている (7)。また、アポトーシスは矯正力の適用 3 日後でピークに達することが報告され (8), さらに, DNA 損傷した状態で細胞周期が継続すると, アポトーシス機構が誘発される (9)。カスパーゼはアポトーシスによる細胞死の過程の調節要素として, そして細胞死そのものの機能として, 引き金となるシグナル伝達経路において重要な役割を果たす。また, カスパーゼはアスパラギン酸残基後のタンパク質を切断するシステインプロテアーゼファミリーに属する。カスパーゼ 2, 8, 9 および 10 は開始カスパーゼとして, カスパーゼ 3, 6 および 7 は実行カスパーゼとして分類されており, それらの活性化は, 細胞の収縮, クロマチン凝縮, DNA の断片化および細胞膜小胞の発生など, アポトーシスによる細胞死における特徴的な形態学的変化をもたらす。

歯根表面を覆うセメント質は, セメント芽細胞によって産生される菲薄な石灰化組織からなる。近年 *in vitro* において, ヒト初代セメント芽細胞が圧力下でアポトーシスを起こすことが報告された (10)。しかしながら, 歯科矯正治療中の歯根吸収とセメント芽細胞のアポトーシスとの関係についてはほとんど知られていない。

当講座では以前, 強い矯正力がかかると, 歯根吸収表面および歯根膜線維芽細胞 (PDL) において receptor activator of NF- κ B ligand (以下, RANKL) が発現され

ることを報告した (11)。 加えて Hatai ら (12) は, 歯牙移動時に圧迫側の PDL でアポトーシスが発現することを示唆している。これらの報告から, アポトーシスおよび RANKL の発現は, 歯科矯正治療中の歯根吸収の発生に深く関与することが考えられる。

本研究は, 矯正力の視点からアポトーシスによる細胞死における外因性経路に焦点をあてた。*in vivo* 実験としてラット上顎右側第一臼歯の矯正移動を施し, *in vitro* 実験として培養ヒトセメント芽細胞様細胞 (human cementoblast-like cell lines, 以下 HCEM) を用いて実験を行なった。破歯細胞の出現は tartrate-resistant acid phosphatase (以下, TRAP) 活性で, アポトーシスにつながる外因性経路の情報伝達経路はカスパーゼ 3, 8 の遺伝子およびタンパク質発現で, また破歯細胞の分化促進因子 RANKL の発現と, RANK-RANKL システムの抑制をするオステオプロテジェリン (以下, OPG) 産生について, 異なる矯正力での影響について検討した。

材料および方法

1. *in vivo* 研究

1) 実験動物および歯の移動方法

本動物実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理に関する指針 (承認番号 第

AP15MD006号) に準じて行った。実験には6週齢のWistar系雄性ラット(140±9.5 g)を合計60頭用い、飼育管理を日本大学松戸歯学部実験動物センターにてSPFクリーンラック内で行い、固形飼料、飲料水、床敷およびケージは全て滅菌したものを使用した。全ての行程は生理食塩水で希釈(1.8625 mg/kg)した3種混合麻酔薬(塩酸メデトミジン 0.15mg/kg, ミダゾラム 2mg/kg, 酒石酸ブタフェリル 2.5mg/kg)で腹腔内注射を施し、全身麻酔下で実施した。

上顎右側第一臼歯の移動を行うために、Asanoら(13)の方法に従って行い、コイルスプリング(太さ: 0.005 inch, 直径: 1/12 inch, Accurate, Inc., Tokyo, Japan)と上顎右側第一臼歯をステンレススチールの結紮線(太さ: 0.008 inch, Tomy International Inc. Tokyo, Japan)で結び、コイルスプリングの他方を前歯と結んだ(Fig. 1)。対照(以下, control)群, 至適矯正力(以下, 10 g)群, 強い矯正力(以下, 50 g)群の計3群に分けた。実験群のラットには、上顎右側第一臼歯にそれぞれ10 g または 50 g の矯正力で設定されたコイルスプリングにより、近心方向に1,3,5および7日間の牽引を行った(Fig. 1)。

2) 標本作製および観察部位

当該期間を経過したラットは、3種混合麻酔薬で深麻酔した後、生理食塩水と10%中性緩衝ホルマリンで灌流固定した。さらに上顎骨を剔出して、10%中性

緩衝ホルマリンにて 4°C で 24 時間浸漬固定後、試料を 10 % EDTA 溶液 (pH 7.4) にて 4 週間脱灰処理を行った。脱灰した試料は、流水洗浄し、通法に従ってパラフィン包埋ブロックを作製後、水平方向に厚さ 4 μm で連続的に薄切し、各種染色法を施行した。

3) 病理組織染色法および免疫組織化学染色法

ヘマトキシリン・エオジン重染色 (以下, H.E. 染色) は、試料の脱パラフィン後、通法に従い施行した。

免疫組織化学染色は、試料の脱パラフィン後、通法に従い施行した。一次抗体には、polyclonal ヤギ抗 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA; 希釈倍率 1:100), polyclonal ウサギ抗 caspase 3 (Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA ; 希釈倍率 1:300), polyclonal ウサギ抗 caspase 8 (Novus Biologicals, Inc., CO, USA ; 希釈倍率 1:1000), polyclonal ヤギ抗 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 希釈倍率 1:100) を用いた。各切片は、脱パラフィン後 0.5 % 過酸化水素メタノール溶液に室温で 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ反応の除去を行った。次いで、各切片を 10mM トリス EDTA 緩衝液の入ったビーカーに入れ、500W の電子レンジを用いて 15 分間加熱し徐冷した。tris-buffered saline (TBS) で洗浄し、

前述の一次抗体を室温で 1 時間反応させた。一次抗体反応後、二次抗体として caspase 3 および 8 を、Histofine Simple Stain MAX-Po (multi) kit (Nichirei, Co., Tokyo, Japan) を使用し、TRAP および RANKL を、Histofine Simple Stain MAX-Po (G) kit (Nichirei, Co., Tokyo, Japan) を使用しプロトコールに従い染色した。各切片は TBS で洗浄し、3, 3' -diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にて発色後、マイヤーヘマトキシリン液を用いて対比染色を行い、アルコール・キシレン系列にて脱水および透徹を行い、マリノールにて封入を行った。また negative control として、一次抗体の代わりに TBS を用いた。観察部位は Kikuta ら (14) の方法を参考にし、上顎右側第一臼歯の遠心頬側根の圧迫側の歯根表面に隣接するセメント芽細胞を光学顕微鏡下 200 倍にて任意の 4 視野を観察し、茶褐色に染色された細胞を陽性とした。TRAP および RANKL は領域内の陽性細胞数の各群平均値を算出し、Caspase3 および 8 は歯根表面に隣接する細胞をセメント芽細胞とし陽性率を計測した。(Fig. 2)。

2. *in vitro* 研究

ヒトセメント芽細胞様細胞, HCEM は高田隆教授 (広島大学大学院) から享受して頂いた。HCEM の培養は, Kitagawa ら (15) が以前に確立した方法を参考

にし、 α -MEM (Wako, Osaka, Japan) に 100 μ g/ml ペニシリン-G (Sigma Chemical Co., MO, USA), 0.3 μ g/ml アムホテリシン B (Flow Laboratories, McLean, VA, USA), 10% ウシ胎児血清 (FCS) (Cell Culture Laboratories, OH, USA) および 50 μ g/mL の硫酸ゲンタマイシン (Sigma) を混合した培地を使用した。大気 95%, CO₂ 5% の存在下, 加湿された CO₂ インキュベーター (Forma CO₂ incubator MIP-3326; Sanyo Electric Medical System Co., Tokyo, Japan) にて 37°C で培養を施した。

圧迫力の適用

矯正力による歯牙移動時の圧力条件を再現するために, Yamaguchi ら (16) の方法にて培養細胞を連続的に圧迫した。HCEM は 100mm 細胞培養皿に播種し, 一晩 CO₂ インキュベーター内で温置後, 細胞がほぼコンフルエントに達したことを確認後, 培地を 10% から 1% FCS に変更した。培地を含む細胞上にカバーガラスをのせ, さらにその上に分銅を乗せることで細胞にかかる圧迫力 (compressive force: CF) を調整し培養を継続した。適度な圧迫力 1.0 g/cm² を施した群を OF (optimal force) 群, 過度な圧迫力 4.0 g/cm² を施した群を HF (heavy force) 群とした。また, CF を負荷せず, カバーガラス (0.032 g/cm²) のみ載せたものをコントロール群とした (Fig. 3)。

カスパーゼ阻害剤の添加

カスパーゼ 3 および 8 の阻害実験は、CF を施す前に、広域スペクトルをもち、細胞膜透過性で不可逆的な阻害作用を有する $50 \mu\text{M}$ zVAD-fmk カスパーゼ阻害剤を培地に添加することで行った (17)。分銅による圧迫力をかけていないコントロール群に添加したものを CI (control + inhibitor) 群、HF 群に添加したものを HI (heavy force + inhibitor) 群と設定した。

Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

RNeasy Mini kit (Qiagen Co., Tokyo, Japan) を用いて全 RNA を HCEM から抽出し、濃度調整後、逆転写反応後の cDNA を real-time PCR にかけた。具体的には Prime Script RT Reagent Kit (Takara Co., Shiga, Japan) を用いてプロトコールに従って mRNA を cDNA に逆転写し、サーマルサイクラー (TP-800 Thermal Cycler Dice; Takara) 内で SYBR Premix Ex Taq (Takara Co.) を用いて real-time PCR を行った。使用した PCR プライマーを Table 1 に示す。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

培養上清中に放出された可溶性 RANKL (sRANKL), カスパーゼ 3 および 8 の発現は、ヒト sRANKL ELISA kit (BIOMEDICA Co., Wien, Austria), ヒトカスパー

ゼ 3 ELISA kit (R&D Systems Co. USA) およびヒトカスパーゼ 8 ELISA kit (Abcam Co., CB, UK) をそれぞれ使用して、プロトコールに従って解析を行った。

3. 統計解析

各群における陽性細胞の差の検定は、Kruscal Wallis test を用いた。

結果

in vivo 研究

1. 病理組織学的所見 (H.E.染色)

Control 群の、1, 3, 5 および 7 日目では、歯根表面のセメント質は比較的平滑であった (Figs. 4a-d)。

10 g 群では、矯正力の適用後 3 日目から 5 日目において線維性結合組織と線維芽細胞の走行は不規則であり、7 日目には歯根表面のセメント質の不整が観察された (Fig. 4h)。

50 g 群では、1 日目から線維性結合組織と線維芽細胞の走行は不規則であり (Fig. 4i)、7 日目では破歯細胞を含む象牙質まで達する多数の歯根吸収窩が認められた (Fig. 4l)。

2. 免疫組織化学的所見

1) TRAP の発現所見

control 群および 10g 群では、TRAP 陽性破歯細胞は 1 日目から 7 日目を通して歯根表面に殆ど認められなかった (Figs. 5a-d)。

TRAP 陽性細胞数は 10 g, 50 g 群共に 1 日目から 7 日目のいずれも control 群と比較して高値であった。特に 50 g 群の 7 日目は control 群および 10 g 群と比較して有意に高値であった (Fig. 6)。

2) カスパーゼ 3, 8 および RANKL の発現所見

Control 群において、カスパーゼ 3, 8 および RANKL 陽性細胞は、1 日目から 7 日目を通して歯根表面にほぼ認められなかった (Figs. 7, 9, 12 a-d)。

10g 群において、歯根表面のカスパーゼ 3 陽性細胞は 3 日目から 7 日目にかけて認められた (Fig. 8)。カスパーゼ 8 の陽性細胞は、5 日目に最も多く観察された (Fig.10)。RANKL 陽性細胞は 7 日目の歯根表面に散見された (Fig.11e-h)。

50g 群では、カスパーゼ 8 陽性細胞は 1 日目において PDL 内に出現した (Fig.9i)。カスパーゼ 3, 8 のいずれも 3, 5 日目で多数認めたが、7 日目には減少した。陽性細胞率は、カスパーゼ 3, 8 共に 5 日目が最高値で、いずれも 50 g 群は 10 g 群, control 群と比較し有意に高値を示し、7 日目には減少した (Fig. 8, 10)。

一方, RANKL の陽性細胞数は 10 g 群, 50 g 群共に 7 日目が最高値で, 5, 7 日目の 50 g 群は 10 g 群, control 群と比較して有意に高値であった (Fig. 12)。

in vitro 研究

1. 培養セメント芽細胞様細胞での関連遺伝子の発現に対する CF の影響

HF 群でのカスパーゼ 3 および 8 の遺伝子発現は, OF 群および control 群と比較し常に高値で推移した。また, それらの発現量は圧力負荷後 6 時間でピークを示した。(Fig.13A, B)。

RANKL の遺伝子発現も同様に, HF 群では OF 群や control 群よりも常に高値で推移し, その発現のピークは 12 時間であった (Fig.13C)。

一方で, HF 群での OPG 遺伝子の発現は, OF 群や control 群よりも常に低値で推移し, 9 時間後に最も低くなる傾向を示したが, 有意差は認められなかった (Fig.13D)。RANKL / OPG 比は, HF 群において 6, 9, 12 および 24 時間で OF 群より有意な増加が認められた (Fig.13E)。一方, control 群ではカスパーゼ 3, 8 および RANKL の mRNA 発現に大きな変化は認められなかった (Fig.13A-C)。

2. カスパーゼ阻害剤が関連遺伝子の発現に及ぼす影響

阻害実験において, HI 群のカスパーゼ 3 および 8 の mRNA 発現は, ほぼ Control 群と同じ値まで低下した (Fig.14A, B)。RANKL の HI 群における mRNA 発現は

6 時間以後に Control 群と比較して増加傾向にあったが、HF 群と比較すると 6 時間から 24 時間にかけて顕著な減少傾向が認められた (Fig.14C)。一方で、OPG 遺伝子発現の動向は、HF 群および HI 群においてほぼ同様であり、control 群と比較し低値を示しているが有意差は認められなかった (Fig.14D)。RANKL / OPG 比は、HI 群では control 群と比較し増加傾向にあるものの、HF 群との比較では 9 時間および 12 時間で有意な減少が認められ、HI 群は、HF 群よりも 9 時間で約 57%、12 時間で約 40%の有意な減少であった(Fig.14E)。

3. カスパーゼ 3, 8 および sRANKL のタンパク質発現に及ぼす CF の影響

OF 群および HF 群における HCEM 由来のカスパーゼ 3, 8 および sRANKL のタンパク質産生を ELISA を用いて測定した。HF 群におけるカスパーゼ 3 および 8 のタンパク質産生は圧迫力負荷後 12 時間まで増加し、その後減少した (Fig.15A, B)。HF 群の RANKL のタンパク質産生は、OF 群よりも実験開始後 48 時間を通じて高値で推移するとともに、24 時間後にピークが認められた (Fig.15C)。これに対して、HI 群ではわずかに上昇傾向を示したが、9~24 時間において HF 群と比較し有意な減少が認められた。カスパーゼ 3 および 8 のタンパク質産生も同様に、HF 群では OF 群および control 群と比較し、各時間において有意な増加が認められた (Fig.15A-C)。

考 察

本研究は、セメント芽細胞に対する強い矯正力により、アポトーシス関連因子であるカスパーゼ 3, 8 が誘導されるとともに、RANKL を介した破歯細胞への分化を引き起こすことにより、歯根吸収の増悪に関与するか否かを検討した。

アポトーシス誘導は、外因性経路または内因性経路のいずれかを介して起こる。カスパーゼ 8 は、外因性経路に関与し、Fas-Fas リガンドなどのシグナル伝達によって活性化される。一方、カスパーゼ 9 は内因性経路に関与し、これは細胞傷害性ストレスやゲノム損傷などによりカスパーゼを活性化させる (18)。本研究では、ラットにおける実験的歯牙移動時の免疫組織化学染色においても、セメント芽細胞培養による圧迫力負荷時の遺伝子・タンパク質発現においても、カスパーゼ 3, 8 は至適矯正力および control と比較し、強い矯正力において発現の増加が認められており、外因性経路でのアポトーシスの誘導が起こったことが推定される。

Mabuchi ら (19) および Hatai ら (12) は、ラットの歯牙移動後の圧迫側においてアポトーシスが誘導されることを報告している。本研究ではさらに、歯根表面のセメント芽細胞において至適矯正力よりも強い矯正力にてアポトーシス因子が増大することを実証した。Diercke ら (10) は、セメント芽細胞の圧迫時にカスパーゼの発現を増加させ、セメント芽細胞におけるアポトーシス関連遺伝子

(前アポトーシス遺伝子および抗アポトーシス遺伝子) の発現は、矯正治療時における歯牙移動時にセメント芽細胞の調節機構におけるアポトーシスの関与を示唆した。この結果は、本研究における知見を強く支持している。

RANKL は、破骨 (歯) 細胞の産生を誘導する因子である。また、OPG は RANK と競合し、RANKL に結合することで破骨 (歯) 細胞形成を阻害する (20)。したがって、RANKL / OPG 比は骨吸収の指標として広く使用されている。RANKL が増加すると骨吸収が起こるが、対照的に OPG が増加すると骨形成が起こる。従来の研究では、PDL に強い矯正力をかけることで起こる歯根吸収部位に RANKL 発現が増加することが報告されている (11)。本研究では、ラットの実験的歯牙移動において、セメント質での RANKL 発現にも焦点を当てた。その結果、50 g 群の歯根表面の RANKL の陽性細胞数は 10 g 群よりも有意に増加した。また、RANKL 遺伝子およびタンパク質発現は、強い矯正力を加えた群で有意に増加が認められた。一方で、OPG 遺伝子発現は、control 群と比較して減少が認められ、強い矯正力を加えた群での RANKL / OPG 比は適度な矯正力を加えた群よりも有意に増加した。これら全体の研究結果から、強い矯正力を施した群では、破歯細胞が誘導され、歯根吸収が増加していると考えられる。また、この知見は RANKL / OPG システムが PDL だけでなく、セメント芽細胞においても同様に確認できたことを示唆している。また本研究では、カスパーゼと RANKL の発現

を遺伝子発現レベルおよびタンパク質発現レベルで経時的に測定したことにより、カスパーゼと RANKL の発現ピークに差異を検出した。この結果からセメント芽細胞は、強い矯正力の負荷を受容体が感知し、カスパーゼ 8 および 3 が発現したのちに RANKL 発現が高まることが推測された。

プロカスパーゼ 3 ノックアウトマウスでは、破骨前駆細胞の RANKL を介する分化が促進せず、その結果誘導される破骨細胞数は減少する。さらに、野生型マウスも本遺伝子改変マウスの脾臓から取り出したマクロファージ様細胞 RAW264.7 も TRAP を発現せず、カスパーゼ 3 阻害剤の処置後に多核化も認められないことから、RANKL の誘導する破骨 (歯) 細胞の分化には、カスパーゼ 3 活性が必要であることが報告されている (21)。

カスパーゼ阻害剤 zVAD-fmk は、最も頻繁に使用される細胞透過性カスパーゼ阻害剤であり、ほとんどの細胞においてアポトーシスを阻害することで知られている。本研究では zVAD-fmk 添加により、強い圧迫力下で発現するカスパーゼ 3 および 8 および RANKL の遺伝子ならびにタンパク質発現を有意に抑制した。この結果は、カスパーゼを介した RANKL の発現が zVAD-fmk によって減少したためであると考えられる。しかし、カスパーゼ阻害剤によりカスパーゼ遺伝子発現は、ほぼ完全に抑えられているにも関わらず、RANKL 遺伝子発現の抑制は不十分であった。これらの知見は、カスパーゼを介さない RANKL の発現誘

導が存在することを示していると推測される。また、これらの候補として TNF- α および Notch シグナルの関与などが最近の研究で報告されている (14, 22)。

セメント質は、歯根表面を覆う石灰化組織であり、細胞成分を含まない無細胞セメント質と細胞成分を含む有細胞セメント質に分類される。セメント芽細胞はセメント質に隣接し、円形または多角形の細胞形態を呈する。これらの細胞は、小管を有し隣接するセメント細胞および骨細胞と交通している (23, 24)。さらにセメント芽細胞は、I 型コラーゲン、オステオポンチンおよびオステオカルシンのようなマトリックスタンパク質が骨細胞の成分が近似する (25)。Hamaya ら (7) は、PDL に隣接する骨細胞のアポトーシスが骨吸収と関連する可能性があることを報告している。セメント質と骨の生物学的類似性を考慮すると、同様の状態が圧迫側のセメント芽細胞においても起こり得ることが考えられる。

Matsuzawa ら (26) は、歯科矯正治療においてセメント芽細胞のアポトーシスが歯根吸収に関与する可能性があることを報告しており、本研究のアポトーシスと歯根吸収との関係性を強く支持している。

セメント芽細胞は歯根吸収の修復に関与することが知られている。セメント芽細胞の細胞死により、歯根修復ができなくなることで歯根吸収が増悪することが考えられる。Diercke ら (11) は、セメント芽細胞の圧迫によりカスパーゼ発現を増加させると共に、その他のアポトーシス関連遺伝子の発現を増加させる

ことから歯科矯正治療において、セメント芽細胞におけるアポトーシスの関与を示唆している。加えて、歯科矯正治療による歯根吸収は壊死組織の除去によって引き起こされると報告 (27) されており、ラットの歯牙移動で硝子様変性組織の除去における TRAP 陽性多核破骨 (歯) 細胞の関与を強調している。本研究においても、TRAP 陽性破歯細胞数は強い矯正力で有意な増加が認められた。以上のことから、セメント芽細胞におけるアポトーシスは、歯根吸収を悪化させる可能性が本研究の結果により示唆された。

結 論

本研究ではセメント芽細胞におけるアポトーシスが歯科矯正治療における歯根吸収の発生に関与することが示された。セメント芽細胞は、強い矯正力にてカスパーゼ 3 および 8 の産生を増大し、アポトーシス経路を活性化させ、その後 RANKL の発現を増加することで多数の破歯細胞を誘導させ歯根吸収を増悪させることが示唆された。

参考文献

1. Kaley J, Phillips C. Factors related to root resorption in edgewise practice. *Angle Orthod*, 1991; 61: 125-132.
2. Levander E, Malmgren O, Stenback K. Apical root resorption during orthodontic treatment of patients with multiple aplasia: a study of maxillary incisors. *Eur J Orthod*, 1998; 20: 427-434.
3. Malmgren O, Goldson L, Hill C, Orwin A, Petrini L, Lundberg M. Root resorption after orthodontic treatment of traumatized teeth. *Am J Orthod*, 1982; 82: 487-491.
4. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK Jr, Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, Macri JV, Roberts WE. Genetic predisposition to external apical root resorption in orthodontic patients: linkage of chromosome-18 marker. *J Dent Res*, 2003; 82: 356-360.
5. Chan E, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: Part 5. Volumetric analysis of root resorption craters after application of light and heavy orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2005; 127: 186-195.
6. Hikida T, Yamaguchi M, Shimizu M, Kikuta J, Yoshino T, Kasai K. Comparisons of orthodontic root resorption under heavy and jiggling reciprocating forces during experimental tooth movement in a rat model. *Korean J Orthod*, 2016; 46: 228-241.

7. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int*, 2002; 70: 117-126.
8. Rana MW, Pothisiri V, Killiany DM, Xu XM. Detection of apoptosis during orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2001; 119: 516-521.
9. Wu CC, Lin JP, Yang JS, Chou ST, Chen SC, Lin YT, Lin HL, Chung JG. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca²⁺ productions and caspase-3 activation. *Mutat Res*, 2006; 601: 71-82.
10. Diercke K, Zingler S, Kohl A, Lux CJ, Erber R. Gene expression profile of compressed primary human cementoblasts before and after IL-1 β stimulation. *Clin Oral Investing* 2014; 18: 1925-1939.
11. Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, Kasai K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. *Eur J Orthod*, 2011; 33: 335-343.
12. Hatai T, Yokozeki M, Funato N, Baba Y, Moriyama K, Ichijo H, Kuroda T. Apoptosis of periodontal ligament cells induced by mechanical stress during t

- ooth movement. *Oral Dis*, 2001; 7: 287-290.
13. Asano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. IL-8 and MCP-1 induced by excessive orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. *Oral Dis*, 2011; 17:489-498.
14. Kikuta J, Yamaguchi M, Shimizu M, Yoshino T, Kasai K. Notch signaling induces root resorption via RANKL and IL-6 from hPDL cells. *J Dent Res*, 2015; 94: 140-147.
15. Kitagawa M, Tahara H, Kitagawa S, Oka H, Kudo Y, Sato S, Ogawa I, Miyaichi M, Takata T. Characterization of established cementoblast-like cell lines from human cementum-lining cells in vitro and in vivo. *Bone*, 2006; 39:1035–1042.
16. Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res*, 2006; 85:751-756.
17. Rodríguez-Enfedaque A, Delmas E, Guillaume A, Gaumer S, Mignotte B, Vayssière JL, Renaud F. zVAD-fmk upregulates caspase-9 cleavage and activity in etoposide-induced cell death of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 2012; 1823: 1343-1352.
18. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE,

- Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*, 2003; 11: 529-541.
19. Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodontal Res*, 2002; 37: 118-124.
20. Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res*, 2008; 11:143-155.
21. Szymczyk KH, Freeman TA, Adams CS, Srinivas V, Steinbeck MJ. Active caspase-3 is required for osteoclast differentiation. *J Cell Physiol*, 2006; 209: 836-844.
22. Yoshino T, Yamaguchi M, Shimizu M, Yamada K, Kasai K. TNF- α aggravates the progression of orthodontically-induced inflammatory root resorption in the presence of RANKL. *J hard Tis Biol*, 2014; 23: 155-162.
23. Kagayama M, Sasano Y, Mizoguchi I, Takahashi I. Confocal microscopy of cementocytes and their lacunae and canaliculi in rat molars. *Anat Embryol*, 1997; 195: 491-496.
24. Ayasaka N, Kondo T, Goto T, Kido MA, Nagata E, Tanaka T. Differences in the

- transport systems between cementocytes and osteocytes in rats using microperoxidase as a tracer. *Arch Oral Biol*, 1992; 37: 363-369.
25. Sasano Y, Maruya Y, Sato H, Zhu JX, Takahashi I, Mizoguchi I, Kagayama M. Distinctive expression of extracellular matrix molecules at mRNA and protein levels during formation of cellular and acellular cementum in the rat. *Histochem J*, 2001; 33: 91-99.
26. Matsuzawa H, Toriya N, Nakao Y, Konno-Nagasaka M, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I. Cementocyte cell death occurs in rat cellular cementum during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod*, 2017; 87: 416-422.
27. Kvam E. Scanning electron microscopy of tissue changes on the pressure surface of human premolars following tooth movement. *Scand J Dent Res*, 1972; 80: 357-368.

図および表

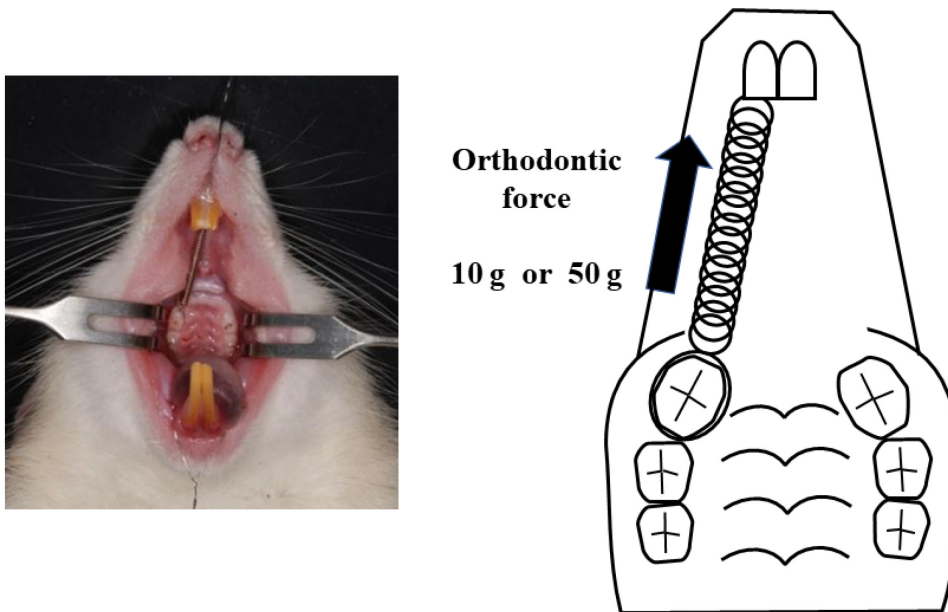


Fig 1.

In vivo における歯牙移動装置

上顎右側第一臼歯の移動を行うために、歯牙移動装置 (太さ: 0.005 inch, 直径: 1/12 inch, Accurate, Inc., Tokyo, Japan) をステンレススチールの結紮線 (太さ: 0.008 inch, Tomy International Inc. Tokyo, Japan) で結紮し, 上顎両側切歯にスーパーボンド® (Sun Medical Co, Shiga, JAPAN) を用い固定し 歯牙移動を再現した。対照 (以下, control) 群, 至適矯正力 (以下, 10 g) 群, 強い矯正力 (以下, 50 g) 群

の計 3 群に分けた。実験群のラットには、上顎右側第一臼歯にそれぞれ 10 g または 50 g の矯正力で設定されたコイルスプリングにより、近心方向に 1, 3, 5 および 7 日間の牽引を行った。

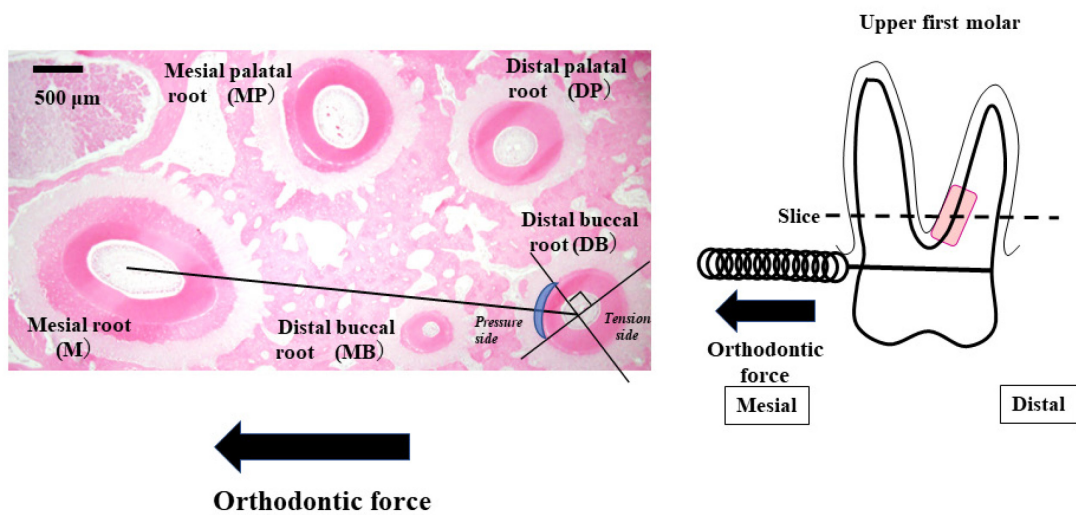


Fig 2.

In vivo における観察部位

上顎右側第一臼歯の近心 (Mesial; M) 根の中心と遠心頬側 (Distal buccal; DB) 根の中心とを結んだ線と直行する線とでなす領域の近心部 4 分の 1 の歯周組織を観察した。矢印は力の方向を示す。各染色の陽性細胞および歯根吸収は、分岐部から 300 μ m 根尖方向に位置した領域で圧迫側である DB 根の近心面にて検討した。なお、各陽性細胞の測定は実験期間における各領域の細胞数の割合を計測

した。

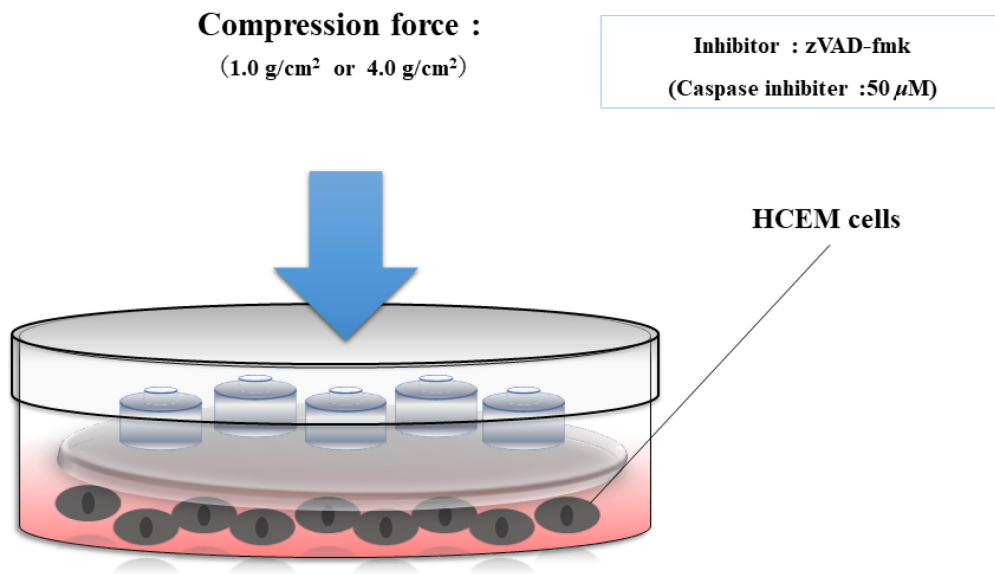


Fig 3.

In vitro における圧迫側モデル

培養したヒトセメント芽細胞様細胞 (HCEM) が near confluent に達したところで、カバーガラス上に分銅による圧迫力 (以下, CF) の負荷をかけた。細胞は 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 時間において, 1.0 g/cm² (OF 群) または 4.0 g/cm² (HF 群) の負荷を, control 群の細胞は CF を負荷せず, カバーガラス (0.032 g/cm²) のみ載せた。カ

スパーゼ 3, 8, nuclear factor κ -B ligand (RANKL) およびオステオプロテゲリン (OPG) 産生に対する HF および OF の効果を調べた。また, HECM の RANKL mRNA 発現に対する Z-ValAla-DL Asp-fluoromethylketone (以下, zVAD-fmk) の影響を検討した。

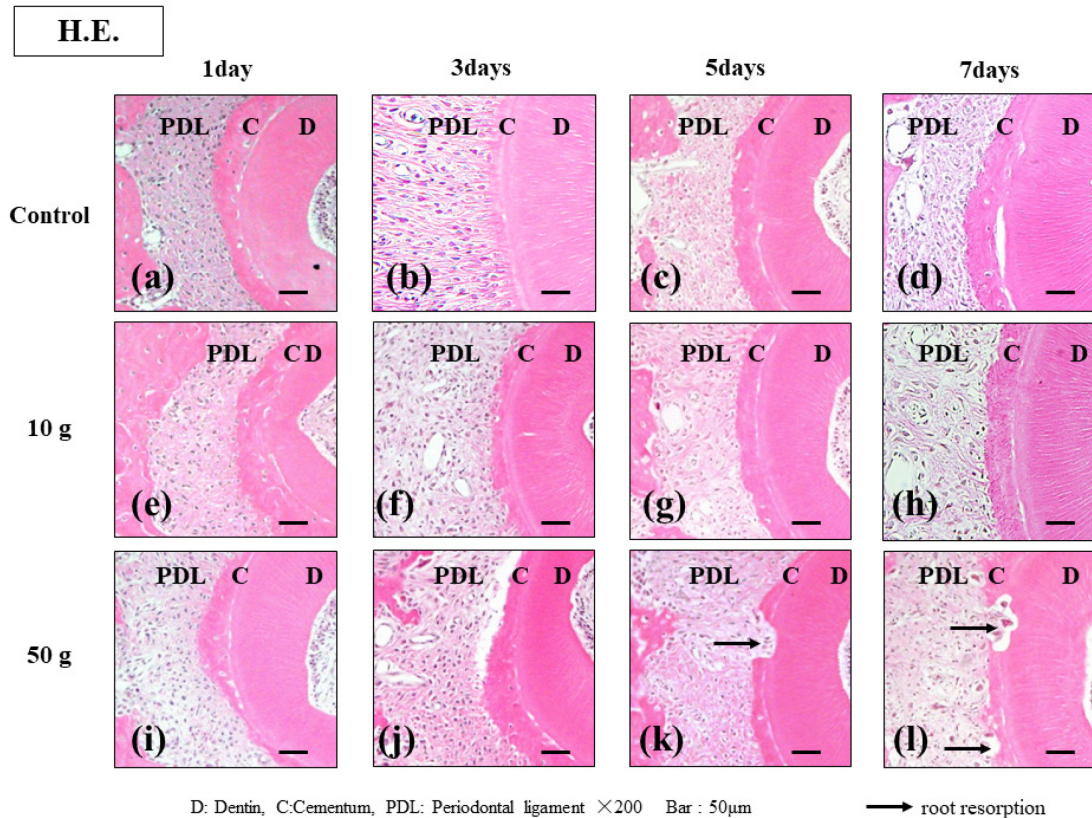


Fig 4.

病理組織学的染色結果 (H.E.染色, $\times 200$)

3 群の上顎右側第一臼歯遠心頬側根 (圧迫側) の病理組織像を示す。50g 群のセメント質表面の破歯細胞の発現は, 5 日目および 7 日目にて 10g および control 群より増加を認めた。PDL; periodontal ligament, C; cementum, D; dentin, →; root resorption, Scale bar = 50 μ m.

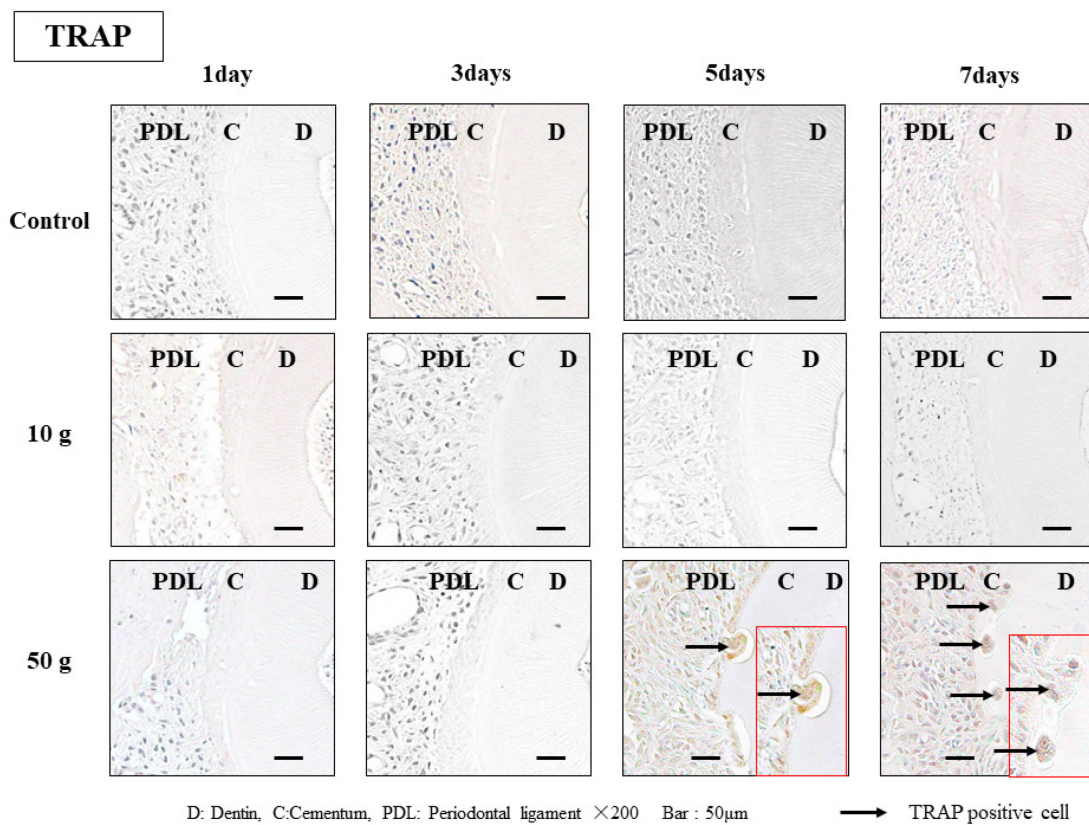


Fig 5.

免疫組織化学的染色結果 (TRAP, ×200)

50 g 群において、TRAP 陽性破歯細胞および歯根吸収窩が 7 日目の歯根表面に多数認められた。

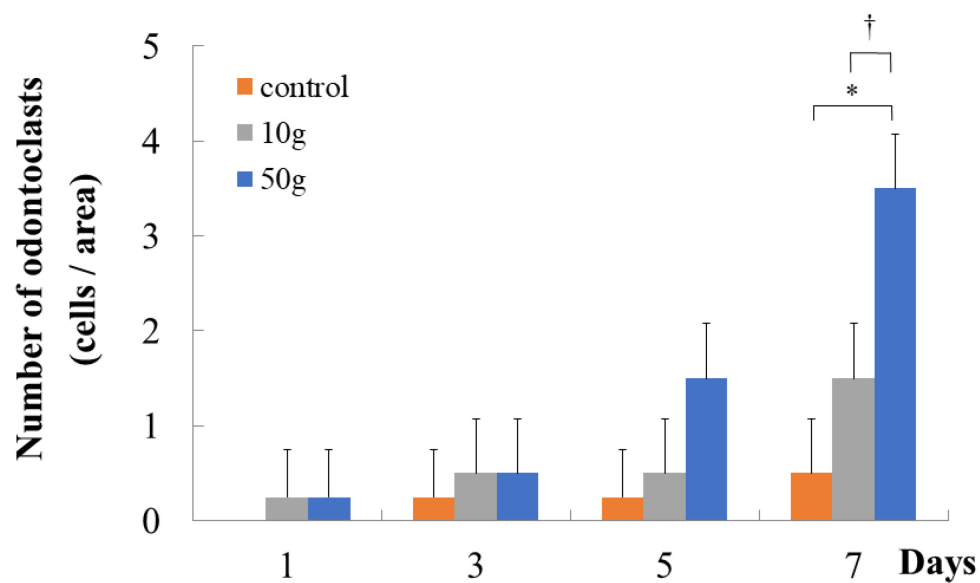


Fig 6.

TRAP 陽性破歯細胞数の 3 群比較

50 g 群における TRAP 陽性破歯細胞数は 7 日目にて 10 g 群と比較し有意に高値であった。

* $P < 0.01$, significant difference when compared with the control group

† $P < 0.01$, significant difference when compared with the 10 g group

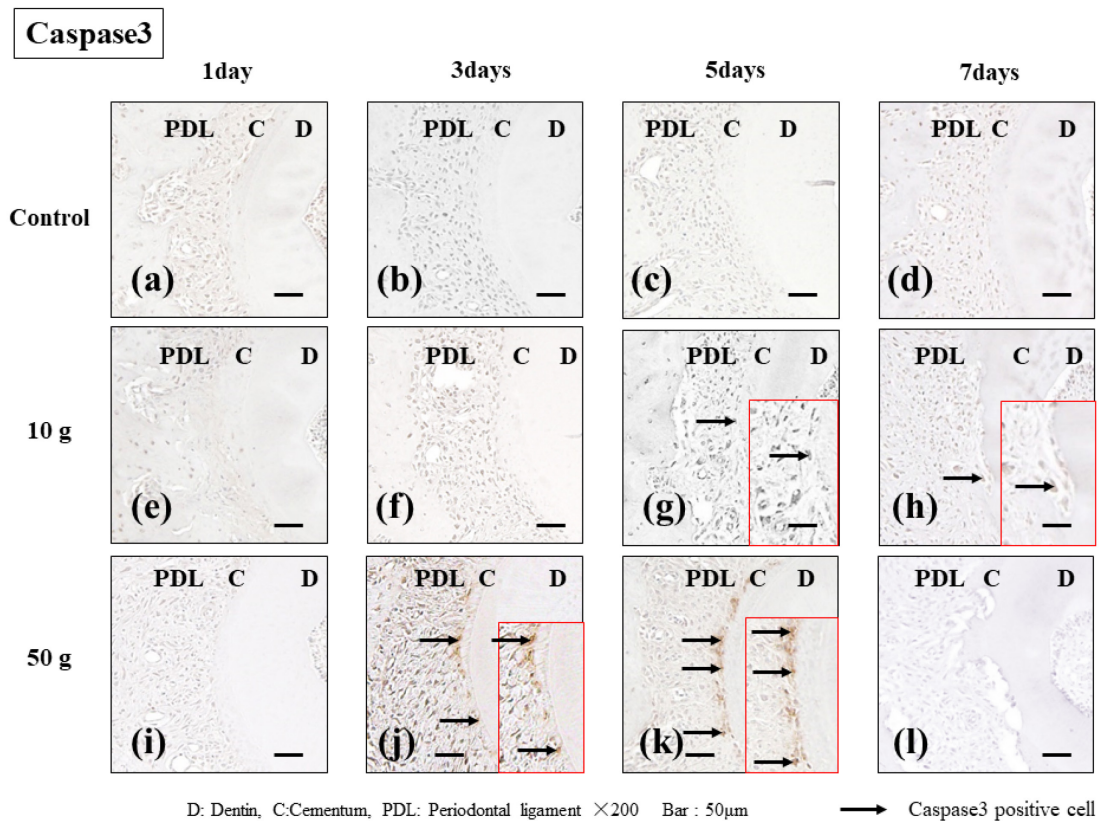


Fig 7.

免疫組織化学的染色結果 (caspase 3, ×200)

10g 群において、歯根表面のカスパーゼ 3 陽性細胞は 3 日目から 7 日目にかけて増加が認められた。50g 群の陽性細胞の数は 3 日目に増加し、5 日目にピークに達した。

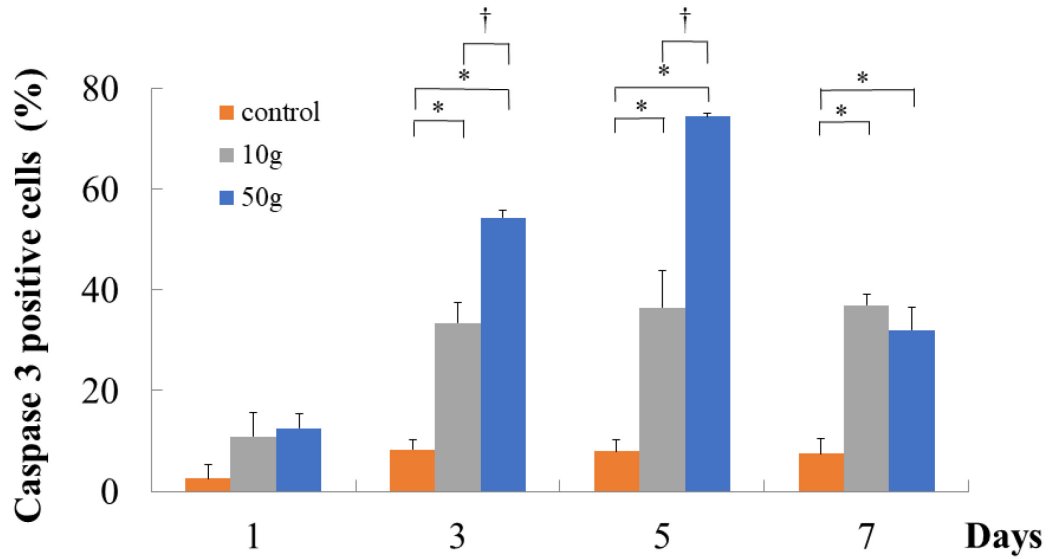


Fig 8

Caspase 3 陽性率の 3 群比較

3 日目から 7 日目の control 群と比較し 10g 群および 50g 群において有意な増加が認められた。さらに、カスパーゼ 3 の陽性細胞数は、3 日目および 5 日目の 10 g 群と比較し 50g 群において有意差が認められた。

* $P < 0.01$, significant difference when compared with the control group

† $P < 0.01$, significant difference when compared with the 10 g group

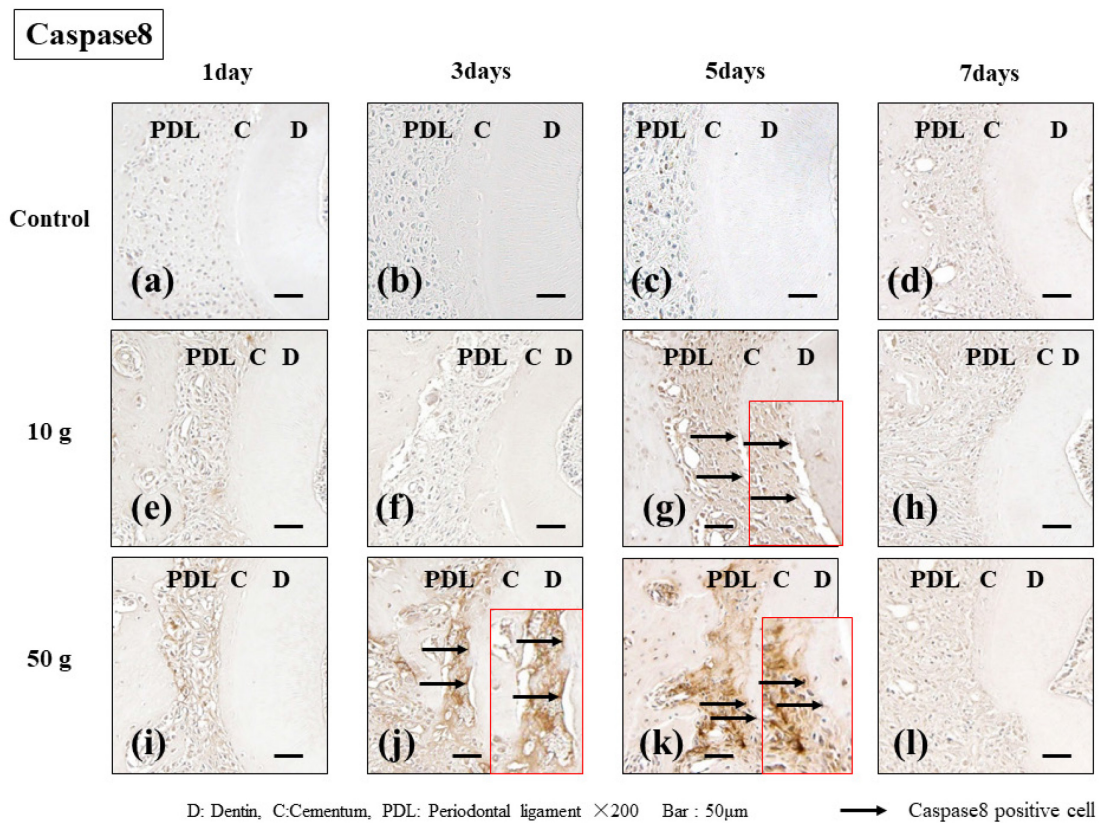


Fig 9.

免疫組織化学的染色結果 (caspase 8, ×200)

10g 群のカスパーゼ 8 の陽性細胞数は、5 日目においてピークに達した。50g 群では、カスパーゼ 8 陽性細胞は 1 日目において PDL 内に出現したが、カスパーゼ 3 および 8 陽性細胞の数は 3 日目に増加し、5 日目にピークに達した。

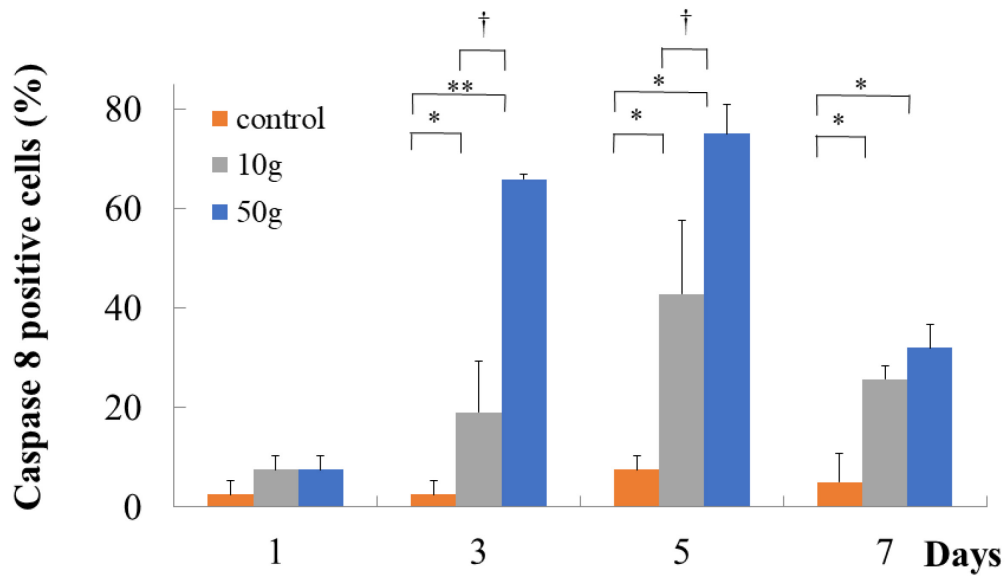


Fig 10.

Caspase 8 陽性率の 3 群比較

3 日目から 7 日目の control 群と比較し 10g 群および 50g 群において有意な増加が認められた。さらに、カスパーゼ 8 の陽性細胞数は、3 日目および 5 日目の 10 g 群と比較し 50g 群において有意差が認められた。

*P < 0.01, significant difference when compared with the control group

† P < 0.01, significant difference when compared with the 10 g group

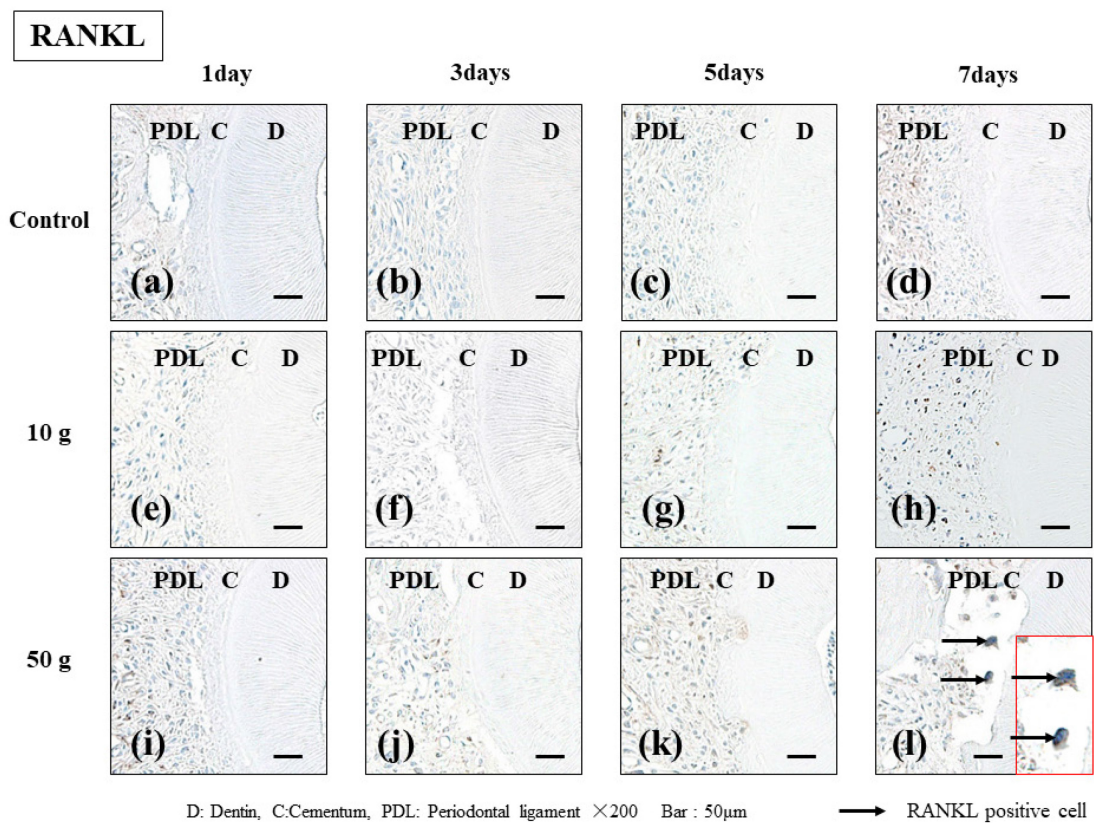


Fig 11.

免疫組織化学的染色結果 (RANKL, ×200)

RANKL 陽性細胞は 50g 群の 7 日目において歯根表面に認められた。

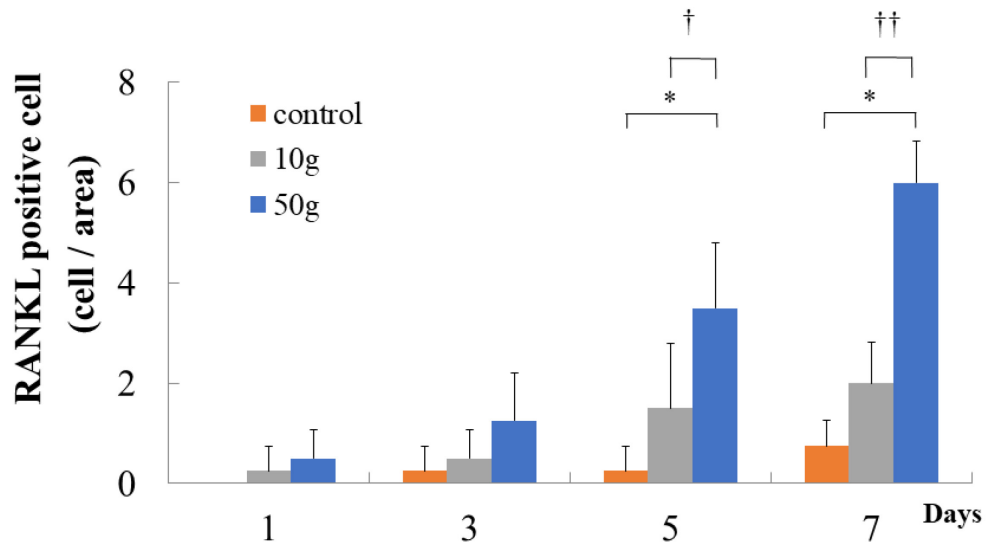


Fig 12.

RANKL 陽性細胞数の 3 群比較

RANKL 陽性細胞数は、7 日目の 50g 群において 10 g 群と比較し有意な増加を認めた。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significant difference when compared with the control group

† $P < 0.01$, significant difference when compared with the 10 g group

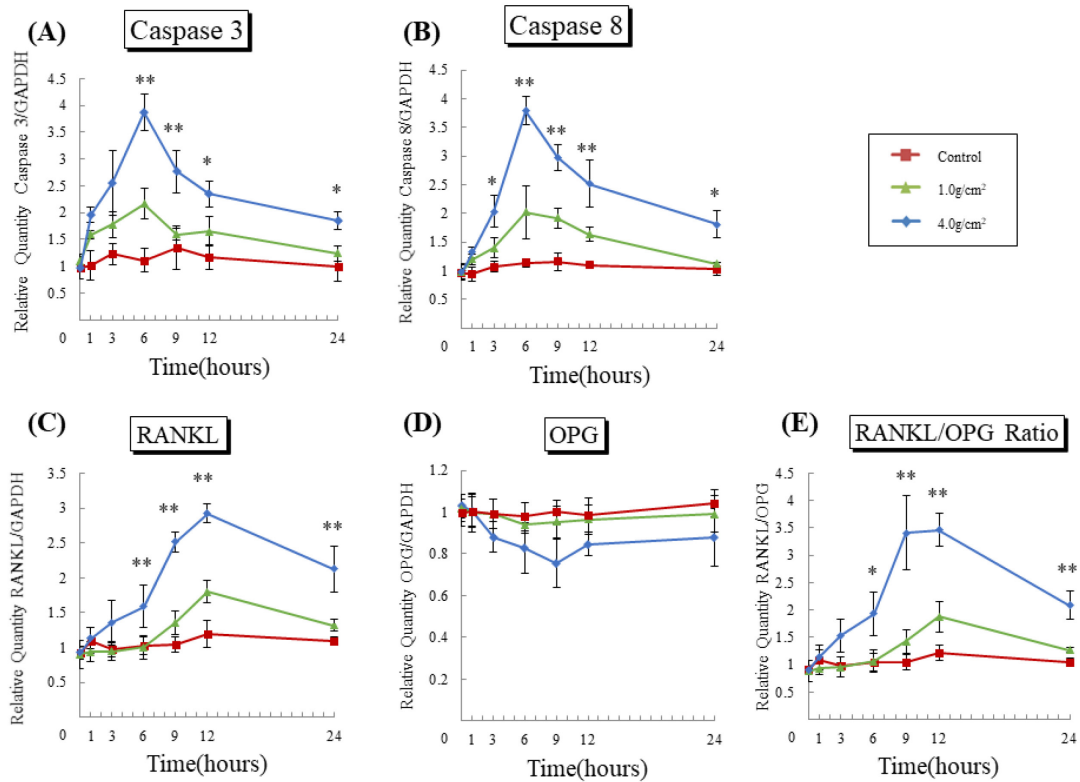


Fig 13.

カスパーゼ 3, 8, RANKL および OPG の mRNA 発現に対する CF の影響

カスパーゼ 3 および 8 の mRNA 発現は, HF 群において OF 群および control 群と比較し増加が認められた。HF 群におけるカスパーゼ 3 および 8 の mRNA 発現は 6 時間にかけて増加が認められた。RANKL の mRNA 発現は, HF 群では OF 群および control 群と比較し有意な増加が認められた。RANKL / OPG 比は, HF 群において 6, 9, 12 および 24 時間で OF 群より有意な増加が認められた。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, significantly different from the corresponding OF group.

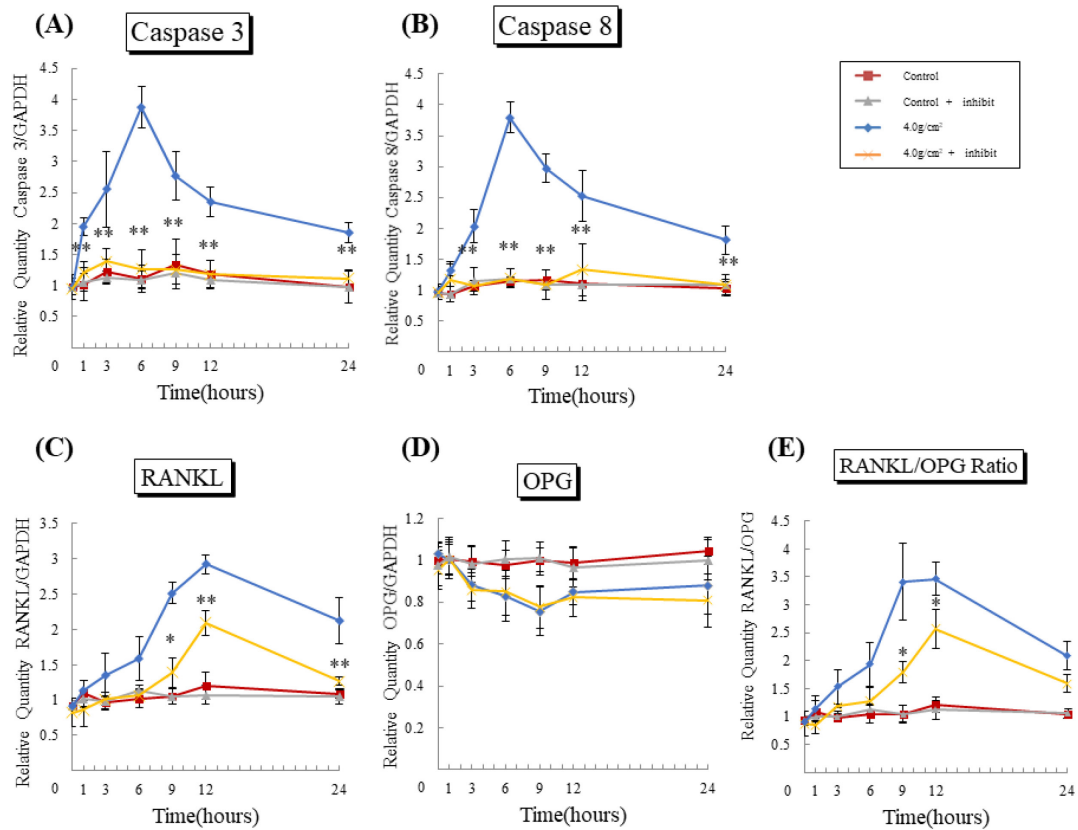


Fig 14.

阻害実験におけるカスパーゼ 3, 8, RANKL および OPG の mRNA 発現

カスパーゼ 3 および 8 の mRNA 発現は、実験期間を通して HI 群において HF 群と比較し有意な減少が認められた。HI 群においては、RANKL の mRNA 発現は増加を示したが、6 時間から 24 時間においては HF 群と比較し有意な減少が認められた。RANKL / OPG 比は、HI 群では HF 群と比較して 9 時間および 12 時間で有意な減少が認められた。HI 群では、HF 群と比較して 9 時間で約 57%、12 時間で約 40%の有意な減少が認められた。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, significantly different from the corresponding HF group.

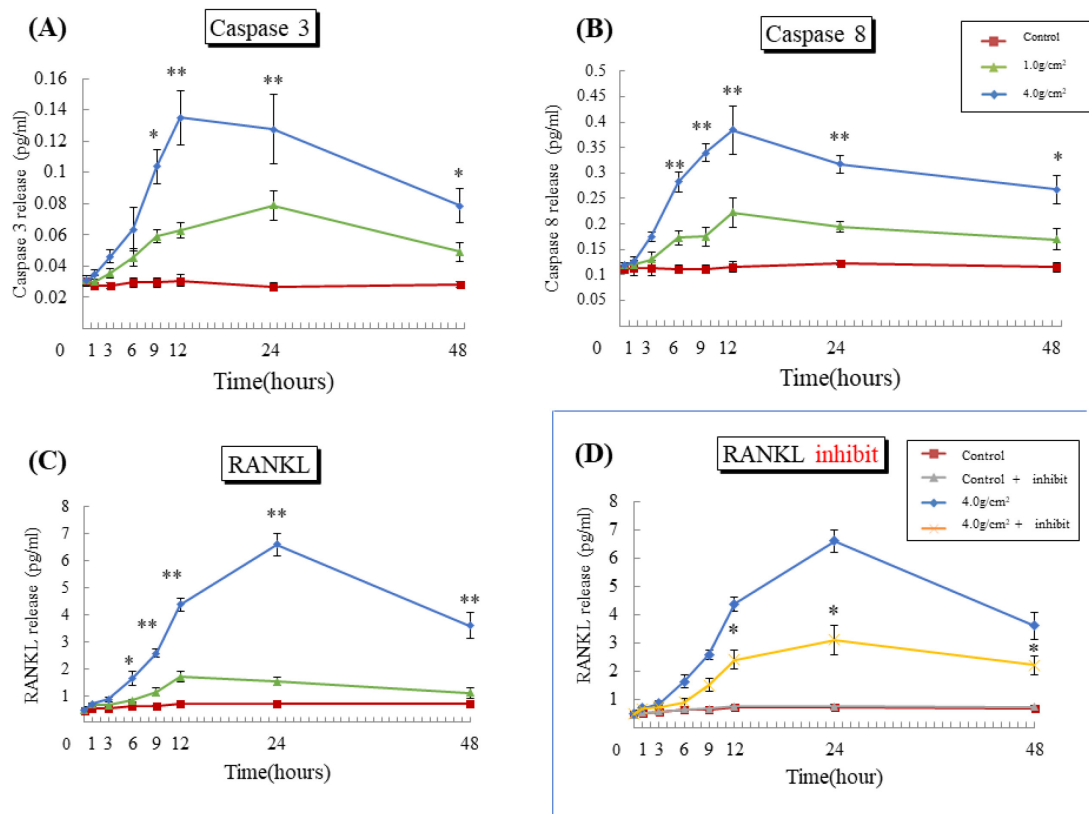


Fig 15.

ELISA 法におけるカスパーゼ 3, 8, RANKL および OPG のタンパク質発現

カスパーゼ 3 および 8 のタンパク質産生は, HF 群では OF 群および control 群と比較し, 有意な増加が認められた。RANKL のタンパク質産生は, HF 群では OF 群と比較して 24 時間において有意に増加が認められ, ピークに達したが, その後徐々に減少が認められた。また, HI 群では 9~24 時間において HF 群と比較し有意な減少が認められた。

(A-C) * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$; significantly different from the corresponding OF group.

(D) * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$; significantly different from the corresponding HF group.

1. TABLE LEGEND

Caspase 3	Fw: 5'-AAGGCAGAGCCATGGACCAC -3'
	Rv: 5'-CTGGCAGCATCATCATCCACACATAC -3'
Caspase 8	Fw: 5'-ATGAGCTGGGCTGAAGCAAAC -3'
	Rv: 5'-AAGACCTCAATTCTGATCTGCTCAC -3'
RANKL	Fw: 5'-TGGATGCCTTGAATAATAAGCAGGA -3'
	Rv: 5'-AATTTGCGGCACTTGTGGAA -3'
OPG	Fw: 5'-AGCTGCAGTACGTCAAGCAGGA -3'
	Rv: 5'-TTTGCAAACCTGATTTGCTCTGG -3'

Table 1.

real-time PCR の cDNA 配列設計

カスパーゼ 3, 8, RANKL, OPG および GAPDH の PCR プライマーをそれぞれの cDNA 配列を参照して設計した。