

## 論文審査の結果の要旨

氏名：櫻井 三央子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Daidzein induces bone morphogenetic protein-2 and runt-related transcription 2 on periodontal ligament cells after experimental tooth movement

（ダイゼインは実験的歯の移動後の歯根膜細胞における BMP-2 と Runx2 の発現を誘導する）

審査委員：（主査） 教授 平塚 浩一

（副査） 教授 葛西 一貴

教授 久山 佳代

矯正歯科治療後の後戻りは臨床上的問題の一つである。初期の後戻りは動的治療中の歯根膜線維に蓄えられた矯正応力が矯正装置除去後に解放され、歯が治療前の位置に戻ろうとする現象である。

Daidzein は大豆由来のイソフラボンでエストロゲンと分子構造が類似しており、骨芽細胞に作用し、bone morphogenetic protein (BMP)-2/Smads signal を介して骨芽細胞の増殖・分化を促進すると報告されている。しかしながら、daidzein が歯根膜細胞 (PDLCs: periodontal ligament cells) に作用することで、骨芽細胞の増殖・分化を促し、骨形成を促進するかについては不明である。そこで本論文の著者は矯正学的歯の移動後における Daidzein の効果について骨形成関連遺伝子である BMP-2 と runt 関連転写因子 2 (Runx2 : runt-related transcription 2) に着目し検討を行った。

*in vivo* 実験として、ラットの実験的歯の移動後に daidzein を腹腔内投与し、PDLCs の牽引側における骨形成作用について検討した。また *in vitro* 実験としては、便宜抜歯にて採取したヒト PDLCs (hPDLCs: human PDLCs) を培養後、伸展力を加え、daidzein を添加することによる BMP-2 と Runx2 の発現変動について検討した。

*in vivo* では、6週齢の Wistar 系雄性ラット (n=36) を、実験的歯の移動のみを行った群 (EXTM 群) と歯の移動後に daidzein を投与した群 (EXTM+DZ 群) との 2 群に無作為に分配した。両群とも上顎第一臼歯 (M1) と第二臼歯 (M2) 間にエラスティックモジュールを挿入することで実験的歯の移動を行い 7 日間続けた。その後、保定としてコンポジットレジンを用いて M1 と M2 を 8~14 日目まで 7 日間固定した。保定後にコンポジットレジン除去し、1 週間後の 21 日目に後戻りを調査した。実験開始 0, 7, 14, 21 日目に Micro-CT 撮影を行い、M1 と M2 間の歯の移動量や後戻り率を算出した。また、骨密度 (BMD: bone mineral density) および骨梁体積率 (BV/TV : ratio of bone volume to total volume) の測定も同時に行った。なお、歯の移動量は M1 と M2 間の最小距離とし、また BMD と BV/TV の測定においては関心領域 (ROI) を設定した。ROI は M1 の近心頬側根に近い遠心側の歯槽骨で、一辺が 500  $\mu\text{m}$  の立方体とし、その上面は根尖 2/3 と根中央の間に位置する領域とした。また上顎骨を摘出して脱灰切片を作製し、BMP-2 と Runx2 の免疫組織化学染色と陽性細胞率の計測を行った。

*in vitro* では、矯正治療の過程で抜去した第一小臼歯 (n=6) の歯根膜組織から採取した hPDLCs を、STREX チャンバーを用いて培養し、10% 伸展後、daidzein を培地に添加した。その後、伸展力を除去し、細胞を回収して全 RNA を生成したのちに、Real-time PCR 法にて BMP-2 と Runx2 の mRNA 発現と ELISA 法にてタンパク質発現を検討した。実験群は無処置対照群 (CTL 群)、伸展力を付与した群 (TF 群)、および伸展力付加に加えて DZ 添加群 (TF+DZ 群) の 3 群で実施した。

本研究の結果、*in vivo* において、実験的歯の移動後の後戻り率は、EXTM 群と比較して EXTM+DZ 群が有意に低い値を示した。また BMD と BV/TV は、実験的歯の移動後 21 日目において EXTM 群と比較して EXTM+DZ 群が有意に高い値を示した。免疫組織化学染色では、EXTM 群と比較して EXTM+DZ 群の BMP-

2, Runx2 陽性細胞率はそれぞれ 14, 21 日目において有意に高い値を示した。また BMP-2 陽性細胞率が 14, 21 日目と時間依存的に増加したのに対し, Runx2 陽性細胞率は 14 日目で最大となり, 21 日目には減少した。これらの結果は daidzein が牽引側の歯根膜において BMP-2 や Runx2 陽性細胞を増加させることにより, 骨形成を促進し, 後戻りを減少させたと考えられた。一方, hPDLcs を用いた *in vitro* 実験では, TF+DZ 群の BMP-2 遺伝子発現は CTL 群や TF 群と比較して, 24, 48, 72 時間後に有意な遺伝子発現の増加が確認された。同様に TF+DZ 群の Runx2 遺伝子発現は他の群と比較して 48, 72 時間で有意に増加した。さらに ELISA 法での BMP-2 と Runx2 のタンパク質発現解析では, 共に 48, 72 時間で TF+DZ 群が TF 群と比較して有意に増加した。

PDLcs は間葉系幹細胞, 骨芽細胞, 破骨細胞, 歯根膜線維芽細胞などで構成される多様な細胞集団である。BMP-2 は前駆骨芽細胞の受容体に作用し, Smads signal を介して Runx2 の発現を亢進し, 間葉系幹細胞に働きかけ, 前駆骨芽細胞に分化および骨形成を促進することが報告されている。*in vivo* 実験において EXTm+DZ 群で歯根膜における BMP-2 と Runx2 の陽性細胞率が増加し, hPDLcs を用いた *in vitro* 実験でも同様に daidzein により BMP-2 と Runx2 の遺伝子およびタンパク質発現レベルでの亢進が認められたことから, 歯根膜に存在する間葉系幹細胞の前駆骨芽細胞への分化を促進する可能性が示唆された。また Runx2 の発現は前駆骨芽細胞から未成熟骨芽細胞への分化を促進するのに対し, 未成熟骨芽細胞から成熟骨芽細胞への分化を阻害することが報告されている。本研究で Runx2 の陽性細胞率が 21 日目に減少に転じたことは, Runx2 の発現が抑制され, 成熟骨芽細胞への分化が促進された可能性が示唆された。一方, PDLcs に TF を加えるだけで BMP-2, Runx2 の遺伝子発現が増加するとの報告があり, 本研究において TF+DZ 群では TF 群と比較し, 両遺伝子およびタンパク質発現レベルで有意な増加が認められることから, daidzein が PDLcs の BMP-2 と Runx2 を遺伝子発現レベルで亢進したことが示唆された。歯根膜線維芽細胞は皮膚線維芽細胞と異なり Runx2 を発現する一方で, ホメオボックス遺伝子 Msx2 の発現により歯根膜線維芽細胞の前駆骨芽細胞分化を抑制していることが報告されている。*in vitro* 実験の結果は *in vivo* と異なり, Runx2 の遺伝子およびタンパク質発現が増加後, 減少に転じなかった理由は, PDLcs は本培養の条件下において大半を歯根膜線維芽細胞が占めており, 自身は骨芽細胞化せずに, BMP-2 と Runx2 を発現し続けていることが原因と思われた。また, 骨芽細胞は BMP-2 をオートクリン的に作用させ自身の分化を促進すると報告されている。daidzein は PDLcs の Runx2 および BMP-2 発現を促進することで, 間葉系幹細胞の前駆骨芽細胞への分化を促進していると推察された。

以上の結果から本論文の著者は, daidzein は実験的歯の移動後に歯根膜細胞での BMP-2 および Runx2 を遺伝子発現レベルで上昇させることで, 間葉系幹細胞および前駆骨芽細胞に作用し, 未成熟骨芽細胞の数を増やすことで, 歯槽骨の形成を促進する可能性が見出されたと結論付けている。

本研究は, 矯正学的歯の移動後における daidzein の歯槽骨形成の促進効果について新たな知見を得たものであり, 歯科医学ならびに歯科矯正臨床に大きく寄与し, 今後一層の発展が望めるものである。

よって本論文は, 博士(歯学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 2 年 1 2 月 1 7 日