

## 論文審査の結果の要旨

氏名：金子 薫

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：矯正歯科治療後の骨芽細胞における Daidzein の後戻り抑制効果について

審査委員：（主査） 教授 岡田 裕之

（副査） 教授 根岸 慎一

教授 平塚 浩一

矯正歯科治療は動的治療と保定治療の2つのステージに分類される。ワイヤーなどで歯を積極的に動かす動的治療は、歯列形態と顔貌の改善を目的とし様々な材料や治療方法が報告されている。一方、保定治療は完成した歯列を長期的に安定させることを目的とし、保定装置の長期使用などにより達成されるが、患者の協力性などで後戻りを起こしてしまう事も少なくない。近年、薬剤を局所的、全身的に投与することにより骨形成の促進と骨吸収の抑制を行い、後戻りを防止するとの報告がされているが、実際に臨床で応用するまでには至っていない。

Daidzein (DZ) は大豆から発見された代表的なイソフラボンの一種でエストロゲンと分子構造が類似しており、骨粗鬆症の予防薬としてすでに臨床応用され、安全性も高くその作用が確認できれば早期に応用可能な物質である。DZ は、骨芽細胞に対しては増殖と分化を促進することで骨形成を促し、破骨細胞に対しては分化を抑制し骨吸収を軽減することが報告されている。本研究の目的は、矯正力を負荷した骨芽細胞に DZ を作用させることで骨吸収を抑制し、骨形成を促進することで後戻りの抑制について検討することである。

マウス頭蓋冠由来の前骨芽細胞株 MC3T3-E1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)細胞を実験に用いた。動的矯正治療モデルとして圧迫側と牽引側を再現する為、骨芽細胞に圧迫力と伸展力を負荷し、負荷を除去した後に DZ を添加した。圧迫側モデルでは骨吸収関連因子である receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), OPG, macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) の遺伝子発現及びタンパク産生量と Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 活性を用いて DZ の骨吸収抑制作用及び破骨細胞の分化抑制効果について検討することとした。さらに牽引側モデルでは骨形成因子である bone morphogenetic protein (BMP)-2, osterix (OSX), alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC) の遺伝子発現及びタンパク産生量について検討した。対照群および実験群は、それぞれ次の3群に分類した。圧迫側モデルにおいては無処置群; Control 群, 圧迫力を負荷した群; Compression force (CF) 群, 圧迫力を負荷した後に DZ を添加した群; CF+DZ 群に分類した。牽引側モデルにおいては、無処置群; Control 群, 伸展力を負荷した群; Tension force (TF) 群, 伸展力を負荷し DZ を添加した群; TF+DZ 群に分類した。

その結果、圧迫側モデルでは RANKL, M-CSF の遺伝子発現量およびタンパク産生量は CF 群と比較して CF+DZ 群で経時依存的に減少した。OPG の遺伝子発現量は CF と比較して CF+DZ 群で増加した。また TRAP 染色を行った結果、Control 群と比較して、CF 群で有意に増加し、CF 群と比較して CF+DZ 群では、TRAP 陽性多核細胞の数が減少した。牽引側モデルにおける遺伝子発現量およびタンパク産生量では、TF 群は Control 群と比較して BMP-2, OSX, ALP, OC の発現量は増加傾向にあった。さらに TF+DZ 群では、TF 群と比較して BMP-2, OSX, ALP, OC の発現は増加傾向にあった。

骨芽細胞は、破骨細胞の分化と機能を調節する司令塔としての役割をもち、破骨細胞の分化に必須

なサイトカイン RANKL と M-CSF を発現する。単球・マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞は RANKL の受容体 RANK と M-CSF の受容体 Fms を発現しており, RANKL と M-CSF を認識して破骨細胞に分化する。骨芽細胞は RANKL のデコイ受容体である OPG も分泌する。OPG は RANKL-RANK 相互作用を阻害し, 骨吸収を負に制御する。また矯正的な圧迫力の負荷は骨芽細胞において M-CSF 産生を増加させ, OPG 産生を減少させることで破骨細胞分化を誘導することが報告されている。本研究の結果でも同様に, 圧迫力を骨芽細胞に負荷したことで圧迫力を除去した後も RANKL と M-CSF が増加し, 破骨細胞の分化が促進された。一方, 圧迫力除去後に DZ を添加すると RANKL と M-CSF が減少, OPG が増加し, 破骨細胞の分化が抑制された。これは DZ の添加により RANKL, M-CSF の発現が抑制され OPG の発現が増加したことによる結果と考えられる。さらに圧迫力を除去したことより破骨細胞の分化と形成が抑制されたとの報告がある。しかしながら本研究結果では圧迫力を除去した後も破骨細胞の分化形成が促進された。これは動的矯正歯科治療後も破骨細胞が形成され歯槽骨の吸収を起こすことで後戻りを生じさせることを裏付ける結果となった。

また, TRAP 染色を行った結果, Control 群と比較して CF 群で TRAP 陽性多核細胞の数が有意に増加し, CF 群と比較して CF+DZ 群では, 減少した。RANKL は破骨細胞の分化誘導因子であり, OPG は RANK と競合し, RANKL に結合することで破骨細胞形成を阻害する。ゆえに RANKL が増加すると骨吸収が優位になるが, 対照的に OPG が増加すると骨吸収が抑制されることにより骨形成が優位となる。本研究結果においても DZ の添加により RANKL が減少, OPG が増加した CF+DZ 群で破骨細胞数の有意な減少が認められ, DZ により破骨細胞の分化が抑制され骨吸収の抑制が生じたといえる。牽引側モデルにおける遺伝子発現量およびタンパク産生量では, TF 群は Control 群と比較して BMP-2, A の発現量がそれぞれ増加する傾向にあった。さらに TF+DZ 群では, TF 群と比較して 24 時間以降で BMP-2, OSX, ALP, OC の発現量が増加する傾向がみられた。歯根膜に伸展刺激が加わると BMP によって Runx2 および OSX が発現し, 歯根膜中の間葉系幹細胞から骨芽細胞分化が誘導される。また, DZ が骨芽細胞における BMP-2 の増加を引き起こし, 骨芽細胞初期分化に影響を与えていることが知られている。本研究結果でも, TF 群と比較して TF+DZ 群で BMP-2 の増加が認められたことから, 骨芽細胞への DZ の添加により, 骨芽細胞の分化促進および石灰化の促進が起こっていると考えられる。これより, 牽引側においては歯根膜中の骨芽細胞に DZ を加えると骨芽細胞における BMP-2, OSX, ALP, OC の発現が促進され骨芽細胞の分化, 石灰化が亢進されることで骨形成が促進される可能性が示唆された。本研究から, 矯正力を負荷した骨芽細胞に DZ を作用させることで圧迫側においては RANKL, M-CSF の発現を抑制し OPG の発現を増加することで前駆破骨細胞の分化を抑制し, 破骨細胞の形成を抑え, 骨吸収を減少させる。加えて牽引側では BMP-2, OSX, ALP, OC の発現を増加させ, 骨芽細胞の形成と, 骨形成を促進することで後戻りを抑制する可能性が示唆された。

本研究は, 矯正歯科治療後の Daidzein における後戻り抑制効果について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 年 月 日