

矯正学的歯の移動時に生じる歯根吸収における Wnt5a シグナルの影響について

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

後藤 瞳

(指導：葛西 一貴 教授)

本稿は2つの参考文献で構成されています。主となる参考文献“*Heavily induced root resorption stimulates Wnt5a expression in cementoblasts*”. (*International Journal of Oral-Medical Sciences* に掲載予定) および副となる参考文献“*Wnt5a stimulates bone resorption during orthodontic tooth movement*”. (*International Journal of Oral-Medical Sciences* に掲載予定) をまとめたものである。

Abstract

Wnt signaling is valuable protein network involved in bone metabolism, however, its relationship in bone resorption and root resorption during orthodontic treatment is currently unknown. This study investigated the relation of compression force (CF) to Wnt5a expression from human periodontal ligament (PDL) cells and human cementoblast-like (HCEM) cells, and using the experimental rat tooth movement model.

In vitro, Wnt5a gene expression was analyzed by qRT-PCR in PDL and HCEM cells which added compression force, 1.0 g/cm² or 4.0 g/cm². *In vivo*, 10 g or 50 g of orthodontic force was added to the maxillary first molar of male rat for seven days. The productions of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), receptor activator of nuclear factor κ -B ligand (RANKL), and Wnt5a protein in rats alveolar bone were assessed by an immunohistochemical analysis.

In the *in vitro* study, CF-1.0 g and CF-4.0 g groups increased Wnt5a production in hPDL cells more than control group. Moreover, CF-1.0 g group tended to be higher than CF-4.0 g group. On the other hands, CF-4.0 g group increased Wnt5a production in HCEM cells more than both CF-1.0 g group and control group.

Resorption lacunae of bone with multinucleated cells in the CF-10 g group under experimental tooth movement conditions *in vivo*. Moreover, RANKL and Wnt5a

immunoreactivity was detected in the PDL and alveolar bone tissue. In the CF-50 g group, resorption lacunae of cementum RANKL and Wnt5a expressions were detected in PDL and cement tissues. These results indicate that Wnt5a is expressed in the periodontal ligament with light force, and it induces bone resorption due to osteoclast cells expression on the pressure side during orthodontic tooth movement. On the other hand, Wnt5a was expressed in the cementum with heavy force, and it induced root resorption due to osteoclast cells expression.

緒 言

歯根吸収は矯正治療中に生じる偶発症の一つであるが、予測が困難なため、その原因について、様々な仮説が提唱されている。患者本人の要因として、アレルギーや慢性喘息などの疾患があること¹⁾、歯根の形態不良やセメント質の硬さ²⁾などがあり、治療の要因として強い矯正力やジグリングの負荷³⁾、治療期間の長期化⁴⁾などが挙げられるが、未だそのメカニズムは解明されていない。

矯正治療に伴う円滑な歯の移動には圧迫側と牽引側における歯槽骨の代謝が重要であると考えられる。矯正学的歯の移動 (Orthodontic tooth movement : OTM) は、歯根膜 (Periodontal ligament : PDL) および歯槽骨など歯周組織の連続的な生物学的プロセスによって引き起こされる⁵⁾。また、圧迫側の歯槽骨におけるリモデリングは、PDL 周囲の破骨細胞前駆細胞、骨芽細胞前駆細胞の発現および均衡した活性化が必須である⁶⁾。

シグナル伝達分子である Wnt は分泌タンパク質であり、19 種類のリガンドおよび、LRP5/6 複合体、Ror 複合体の異なる二つの受容体複合体が同定されている⁷⁾。これら受容体と Wnt タンパク質の結合は、 β カテニン依存性カノニカル経路 (古典的経路) と β カテニン非依存性カノニカル経路 (非古典的経路) の 2 種類の伝達経路を活性化する⁸⁾。古典経路では Wnt3a と LRP5/6 の結合により骨形成の活性化、非古典経路では Wnt5a と Ror2 の結合により破骨前駆細胞の RANK

形成の促進が起こるなど、骨代謝に関連するシグナル伝達としての役割を担っている報告が多く挙げられている⁹⁾。さらに、Wnt5a は骨代謝異常疾患である骨粗鬆症や関節リウマチなどの治療薬開発のため、研究が進められている¹⁰⁾。Wnt シグナル伝達は細胞増殖、細胞形態、細胞運動及び細胞分化を調整し、生物の発達を制御するなど、哺乳類にも認められている。歯に関連しては、初期発生や形態形成、歯槽骨、セメント質ならびに歯根膜を含めた歯周組織の恒常性を維持するうえで重要なシグナルであると考えられている^{11, 12)}。しかしながら、矯正学的歯牙移動時の圧迫側の歯根膜における Wnt シグナルの役割は解明されていない。

そこで本研究では Wnt シグナルに着目し、*in vitro* における圧迫側モデルにおいてヒト歯根膜線維芽 (hPDL) 細胞およびヒトセメント芽細胞様 (HCEM) 細胞での Wnt5a の遺伝子発現を Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR 法) にて検討し、*in vivo* においてはラット歯牙移動モデルを用い Wnt5a, RANKL の発現を免疫組織化学染色にて、Wnt5a-Ror2 及び RANK-RANKL の発現を免疫蛍光二重染色にて検討し、矯正治療中に生じる歯牙移動および歯根吸収における Wnt シグナルの関連を調べた。

材料および方法

A. *In vitro* 研究

1) 細胞培養

hPDL 細胞は研究内容のインフォームドコンセントを十分に行い同意が得られた患者から、矯正治療のため抜去された第一小臼歯の歯根膜組織を摘出し培養を行った。細片した組織を 35 mm の組織培養ディッシュにカバーガラスで固定し、10%ウシ胎児血清 (FBS), 100 µg/ml ペニシリン G ナトリウム, 100 µg/ml ストレプトマイシン, 0.25 µg/ml アムホテリシン B 含有 α-MEM 培地中で 5~7 代目まで継代した。hPDL 細胞の採取にあたっては、日本大学松戸歯学部倫理委員会 (承認番号第 EC18-15-027-1 号) の承認を得た。

HCEM 細胞は高田隆教授 (広島大学) から享受して頂いた。HCEM の培養は、kitagawa ら¹³⁾ が確立した方法を参考にし、10%ウシ胎児血清 (FBS), 100 µg/ml ペニシリン G ナトリウム, 100 µg/ml ストレプトマイシン, 0.3 µg/ml アムホテリシン B および 50 µg/ml 硫酸ゲンタマイシンを含有した α-MEM 培地を用いて行った。

2) 圧迫側モデル

hPDL 細胞および HCEM 細胞を 100 mm ディッシュで培養後、直径 80 mm MICRO COVER GLASS (MATSUNAMI GLASS IND.LTD) を乗せ、さらに分銅を

用い、弱い矯正力モデルとして 1.0 g/cm²、強い矯正力モデルとして 4.0 g/cm² の荷重を負荷した¹⁴⁾。矯正力を負荷せず、カバーガラスのみ乗せたものを対照群 (control 群) とした。各群 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間を対象とした (図 1)。

3) qRT-PCR 法

RNeasy® Mini kit (QIAGEN Co. Maryland, USA) で各群 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間の total RNA を抽出し、PrimeScript™ RTreagent Kit (TAKARA Co. Siga. Japan) にて qRT-PCR 法を行い、SYBER Green 1 を用いたインカレーター法にて、Wnt5a の遺伝子発現の検討を行った。

プライマー

Wnt5a : F : 5'-TTACCACTGCAACTATTGCACCTC-3'

R : 5'-CACAATGAACCTTTAGTTTCCAACC-3'

GAPDH: F : 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

R : 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

4) 統計処理

実験群と対照群との有意差の検定は、Mann-Whitney U 検定を用いて行った。

B. *In vivo* 研究

1) 実験動物および飼育条件

実験動物には6週齢のWistar系雄性ラットを用いた。飼育管理は日本大学松戸歯学部実験動物センターのSPFクリーンラック内で行い、固形試料、粉末試料、飲料水ならびにゲージ内はすべて滅菌したものを使用した。実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理に関する指針（動物実験承認番号第AP16MD013-1号）に従った。

2) 実験的歯牙移動モデル

ラットに3種混合麻酔薬（塩酸メデトミジン，ミダゾラム，酒石酸ブトルファンール）を腹腔内注射した。浅野らの方法に従い¹⁵⁾，全身麻酔下にて右側上顎第一臼歯にニッケルチタンコイルスプリング（太さ：0.005 インチ，直径 1/12 インチ，accurate, Inc., Tokyo, Japan）をステンレススチールの結紮線（太さ：0.008 インチ，Tomy International. Inc. Tokyo, Japan）で結び，コルスプリングのもう一方を前歯と結んで当該臼歯の近心移動を行った（図2）。矯正力を負荷しない対照（以下，control）群，弱い矯正力（以下，10 g）または強い矯正力（以下，50 g）

を負荷した群の3群に分類し、歯の移動は7日間行った。

3) 標本作製

実験的歯牙移動7日後、ラットを3種混合麻酔薬で深麻酔し、生理食塩水と10%中性緩衝ホルマリンで灌流固定した。上顎骨のみ摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて4℃で24時間浸漬固定後、試料を10%EDTA溶液にて室温で1か月脱灰処理を行った。脱灰した試料は流水洗浄後、通法に従ってパラフィン包埋ブロックを作製した。当該臼歯を根分岐部から300 μmの範囲で横断方向に厚さ4 μmで連続的に薄切し、各種染色を行った。

4) 組織化学染色および免疫組織化学染色

ヘマトキシリン・エオジン重染色(以下、H.E.染色)及び免疫組織化学染色を
通法に従い行った。免疫組織化学染色の一次抗体には polyclonal ヤギ抗
tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
MA, USA: 希釈倍率 1:100), polyclonal ヤギ抗 receptor activator of NF-κB ligand
(RANKL) 抗体 (Bioworld Technology, Inc.: 希釈倍率 1:100), polyclonal ウサ
ギ抗 Wnt5a 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, TX, USA: 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、各切片の加熱処理を行った。

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、TRAP および RANKL に Histofine Simple Stain MAX-Po (G) kit (Nichirei, Co., Tokyo, Japan) を使用し、Wnt5a に Histofine Simple Stain MAX-Po (R) kit (Nichirei, Co., Tokyo, Japan) を使用した。各切片は TBS で洗浄し、3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB) (TAKARA BIO INC.) 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。

観察部位は kikuta ら¹⁶⁾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膜周囲を光学顕微鏡下 200 倍にて観察し、茶褐色に染色された細胞を陽性とした。

5) TRAP, RANKL および Wnt5a の陽性細胞数

陽性細胞数の比較検討は ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて行った。歯根膜の幅 420 μm , 歯根膜の面積 60337 μm^2 以上を関心領域とし、免疫染色陽性領域および細胞核領域それぞれの 2 値化画像を作成し 2 枚の画像を加算した。明度の計測を行い、2 領域が隣接している場

所を陽性細胞と判断し領域内の陽性細胞数をカウントした。各群の平均値を算出し、陽性細胞数を比較検討した。

6) Wnt5a-Ror2, RANK-RANKL の免疫蛍光二重染色

組織切片は、免疫組織化学染色と同じ方法で作製した。切片はキシレンで脱パラフィンし、Hirate ら¹⁷⁾の方法に従って染色した。TBS で洗浄後、自家蛍光染色抑制のため vector true View autofluorescence quenching kit (Vector laboratories, INC.) を使用した。続いて polyclonal ウサギ抗 Ror2 抗体 (Biorbyt Ltd.; 希釈倍率 1:100), polyclonal ウサギ抗 RANKL 抗体 (Bioworld Technology, Inc.; 希釈倍率 1:100) で1時間インキュベートした。次に切片をヤギ抗ウサギ IgG Alexa Fluor®568 (赤色) (Invitrogen, Co, CA, USA; 希釈倍率 1:100) にて室温で1時間インキュベートした。

Alexa Fluor®488 (緑色) (Invitrogen, Co, CA, USA) を Polyclonal ウサギ抗 Wnt5a 抗体 (Bioss Co.; 希釈倍率 1:100) および polyclonal ウサギ抗 RANK 抗体 (Bioss antibodies; 希釈倍率 1:100) に Zeon Rabbit IgG Labeling Kit にてラベリングし、室温で1時間インキュベートした。

最後に、4, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI)を有する ProLong®ゴールド退色試薬(Invitrogen, Co, CA, USA)で対比染色し、蛍光顕微鏡 (Olympus,

Tokyo, Japan) で観察した。

結 果

A. *In Vitro* 研究

1) hPDL 細胞における CF による Wnt5a-mRNA の発現の変化

qRT-PCR を使用し、CF を 1, 3, 6, 9, 12 および 24 時間負荷した hPDL 細胞における Wnt5a の mRNA 発現を測定した。CF 群 (1.0 g/cm² 群, 4.0 g/cm² 群) において、Wnt5a の mRNA 発現は、対照群に比べて高い傾向を示した。また、CF-1.0 g 群の Wnt5a の mRNA 発現量は CF-4.0g 群に比べ、高く推移した (図 3)。

2) HCEM 細胞における CF による Wnt5a-mRNA の発現の変化

CF-4.0 g 群の Wnt5a の mRNA 発現は、1, 3, 6 時間で対照群に比べ有意な増加を示し、その後減少した。対照的に、CF-1.0 g 群および control 群では、1, 3, 6 時間で下降傾向を示した (図 4)。

B. *In Vivo* 研究

1) 実験期間中の体重

実験群のラットの体重は、歯科矯正装置の適用後 1 日目に一時的に減少した

が、その後回復した。体重に関して、2つの群間で有意差は観察されなかった(データ未公開)。

2) 実験的歯の移動における歯周組織周辺の組織学的変化 (H.E.染色)

実験的歯の移動7日後の組織像において、control群の歯周組織は、比較的密な結合組織および線維芽細胞で構成されていた。歯槽骨表面は比較的滑らかで、単核および多核の細胞は認められなかった(図5A)。CF-10g群では歯根表面に著変はなかった一方、歯槽骨表面には不規則な吸収窩が多数認められ、窩内には単核及び多核の細胞が観察された(図5B)。CF-50g群では、歯根表面は波状に吸収し、吸収窩に接して多核の細胞が認められた。歯根吸収窩はセメント質及び象牙質まで及んでいた(図5C)。

3) TRAP の免疫組織化学的所見

実験的歯牙移動7日後の組織像において、Control群では、TRAP陽性多核細胞は認められなかった(図5D)。CF-10g群では、歯槽骨表面に約2か所の骨吸収窩が認められ、窩内にはTRAP陽性多核細胞が観察された(図5E)。対照的に、CF-50g群では、TRAP陽性の多核細胞が歯根吸収窩に接して観察された(図5F)。

4) Wnt5a および RANKL のタンパク質発現

実験的歯牙移動7日後の組織像において、Control群では、7日目にWnt5aおよびRANKL陽性細胞がわずかに散見された。(図5Gおよび5J)。CF-10g群では、歯槽骨表面に骨吸収窩が認められ、窩内にWnt5aおよびRANKL陽性細胞が観察された(図5Hおよび5K)。CF-50g群では、Wnt5aおよびRANKL陽性細胞が歯根吸収窩に接して観察された(図5Iおよび5L)。

5) TRAP, Wnt5a および RANKL 陽性細胞の数の定量的評価

CF-50g群のTRAPおよびRANKLの陽性細胞数は、CF-10g群およびcontrol群より有意に増加した。Wnt5a群では、CF-50g群とCF-10g群の陽性細胞数はcontrol群よりも有意に増加した($p < 0.05$) (図6)。

6) RANK-RANKL および Wnt5a-Ror2 の免疫蛍光二重染色

RANK-RANKL および Wnt5a - Ror2 に対する免疫蛍光二重染色を用いて hPDL 細胞およびセメント質における免疫反応性を調べた。

CF 負荷 7 日後、CF-10g 群では RANK- (緑色 : 図 7A), RANKL- (赤色 : 図 7B), Wnt5a- (緑色 : 図 7G) および Ror2- (赤色 : 図 7H) , RANK-RANKL (黄色 : 図 7C)

および Wnt5a - Ror2 (黄色 : 図 7I) 陽性細胞は線維芽細胞および多数の骨吸収窩内の多核細胞で蛍光を示した。また, CF-50 群では RANK- (緑色 : 図 7D), RANKL- (赤色 : 図 7E), Wnt5a- (緑色 : 図 7J) および Ror2- (赤色 : 図 7K) , RANK-RANKL (黄色 : 図 7F) および Wnt5a - Ror2 (黄色 : 図 7L) 陽性細胞は, 線維芽細胞および多数の歯根吸収窩内の多核細胞で蛍光を示した。

Control 群では, RANK-RANKL (黄色 : 図 7M) および Wnt5a - Ror2 (黄色 : 図 7N) 陽性細胞は歯槽骨に沿ってわずかに散見された。

考 察

Kim ら¹⁸⁾ は Wnt シグナル伝達が骨刺激シグナル伝達経路であると報告している。Baron ら¹⁰⁾ は, Wnt シグナル伝達が骨量の調節に重要であることを示した。さらに, Takada らによる研究¹⁹⁾ では, マウスの Wnt5a 遺伝子 (Wnt5a +/- マウス) における単一の対立遺伝子の欠損が, 低骨量表現型をもたらし, さらに脂肪生成の増加を示したことを示した。Lim ら¹²⁾ は, PDL の正常な骨形成性は Wnt シグナル伝達に依存すると報告した。Zhong らは Wnt シグナル伝達は, アルカリフォスファターゼ, オステオカルシンなどの骨形成因子の発現を誘導すると報告した²⁰⁾。Isogai ら²¹⁾ は, 矯正学的歯の移動 (OTM) 中に, CF-10 g 群での歯周組織の牽引側に Wnt5a 発現が観察されたことを実証した。これは,

Wnt5a が OTM 中の PDL 代謝および歯槽骨形成に関与していることを示している。

OTM 中に強い矯正力または弱い矯正力によって誘導された Wnt5a に起因する歯根および骨吸収機構を解明するために、本実験では Asano ら¹⁵⁾ が示した方法に従って *in vitro* の CF モデルを用い、hPDL 細胞および HCEM 細胞における Wnt5a 発現を検討した。PDL 細胞に CF (1.0 g/cm², 4.0 g/cm²) を適用すると、Wnt5a の mRNA 発現は対照群に比べ高い傾向を示した。また、CF-1.0 g 群は対照群、CF-4.0 g 群より絶えず高値を示した (図 3)。一方、HCEM 細胞における Wnt5a の mRNA 発現量は hPDL 細胞とは対照的に CF-4.0 g 群において CF 負荷後 6 時間まで CF-1.0 g 群よりも高値を示し、その後減少した (図 4)。

動物実験モデルにおいては強い矯正力または弱い矯正力を適用し圧迫側における歯周組織の反応を観察した。Wnt5a の発現は、弱い矯正力を受けたラット PDL で認められた一方、強い矯正力ではセメント質吸収窩において発現が認められた (図 5 および図 7)。

Nakashima ら²²⁾ は、骨吸収における Wnt シグナル伝達と機械的ストレスとの関係について、Wnt5a による RANK 発現の増大が骨細胞を含む骨芽細胞系列細胞から分泌される RANKL に応答して破骨細胞形成に重要な役割を果たすことを示した。Maeda ら²³⁾ は骨芽細胞と破骨細胞前駆体との間の Wnt5a / Ror2 /

JNK クロストークシグナル伝達が、破骨細胞分化および骨吸収を増強し、Wnt5a / Ror2 シグナル伝達による破骨細胞形成の促進を示唆している。本実験の結果およびこれらの知見は、破骨細胞形成が矯正力を負荷された圧迫側の hPDL 細胞または HCEM 細胞における Wnt5a 発現の増加によって活性化されることを示唆する。

Huynh らは歯根吸収とセメント質との関係について、セメント芽細胞が破骨細胞形成を誘導する能力を有することを実証し²⁴⁾、さらに、Diercke らは、ヒトセメント芽細胞による RANKL の IL-1 β 依存性誘導を示した²⁵⁾ ことから、OTM 中に発生する歯根吸収は強い矯正力に反応した HCEM 細胞において Wnt5a 発現が増大することで、惹起される可能性が考えられる。

興味深いことに、Wnt5a 発現は HCEM 細胞および PDL 細胞において異なる応答を示した。PDL 細胞は弱い矯正力に反応し、歯の動きに伴う歯槽骨の再吸収を刺激する一方、HCEM 細胞は強い矯正力に反応し、歯根吸収を惹起した。

これらの結果は、Wnt5a シグナル伝達において、PDL 細胞が破骨細胞形成に関与し、セメント芽細胞がセメント質 (歯根) 吸収に関与する可能性があることを示唆している。

結 論

矯正学的歯の移動時における Wnt5a シグナル発現の影響を検討したところ、以下の結論を得た。

1. 弱い矯正力を加えると、ヒト歯根膜線維芽細胞では Wnt5a の遺伝子発現量が増加し、骨吸収が認められた。
2. 強い矯正力を加えると、セメント芽細胞では Wnt5a の遺伝子発現量が増加し、歯根吸収が認められた。
3. 免疫組織化学染色および免疫蛍光二重染色にて、弱い矯正力では歯槽骨吸収側に、強い矯正力では歯根吸収側に Wnt5a 発現を認めた。

これらの結果から矯正学的歯の移動時、圧迫側において弱い力では Wnt5a が歯根膜内に発現し、破骨前駆細胞の RANK 発現が促進され、歯槽骨周囲の破骨細胞が増加することで骨吸収が発生した一方、強い力では Wnt5a がセメント質に発現し破骨前駆細胞の RANK 発現が促進され、歯根周囲の破歯細胞が増加することで歯根吸収が起こる可能性が示唆された。

参考文献

1. Shimizu M, Yamaguchi M, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K: Interleukin-17/T-helper 17 cells in an atopic dermatitis mouse model aggravate

- orthodontic root resorption in dental pulp. *Eur J Oral Sci*, 121(2):101-110, 2001.
2. Yamaguchi M, Yao-Umezawa E, Tanimoto Y, Shimizu M, Kikuta J, Hikida T, Takahashi-Hikida M, Horihata S, Suzuki K, Kasai K: Individual Variations in the Hardness and Elastic Modulus of the Human Cementum. *Journal of Hard Tissue Biology*. 25(4): 345-350, 2016.
 3. Brezniak N, Wasserstein A: Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part II: The clinical aspects. *Angle Orthod*, 72(2):180-184, 2002.
 4. 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*, 20(4):427-434, 1998.
 5. Pavlin D, Dove SB, Zadro R and Gluhak-Heinrich J: Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model: Effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int*, 67: 163-172, 2000.
 6. Krishnan V, Davidovitch Z: Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 129: 469 e1-32, 2006.
 7. Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y: Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med*, 91(1):15-23, 2013.
 8. Dale TC: Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J*,

329(2):209-223, 1998.

9. Yang T, Zhang J, Cao Y, Zhang M, Jing L, Jiao K, Yu S, Chang W, Chen D, Wang M: Wnt5a/Ror2 mediates temporomandibular joint subchondral bone remodeling. *J Dent Res*, 94(6):803-812, 2015.

10. Baron R, Kneissel M: WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*, 19(2):179-192, 2013.

11. Tamura M, Nemoto E, Sato MM, Nakashima A, Shimauchi H: Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. *Front Biosci (Elite Ed)* , 2:1405-1413, 2010.

12. Lim WH, Liu B, Cheng D, Williams BO, Mah SJ, Helms JA: Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *J Periodontal Res*, 49(6):751-759, 2014.

13. 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.

14. 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.

15. 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*, 17(5):489-498, 2011.

16. 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*. 94(1):140-147, 2015

17. Hirate Y, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Effects of Relaxin on Relapse After Experimental Tooth Movement in Rats. *Connective Tissue Research*, 53(3):207-219, 2012.

18. Kim JB, Leucht P, Lam K, Luppen C, Ten Berge D, Nusse R, Helms JA: Bone regeneration is regulated by wnt signaling. *J Bone Miner Res*, 22: 1913-1923, 2007.

19. Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S: A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol*, 9: 1273-1285, 2007.

20. Zhong Z, Zylstra-Diegel CR, Schumacher CA, Baker JJ, Carpenter AC, Rao S, Yao W, Guan M, Helms JA, Lane NE, Lang RA, Williams BO: Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2197-2204, 2012.

21. Isogai N, Yamaguchi M, Kikuta J, Shimizu M, Yoshino T, Hikida T, Takahashi M, Goseki T, Kasai K: Wnt5a Stimulates the Bone Formation in Tension Side during

Orthodontic Tooth Movement. *Int J Oral-Med Sci*, 13(3): 120-127, 2015.

22. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H: Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*, 17: 1231-1234, 2011.

23. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N: Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med*, 18(3):405-412, 2012.

24. Huynh NC, Everts V, Pavasant P, Ampornaramveth RS: Interleukin-1 β induces human cementoblasts to support osteoclastogenesis. *Int J Oral Sci*, 9(12):1-8, 2017.

25. Diercke K, Kohl A, Lux CJ, Erber R. IL-1 β and compressive forces lead to a significant induction of RANKL-expression in primary human cementoblasts. *J Orofac Orthop*. 73(5):397-412, 2012.

図および表

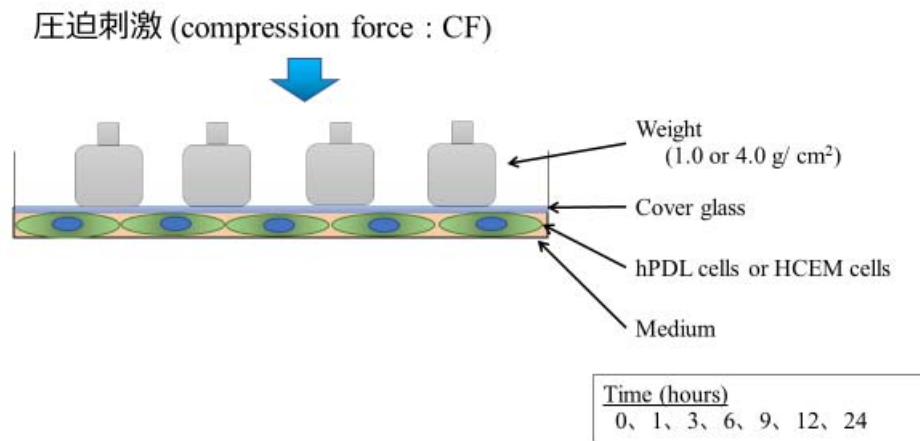


図1 *In vitro* での圧迫力 (CF) モデル

ヒト歯根膜線維芽細胞およびヒトセメント芽細胞様細胞を、コンフルエントになるまで培養した後、カバーガラスを上に置き、異なる力 (1.0 または 4.0 g/cm²) が加わるよう分銅を用いて圧迫した。CF に対する Wnt5a の遺伝子発現量の変化を調べた。

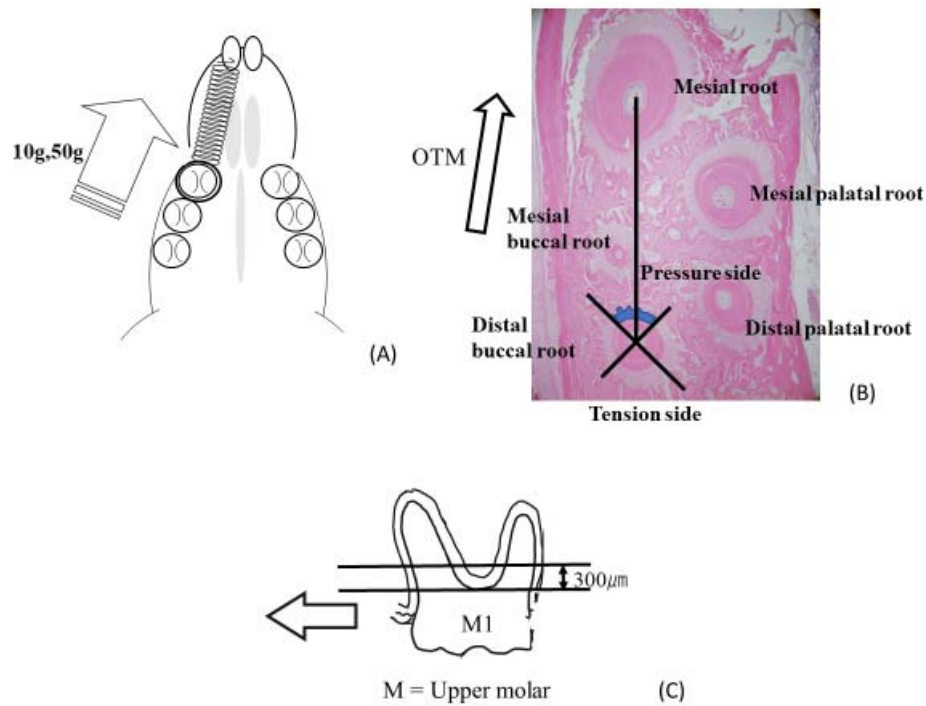


図2 実験的歯牙移動モデル

上顎第一臼歯は、10 g または 50 g の矯正力を有するコイルバネを使用して、近心移動を行った (A)。上顎第一臼歯、矢状断の組織像を示す。遠心頬側根の近心面における観察部位 (青色で示す) は、遠心頬側根から頬側根に向かう面の近心領域の 4 分の 1 の圧迫された歯周組織とした (B)。上顎第一臼歯、側面から見た図を示す。薄切部位は歯根分岐部から 300 μm の範囲とした。大きな矢印は矯正力の方向を示す (C)。

Wnt5a 遺伝子発現量 (hPDL cells)

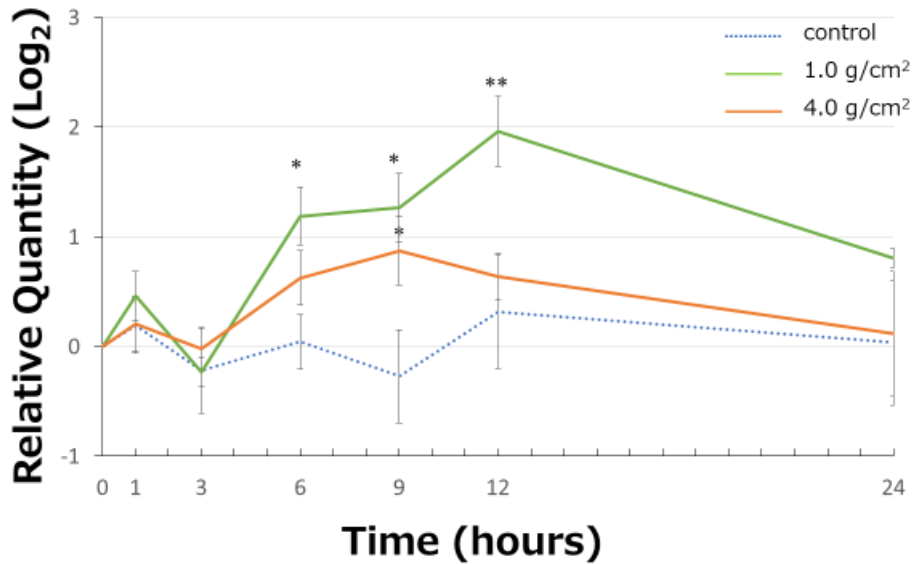


図3 ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDL cells) における Wnt5a の mRNA 発現に対する圧迫力 (CF) (1.0 および 4.0 g/cm²) の影響

Wnt5a の mRNA 発現は、0, 1, 3, 6, 9, 12, および 24 時間後の定量ポリメラーゼ連鎖反応を用いて決定した。Wnt5a の mRNA 発現は、1.0 g/cm², 4.0 g/cm² の CF 負荷において control 群に比べ高い傾向を示した。また、CF-1.0 g 群は CF-4.0 g 群に比べ高値を示した>(* P < 0.05, ** P < 0.01, Mann-Whitney U 検定, control 群との有意差を示す)。データは、平均±SD として表す。

Wnt5a 遺伝子発現量 (HCEM cells)

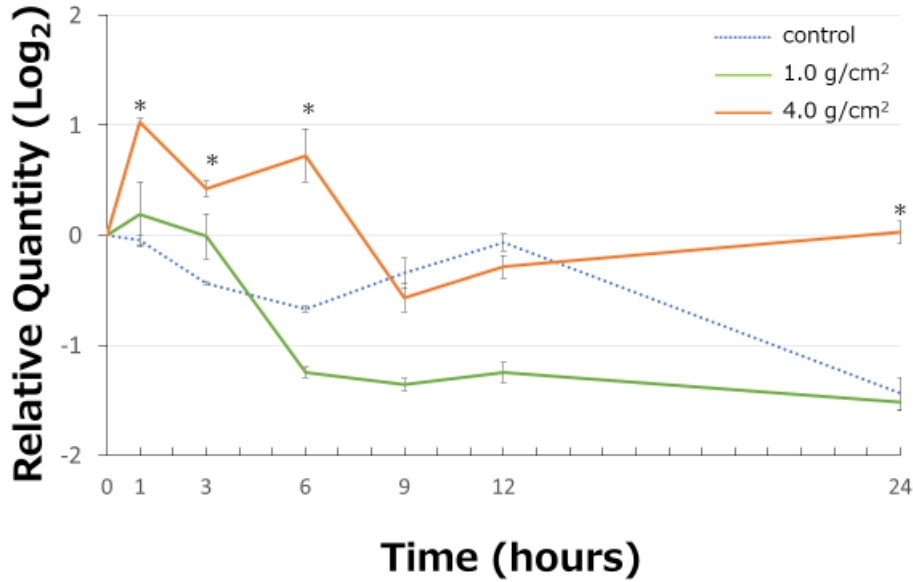


図4 ヒトセメント芽細胞様細胞 (HCEM cells) による Wnt5a の mRNA 発現に対する圧迫力 (CF) (1.0 および 4.0 g/cm²) の影響

Wnt5a の mRNA 発現は、0, 1, 3, 6, 9, 12 および 24 時間後の定量ポリメラーゼ連鎖反応を用いて決定した。Wnt5a の mRNA 発現は、1.0 g/cm² の CF を加えた群よりも、1, 3, 6 時間後に 4.0 g/cm² の CF を加えた群の方が有意な増加を示した。(* P < 0.05, Mann-Whitney U 検定, control 群との有意差を示す)。データは、平均±SD として表す。

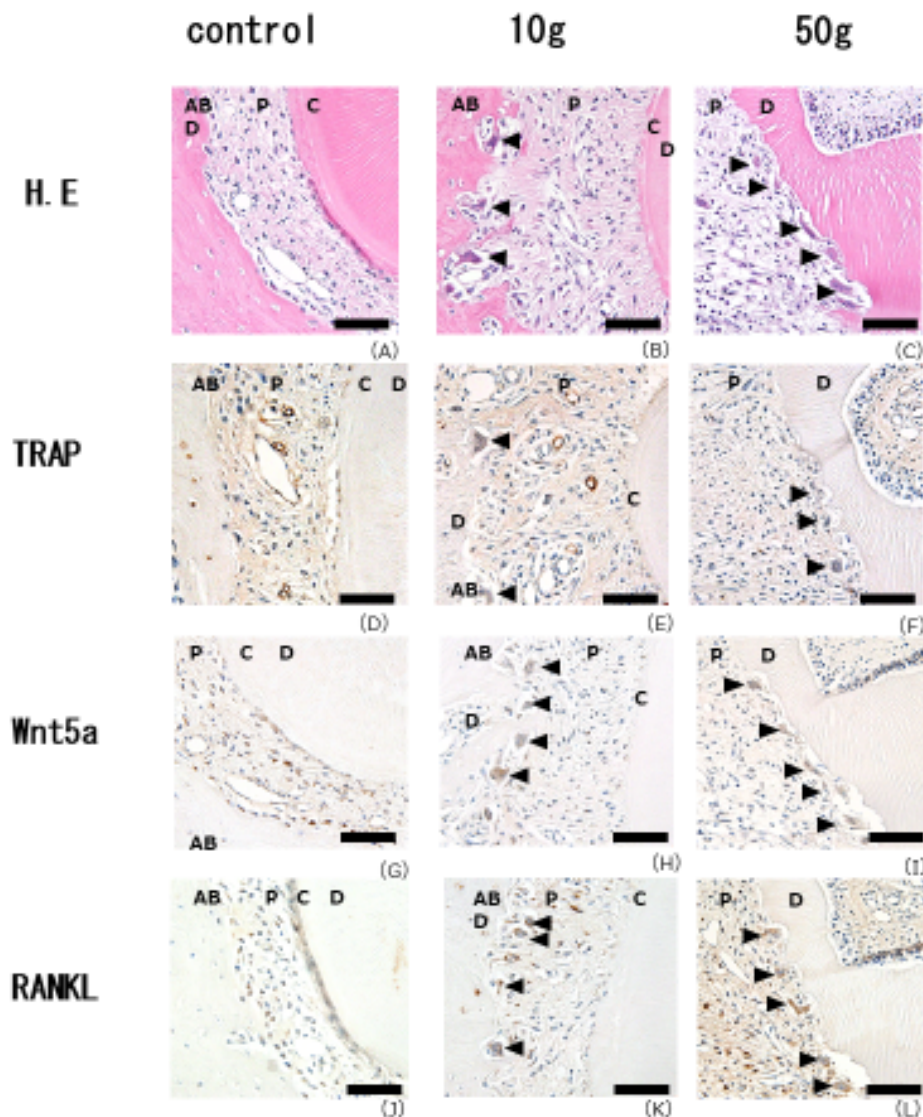


図5 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP), Wnt5a および RANKL に対するヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学染色

圧縮力 (CF) を 7 日間加えた後, CF-10 g 群において歯槽の骨吸収が観察され, CF-50 g 群では歯根吸収が観察された。多核破骨細胞は, CF-10 g 群の歯槽骨表面に観察され, CF-50 g 群の歯根表面に認められた(A, B, C)。 TRAP 免疫反応性は, 多核の細胞において観察された (D, E, F)。 Wnt5a の免疫反応性は, CF-10 g 群の歯槽骨表面および歯根膜, CF-50 g 群の歯根表面に観察された (G, H, I)。

RANKL の免疫反応性は, CF-10 g 群の歯槽骨表面および歯根膜, CF-50 g 群の歯根表面で観察された (J, K, L)。 AB, 歯槽骨; D, 象牙質; C, セメント質; PDL, 歯根膜。 矢印: 陽性細胞。 倍率 200 ×, バー: 50 μm

陽性細胞数

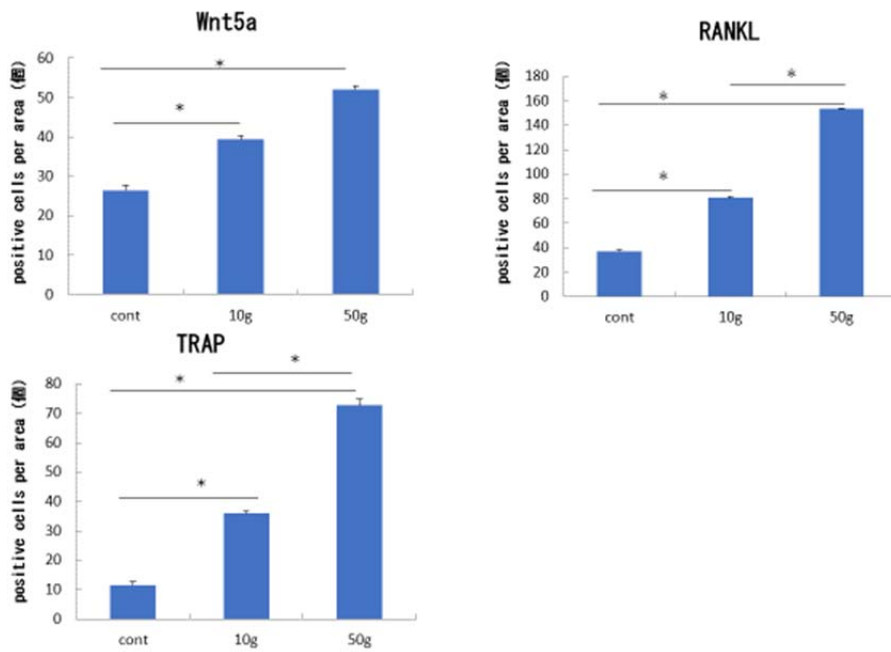
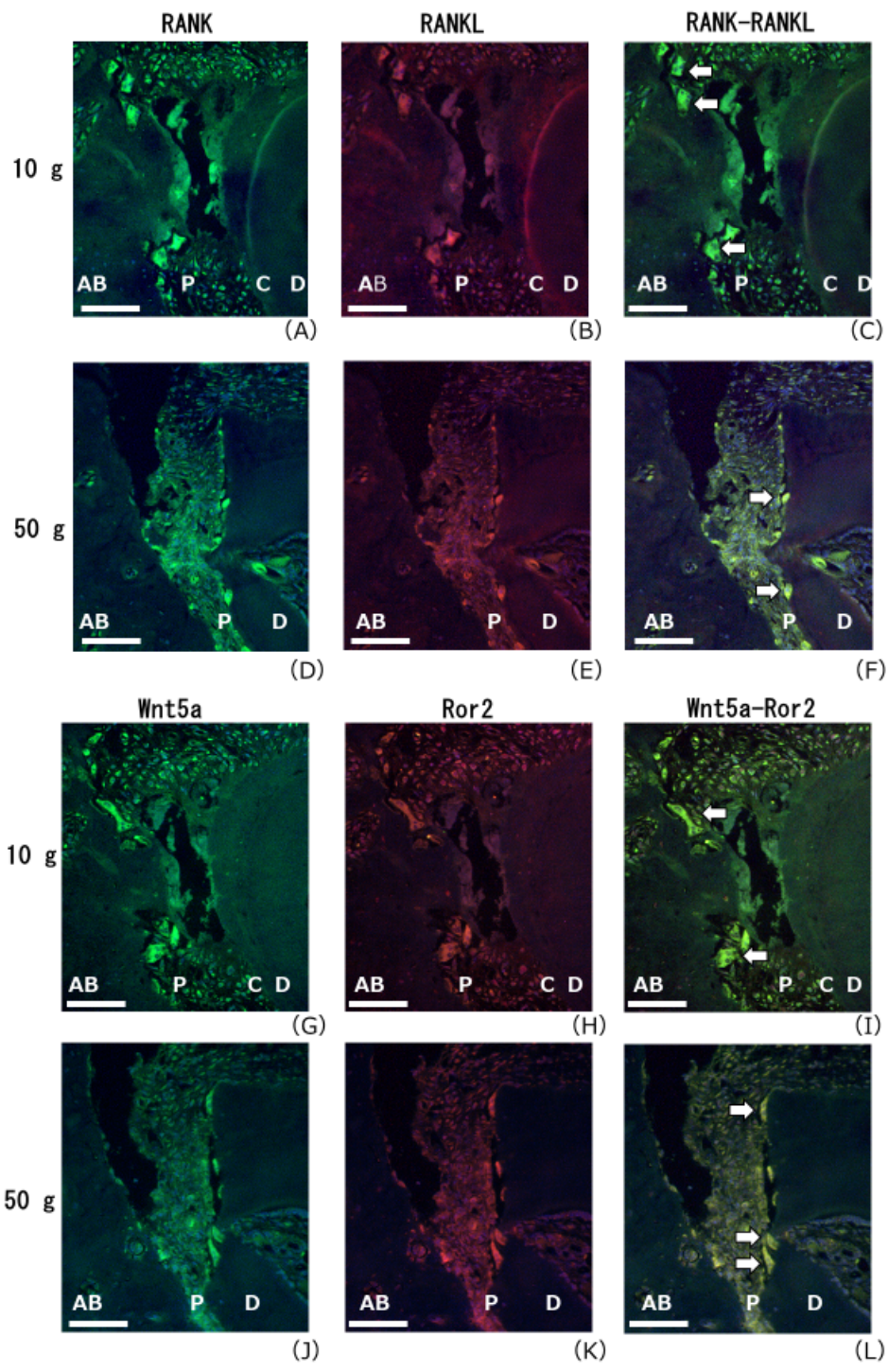


図 6 Wnt5a, RANKL および酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) の陽性細胞数の定量的評価

Wnt5a, RANKL および TRAP それぞれの陽性細胞数は、7 日目に control 群と比較して、圧縮力 (CF) -10 g 群および CF-50 g 群で増加した (* P < 0.05, Mann-Whitney U 検定, 各群との有意差を示す)。データは、平均±SD として表す。



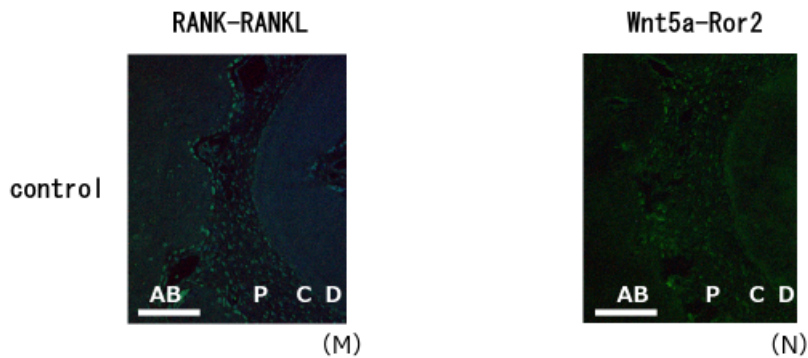


図7 ラットの歯根膜 (PDL) 領域における免疫蛍光二重染色

破骨細胞分化因子 κ -B (RANK) および Wnt5a 免疫反応性細胞は、圧迫力 (CF) -10 g 群 (A, G) の PDL および歯槽骨吸収窩または CF-50 g 群 (D, J) の PDL および歯根吸収窩に沿って緑色に染色されていた。破骨細胞分化因子 κ -B リガンド (RANKL) および Frizzled およびチロシンキナーゼオーファン受容体 2 (Ror2) 免疫反応性細胞は、CF-10 g 群 (B, H) の PDL および歯槽骨吸収窩に、CF-50 g 群 (E, K) の PDL および歯根吸収窩に沿って赤色に染色されていた。CF-10 g 群 (C, I) の歯槽骨吸収窩または CF-50 g 群の歯根吸収窩に、RANKL および RANK または Ror2 および Wnt5a が蛍光を示し観察された (F, L); 二重染色された細胞は黄色で示している。

Control 群:PDL に RANKL および RANK (M) または Ror2 および Wnt5a (N) の蛍光が認められた。AB, 歯槽骨; C, セメント質; D, 象牙質; PDL, 歯根膜。矢印: 陽性細胞。倍率 200 \times , バー: 50 μ m