

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

Effect of daidzein on osteoblasts after orthodontic treatment to reduce relapse.

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

金子 薫

(指導：根岸 慎一 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“動的矯正歯科治療後の Daidzein の骨吸収抑制効果の検討”(Clinical and Investigative Orthodontics (Japanese Edition)に掲載予定) および副となる参考文献“矯正歯科治療後の伸展骨芽細胞における Daidzein の骨形成促進効果の検討”(日大口腔科学に掲載予定)をまとめたものである。

Abstract

Objectives: In orthodontic practice, removable retentive appliances are used after dynamic treatment, but tooth relapse occurs in a few of patients. Daidzein (DZ) has a similar molecular structure to estrogen and is already in clinical use as a preventive agent for osteoporosis. It has been reported that DZ promotes osteogenesis by stimulating proliferation and differentiation of osteoblasts and reduces bone resorption by suppressing differentiation of osteoclasts. In this study, we hypothesized that DZ might suppress bone resorption and promote bone formation by acting on osteoblasts subjected to orthodontic forces, thereby reducing relapse.

Materials and Methods: Cells were preosteoblast cell line MC3T3-E1 cells derived from mouse cranial crown. Osteoblasts were subjected to compression and traction forces as a model for dynamic orthodontic treatment, and DZ was added after the loading was removed. In the pressure side model, the expression levels of genes and proteins of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), Osteoprotegerin (OPG), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), which are factors related to bone resorption, and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) activity were used to examine the inhibitory effect of DZ on osteoclast differentiation. In the tension side model, the expression levels of bone morphogenetic protein (BMP)-2, Alkaline phosphatase (ALP), Osterix (OSX), and Osteocalcin (OC) genes and proteins were also examined. The control and experimental groups were classified into the following three groups. In the pressure side model, the groups were classified into (1) no treatment group; (control : CTL) group, (2) compression force group; Compression force (CF) group, and (3) DZ addition group; (CF+DZ) . The tension side model was classified into (1) no treatment group; (control: CTL) group, (2) tension force (TF) group, and (3) TF+DZ group.

Results: Gene expression and protein production of RANKL and M-CSF decreased in a time-dependent manner in the CF+DZ group compared with the CF group in the pressure side model. Also,

gene expression of OPG increased in the CF+DZ group compared with the CF group. TRAP staining showed that the number of TRAP-positive multinucleated cells was significantly increased in the CF group compared with the CTL group and decreased in the CF+DZ group compared with the CF group. On the other hand, gene expression and protein production in the tension side model, the expression levels of BMP-2, ALP, OSX, and OC tended to increase in the TF group compared to the CTL group. Furthermore, the expression of BMP-2, ALP, OSX, and OC tended to increase in the TF + DZ group compared to the TF group.

Conclusion: The results suggest that DZ on osteoblasts subjected to orthodontic force may inhibit osteoclast differentiation and reduce bone resorption by suppressing the expression of RANKL and M-CSF and increasing the expression of OPG in the compression side, and promote bone formation by increasing the expression of BMP-2, ALP, OSX and OC in the tension side. These results suggest that DZ after orthodontic treatment may reduce bone resorption, promote bone formation, stabilize alveolar bone remodeling at an early stage, and inhibit relapse.

緒 言

矯正歯科臨床において動的矯正歯科治療後に保定装置を用いるが、歯槽骨のリモデリングが骨吸収に傾くことにより歯の後戻りは少なからず生じる。後戻りの原因には、動的矯正歯科治療後に十分な骨形成がされず保定期間中に歯が移動することにより起こる場合、矯正歯科治療の結果が不十分であった場合、症例に対する保定法や保定期間が不適切であった場合、不正咬合の原因が除去出来なかった場合、保定期間が不十分であった場合、および咬合調整が不十分であった場合などが挙げられる¹⁾。特に、歯槽骨のリモデリングは動的矯正歯科治療後の保定時の歯列の安定性に深く関与すると考えられており、Hanら²⁾は矯正歯科治療終了後、骨吸収を抑制することが後戻りの軽減に有効であると報告してい

る。後戻りを抑制する薬物についての研究はいくつか行われているが、どれも臨床応用までに至っていない。Daidzein (DZ) はエストロゲンと分子構造が類似し、骨粗鬆症の予防薬としてすでに臨床応用されており、骨芽細胞に対しては増殖と分化を促進し骨添加を促す一方で、破骨細胞に対してはその分化を抑制し骨吸収を軽減することが報告されている。当講座の鹿野ら³⁾は、ラットの実験的歯の移動後の保定期間中に DZ を投与し、圧迫側の歯根膜細胞で osteoprotegerin (OPG) と caspase 3 の発現を増加させ、破骨前駆細胞をアポトーシスに誘導し、骨吸収を抑制することを明らかにした。さらに Sakurai ら⁴⁾は、歯根膜細胞に牽引力を負荷した後に DZ を添加することで、歯根膜細胞での bone morphogenetic protein (BMP) -2 および Runx2 を遺伝子発現レベルで上昇させ、間葉系幹細胞および骨芽細胞に作用し、歯槽骨の形成を促進することを見出した。しかしながら骨芽細胞に直接矯正力を負荷した後、DZ を作用させる研究は行われていない。

そこで本研究は、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骨吸収を抑制、牽引側においては骨形成を促進し歯槽骨のリモデリングを早期に安定させることで、後戻りを抑制すると仮説を立てた。動的矯正歯科治療モデルとして圧迫側を再現するため骨芽細胞に圧迫力 (compression force : CF) を負荷した後に DZ を添加し、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 の破骨細胞の分化抑制および骨吸収抑制効果について検討した。また、牽引側を再現するため骨芽細胞に牽引力 (tension force : TF) を負荷した後に DZ を添加し、骨形成因子である BMP-2, Alkaline phosphatase (ALP), Osterix (OSX), Osteocalcin (OC) の遺伝子発現及びタンパク産生量にて骨形成効果について検討した。

これより DZ が矯正力を負荷した骨芽細胞の骨吸収を抑制し、骨形成を促進することが可能であれば動的矯正歯科治療後の歯槽骨のリモデリングを早期に安定させることが可能

となり、後戻りが抑制できると考えた。さらに矯正歯科治療後の歯周組織の安定化を早期に図ることができれば、保定期間の短縮化にもつながるのではないかと考えた。

材料および方法

I. 細胞培養

細胞はマウス頭蓋冠由来の前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) を用いた。対照群および実験群は、圧迫側と牽引側で各々以下の 3 群に分類した。

A. 圧迫側モデル

- Control (CTL) 群；無処置群
- CF 群；圧迫力を負荷した群
- CF+DZ 群；圧迫力を負荷した後に DZ 添加を与えた群

B. 牽引側モデル

対照群および実験群は、以下の 3 群に分類した。

- CTL 群；無処置群
- TF 群；伸展力を負荷した群
- TF+DZ 群；伸展力を負荷した後に DZ 添加を与えた群

II-A. 圧迫力の負荷及び DZ 添加

動的矯正歯科治療時の圧迫側を再現するため、10% ウシ血清 (FCS)、抗生剤 (ペニシリンストレプトマイシン、アムホテリシン B (Gibco., NY, USA)) を含む α -MEN 培地 (Gibco., NY, USA) 中で 37°C にて培養した MC3T3-E1 細胞を 10 cm² ディッシュにおよそ

7.0×10⁶個 cells/10ml になるように細胞を播種し, near confluent になった時点で 1%FCS 含有 α-MEM 培地にて, Yamaguchi ら⁵⁾の方法に従い直径 80mm の cover glass と至適矯正力として分銅の荷重 (1.0g/cm²) を負荷した (Fig.1)。さらに動的矯正処置終了後を再現するため Sakurai ら⁴⁾の方法に従い 12 時間荷重を負荷してから, 荷重を除去し 50 μg/ml の DZ (富士フイルム和光純薬, Tokyo, Japan) を添加し, 0, 6, 12, 24 時間培養した。DZ を溶解する際に Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (富士フイルム和光純薬, Tokyo, Japan) を用いたが, CTL 群と CF 群にも CF+DZ 群と同様に DMSO を添加した。DZ 濃度と時間については Wang ら⁶⁾の方法に従って行った。

II-B. 伸展力の負荷及び DZ 添加

動的矯正歯科治療時の牽引側を再現するため, 10%ウシ血清 (FCS), 抗生剤 (ペニシリン ストレプトマイシン, アムホテリシン B (Gibco., NY, USA)) を含む α-MEM 培地 (Gibco., NY, USA) 中で 37°Cにて培養した MC3T3-E1 細胞を 10 cm² の STREX-chamber (STREX Co.) に播種し, チャンバー内が near confluent になるまで培養を行い, Sakurai ら⁴⁾の方法に従い near confluent になった時点で 1%FCS 含有 α-MEM 培地にて 12 時間, 細胞に至適矯正力である 10%の伸展力を負荷した (Fig.2)。その後, 動的矯正処置終了後を再現するため 伸展力を除去し, MC3T3-E1 細胞に 50 μg/ml の DZ を投与し, 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間培養した。DZ 濃度と時間については圧迫側と同様に Wang ら⁶⁾の方法に従って行い, DZ の溶解は DMSO を用い, CTL 群, TF 群にも同様に DMSO の添加を行った。

III. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real-time PCR)

RNeasy®Mini-kit (Qiagen Co, Maryland, Japan) を使用し total RNA Prime Script™ RT reagent Kit (TAKARA Co, Siga, Japan) を用いてプロトコールに従い cDNA を作製した。Real-time PCR は SYBR Green I を用いたインターカレーター法で行った。 Real-time PCR

はサーマルサイクラー (TP-800 Thermal Cycler Dice, Takara Co, Japan) にて行い, PCR 反応は DNA 変性を 95°C で 5 秒間, アニーリング及び伸長を 60°C で 30 秒間とし 40 サイクル行い RANKL, OPG, M-CSF, BMP-2, ALP, OSX, OC 遺伝子発現量の検討を行った。PCR プライマーは Takara 社から購入し, それぞれの cDNA 配列を参照して設計した (TAKARA Co, Siga, Japan)。プライマー配列は, Kao⁷⁾, Fan⁸⁾ らに従って設計した (Table 1, 2)。

IV. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

RANKL, OPG, M-CSF, BMP-2, ALP, OSX, OC のタンパク産生量は各種 ELISA Kit (assay designs Stressgen, MI, USA) を用いて行った。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて波長 450nm で測定した (Tecan Japan Co., Ltd, Kanagawa, Japan)。

V. TRAP 染色

Kikuta ら⁹⁾ の方法に従い, マウス破骨前駆細胞 (RAW 264.7, Macrophage, Mouse, American Type Culture Collection, US) を 1.0×10^4 cells/100 μ l で 16well に播種し, 培養液に各群の荷重除去 24 時間後の MC3T3-E1 細胞の培養上清を同量加え, 37°C で 5 日間と 7 日間で培養を行った。また, 培養上清中の DZ の影響を確認するため DZ と DMSO を MC3T3-E1 細胞に添加した群を DZ 群とし, その上清を用いて同様に培養を行った。培養した細胞は, TRAP 染色キット (Hokudo Co., Hokkaido, Japan) を用いてプロトコールに従い染色した。実験に用いた培養上清は Kikuta ら⁹⁾ の方法に従い, RANKL, OPG, M-CSF のタンパク産生量の変化が大きかった荷重除去後 24 時間の上清を用いた。TRAP 陽性細胞の判定については Kikuta ら⁹⁾ らの方法に従い, 3 核以上の多核細胞を破骨細胞と判定した。

VI. 統計解析

全体の差の比較に Kruskal Wallis 検定を用いて、Bonferroni にて補正し Mann Whitney *U* 検定にて各群間の比較検討を行った。有意水準は CTL 群 と CF 群, CF+DZ 群もしくは TF 群, TF+DZ 群の比較は †*p* < 0.05, ††*p* < 0.01 とし CF と CF+DZ, もしくは TF と TF+DZ の比較では **p* < 0.05, ***p* < 0.01 とした。

結 果

I. 圧迫力の負荷後, DZ が RANKL, OPG, M-CSF の遺伝子発現へ及ぼす影響

RANKL の遺伝子発現量は CTL 群と比較して CF 群で時間依存的に増加し, CF 群と比較して CF+DZ 群では時間依存的に減少した (Fig.3A)。OPG の遺伝子発現量は CTL 群と比較して CF 群では減少し, CF 群と比較して CF+DZ 群は増加した (Fig.3B)。M-CSF の遺伝子発現量は CTL 群と比較して CF 群で増加し, CF 群と比較して CF+DZ 群は減少した (Fig.3C)。

II. 伸展力の負荷後, DZ が BMP-2, ALP, OSX, OC の遺伝子発現へ及ぼす影響

CTL 群と比較して TF 群及び TF+DZ 群で BMP-2, ALP, OSX, OC の遺伝子発現量は時間依存的に有意に増加した (Fig.4A-D)。TF 群と比較して TF+DZ 群では BMP-2, ALP の遺伝子発現量は DZ を添加してから 24 時間以降有意に増加した (Fig.4A, B)。TF 群と比較して TF+DZ 群の OSX の遺伝子発現量は DZ を添加してから 48 および 72 時間で有意に増加した (Fig.4C)。TF 群と比較して TF+DZ 群の OC の遺伝子発現量は DZ を添加してから 24 および 48 時間で有意に増加した (Fig.4D)。

III. 圧迫力の負荷後, DZ が RANKL, OPG, M-CSF のタンパク産生量に及ぼす影響

RANKL のタンパク産生量は CTL 群と比較して CF 群で時間依存的に増加し, CF 群と比較して CF+DZ 群では減少した (Fig.5A) 。 OPG のタンパク産生量は CTL 群と比較して CF+DZ 群で時間依存的に有意に増加し, CF 群と比較して CF+DZ 群は増加した (Fig.5B)。 M-CSF のタンパク産生量は CTL 群と比較して CF 群では増加し, CF 群と比較して CF+DZ 群は減少した (Fig.5C)。

IV. 伸展力の負荷後, DZ が BMP-2, ALP, OSX, OC のタンパク産生量に及ぼす影響

CTL 群と比較して TF 群及び TF+DZ 群で BMP-2, ALP, OSX, OC のタンパク発現量は時間依存的に増加した (Fig.6A-D) 。 TF 群と比較して BMP-2 は TF+DZ 群のタンパク産生量は DZ を添加してから 48 時間, 72 時間で有意に増加した (Fig.6A) 。 TF 群と比較して TF+DZ 群では ALP のタンパク発現量は DZ を添加してから 24 時間以降有意に増加した (Fig.6B) 。 TF 群と TF+DZ 群間で OSX のタンパク産生量に有意差はなかった (Fig.6C) 。 TF 群と比較して TF+DZ 群の OC のタンパク産生量は DZ を添加してから 24 時間, 48 時間で有意に増加した (Fig.6D) 。

V. TRAP 染色

TRAP 陽性多核細胞の数は 5, 7 日目において CTL 群と比較して, CF 群で有意に増加し, CF 群と比較し CF+DZ 群では, TRAP 陽性多核細胞の数が減少した。また DZ 群の 5, 7 日目ともに TRAP 陽性多核細胞の数は CTL 群と比較し有意差は認められなかった (Fig.7A, B)。

考 察

歯に矯正力が加わると、牽引側ではコラーゲン繊維の伸展や歯槽骨の添加が生じ、圧迫側では組織の圧迫と歯槽骨の吸収が起こることが知られている。矯正歯科治療において歯の移動時には圧迫側での骨吸収と牽引側での骨形成により、骨のリモデリングが生じる。この歯槽骨のリモデリングの崩壊は後戻りの原因の一つであると考えられている²⁾。近年、矯正歯科治療において薬剤を局所的、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^{10,11,12)}が、患者への侵襲や副作用が出る可能性があるため、実際に矯正歯科臨床で応用するまでには至っていないのが現状である。

そこで我々は大豆から発見された代表的なイソフラボンの一種で、骨粗鬆症の予防薬としてすでに臨床応用されており、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 に着目した。DZ は骨芽細胞において増殖や分化を促進する一方、破骨細胞に対しては分化を抑制し、骨吸収を減少させることが明らかになっている¹³⁾。さらに骨粗鬆症などの疾患で DZ を摂取することで骨からのカルシウムの流出を抑え、骨形成の促進と骨密度の増加を促す作用もあると報告されている⁵⁾。

当講座において鹿野ら³⁾は、ラットの実験的歯の移動後の保定期間中に DZ を腹腔内投与し、DZ が圧迫側では OPG と caspase 3 の発現を増加させ、破骨細胞の分化を阻害し骨吸収を抑制すること、牽引側では骨芽細胞の分化を促進し、骨形成を促し後戻りを抑制することを明らかにした。また Sakurai ら⁴⁾は *in vitro* において、伸展した歯根膜細胞に DZ を添加し、BMP-2 および Runx2 の発現が増加し、間葉系幹細胞および骨芽細胞に作用し、歯槽骨の形成を促進することを見出した。BMP-2 は骨芽細胞の受容体に作用し、Smads signal を介して Runx2 の発現を制御することで、間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させ、骨形成を促進することが報告されている¹⁴⁾。以上のことから本研究では、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骨吸収を抑制し、牽引側にお

いては骨形成を促進することで後戻りを抑制できると仮説を立てた。そこで動的矯正歯科治療の圧迫側モデルでは骨吸収関連因子である RANKL, OPG, M-CSF の発現量と TPAP 活性を用いて DZ の破骨細胞の分化抑制作用について検討した。牽引側モデルでは骨形成因子である BMP-2, ALP, OSX, OC の発現量を用いて DZ の骨形成促進作用について検討した。

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要なサイトカイン 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。Sakurai ら⁴⁾は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を報告している。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 (Fig.3,5)。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。また Ikeda ら¹⁰⁾は、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報告している。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。これは矯正歯科治療後にも破骨細胞が形成され歯槽骨の吸収が生じることで、後戻りが起きることを裏付ける結果となった。

また本研究において、TRAP 染色を行った結果、CTL 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 (Fig.7 A, B)。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¹⁵⁾。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。Han ら²⁾ は圧迫側のほうが RANKL の発現量が多く、動的矯正歯科治療後の後戻りは骨吸収が優位に働いている時に生じるものであるとし、RANKL を制御することによって、骨形成を刺激しながら破骨細胞の骨吸収活性を阻害することで後戻りを抑制すると報告している。さらに、Rassi ら¹⁶⁾は DZ が破骨細胞の発生を抑制し、骨吸収を低下させると報告している。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 CTL 群と比較して BMP-2, ALP, OSX, OC 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, ALP, OSX, OC の発現量が増加する傾向がみられた (Fig.4, 6)。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¹⁷⁾ことが報告されている。実際に Sakurai らは DZ が実験的歯の移動後に歯根膜細胞での BMP-2 および Runx2 の遺伝子発現レベルを増加させ、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化と骨芽細胞による石灰化を促進すると報告している⁴⁾。本研究結果においても、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, ALP, OSX, OC の発現が促進され骨芽細胞の成熟化、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。

以上のことから、動的矯正歯科治療後の DZ の添加により圧迫側の骨芽細胞では破骨細胞への分化抑制とそれに伴う骨吸収抑制を牽引側では骨形成を促進し、歯槽骨のリモデリングを早期に安定させ後戻りを抑制する可能性が示唆された。また、本研究の結果から

DZ をサプリメントなどの形で動的治療終了時から患者に服用させることで、保定期間を短縮化にもつながるのではないかと考える。

結 論

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骨吸収を抑制し、牽引側においては骨形成を促進することで後戻りを抑制できるかを検討したところ、以下の結論を得た。

1. 圧迫側モデルでは DZ の添加により RANKL, M-CSF の発現量が抑制され OPG の発現量が遺伝子およびタンパク質レベルで増加した。
2. 牽引側モデルでは DZ の添加により BMP-2, ALP, OSX, OC の発現量が遺伝子およびタンパク質レベルで増加した。
3. TRAP 染色を行った結果, CTL 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。DZ 群の 5, 7 日目ともに TRAP 陽性多核細胞の数は CTL 群と比較し有意差は認められなかった。

以上のことから、動的矯正歯科治療後の DZ の添加により圧迫側の骨芽細胞で RANKL, M-CSF の発現が減少し OPG の発現が増加することにより破骨細胞への分化抑制とそれに伴う骨吸収抑制が起こり、牽引側においては骨芽細胞で作用し BMP-2, ALP, OSX, OC の発現を増加させ、骨芽細胞の分化および石灰化が進行し、骨形成が促進することで歯槽骨のリモデリングを骨形成に傾けることで後戻りを抑制する可能性が示唆された。

参考文献

1. 飯田順一郎, 後藤滋辰巳, 榎宏太郎編. 矯正歯科学. 6版. 東京: 医歯薬出版株式会社, 1974: 332-335.
2. Han G, Chen Y, Hou J, et al. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010; 138: 550.e1-e7.
3. 鹿野瑞貴, 清水真美, 疋田拓史, 他. ラットの実験的歯の移動後の骨吸収の抑制に daidzein が与える影響, 日大口腔科学, 2020年;第46巻.
4. Sakurai M, Shimizu M. Daidzein induces bone morphogenetic protein-2 and runt-related transcription 2 on periodontal ligament cells after experimental tooth movement, *Orthodontic Waves-Japanese Edition*, 2020; 第79巻: 145-151.
5. Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T et al. RANKL Increase in Compressed Periodontal Ligament Cells from Root. *J Dent Res*, 2006;751-756.
6. Wang. L, Jin-feng Wang, Wei-fang Jinet et al. Effects of daidzein on steroid receptor coactivator-1 expression in MC3T3-E1 cells and the mechanism. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2011;9:1248-1253.
7. Kao C, C Chen, U-I Cheong et al. Osteogenic gene expression of murine osteoblastic (MC3T3-E1) cells under cyclic tension CT. 2014; Published 18 June.
8. Yuki Koyama, Narihiro Mitsui, Chieko Shionome et al. Compressive force stimulates the gene expression of IL-17s and their receptors in MC3T3-E1 cells. 2010 Oct;51: 359-369.
9. 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;94:140-7.
10. Takahashi I, Onodera K, Nishimura M, Mitnai H, Sasano Y, Mitani H. Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic toothmovement. *J Mol Histol*. 2006 ;37:333-42.

11. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S, Shimono M. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis.* 2010;16:263-8.
12. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1988;67:66-70.
13. Hinz B. Matrix mechanics and regulation of the fibroblast phenotype. *Periodontol* 2000. 2013;63:14-28.
14. Nishimura R, Hata K, Harris SE, et al.: Core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone*, 31:303-312, 2002.
15. Li Liang, Ji-feng Yu, Yan Wang, et al. Estrogen Regulates Expression of Osteoprotegerin and RANKL in Human Periodontal Ligament Cells Through Estrogen Receptor Beta. 2008; 79: 1745-1751.
16. Rassi C M, Michele L, Gilles C et al. Down-Regulation of Osteoclast Differentiation by Daidzein via Caspase 3, *Journal of Bone and Mineral Research*,2002;17: 630-638.
17. Beertsen W, McCulloch AG, Sodek J.: The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue, *Periodontology*; 13: 20-40, 1997.

図および表

Name	Primer sequences
RANKL	Forward: 5' - GGTCGGGCAATTCTGAATT-3'
	Reverse: 5' - GGGGAATTACAAAGTGCACCAGA-3'
OPG	Forward: 5' - AACCCCAGAGCGAAACAC-3'
	Reverse: 5' - AAGAAGGCCTCTTCACAC-3'
MCS-F	Forward: 5' - GAACAGCCTGTCCCATCCATC-3'
	Reverse: 5' - TGAGGCCAGCTCAGTGCAA-3'
GAPDH	Forward: 5' - AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'
	Reverse: 5' - TGAAGGGGTCGTTGATGG-3'

Table1. Real-timePCR に用いた骨吸収関連因子のプライマー

Name	Primer sequences
BMP-2	Forward: 5' - CCAAGAGACATGTGAGGATT-3'
	Reverse: 5' - TTAGTGGAGTTCAGGTGGTC-3'
ALP	Forward: 5' - CTCGTTGACACCTGGAAGAGCTTCAAACCG-3'
	Reverse: 5' - GGTC CGTCACGTTGTTCTGTT CAGC-3'
OSX	Forward: 5' - GGTAGGCGTCCCCCATGGTTT-3'
	Reverse: 5' - AGACGGGACAGCCAACCCTAG-3'
OC	Forward: 5' - CGGTCATTCCGGATTACATGAG-3'
	Reverse: 5' - TCACTGGTCCCTGGGATGTCC-3'
GAPDH	Forward: 5' - AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'
	Reverse: 5' - TGAAGGGGTCGTTGATGG-3'

Table2. Real-timePCR に用いた骨形成関連因子のプライマー

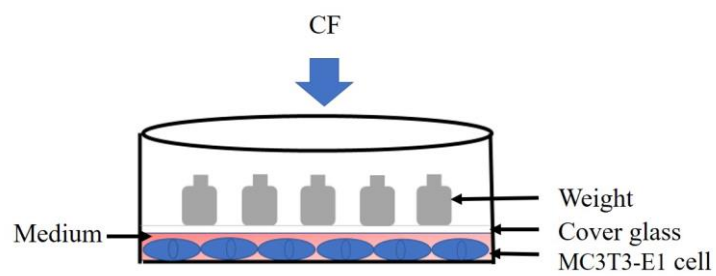


Figure1. 圧迫側モデル

圧迫力を加えた細胞モデルの概略図であり，青い矢印は圧迫方向である。

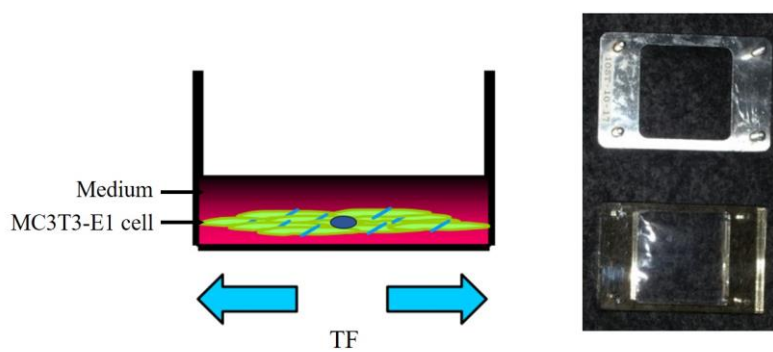
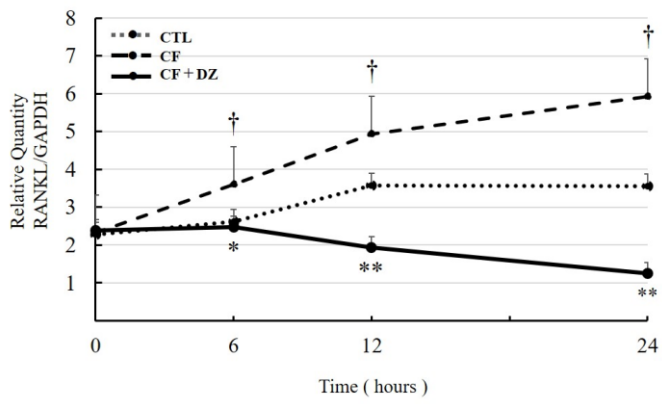


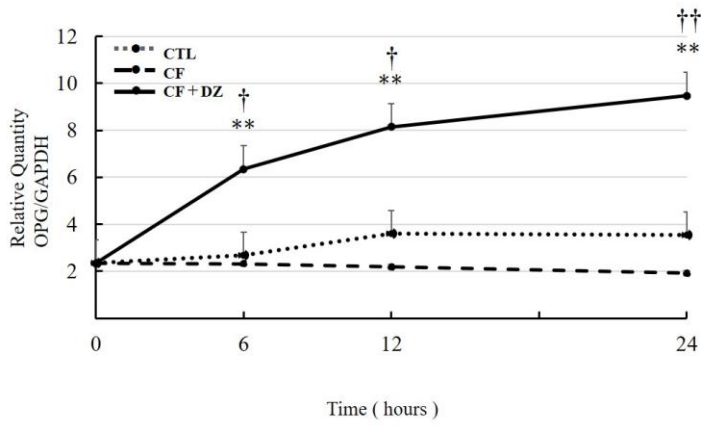
Figure2. 牽引側モデル

牽引力を加えた細胞モデルの概略図であり，青い矢印は牽引方向である。

(A)



(B)



(C)

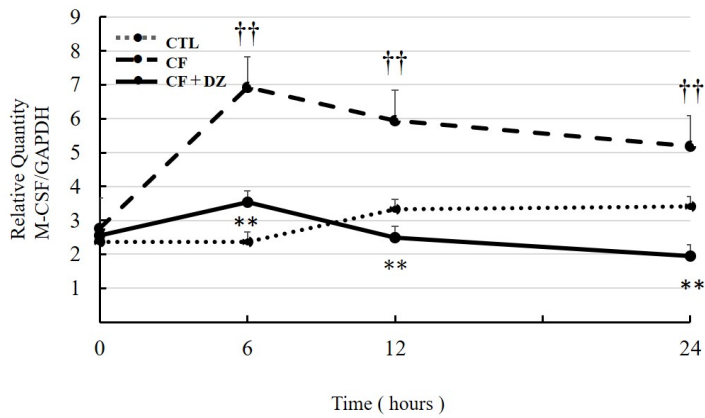


Figure 3 A-C. 圧迫力を負荷した骨芽細胞における DZ 添加による RANKL, OPG, M-CSF の遺伝子発現量の経時的変化

CTL 群と比較して CF 群で RANKL, M-CSF の遺伝子発現量は増加した (A, C)。 CTL 群と比較して CF+DZ 群で OPG の遺伝子発現量は時間依存的に増加した (B)。 CF+DZ 群の RANKL, M-CSF の遺伝子発現量は, CF 群と比較して減少した(A, C)。 CF+DZ 群の OPG の遺伝子発現量は, CF 群と比較して増加した (B)。

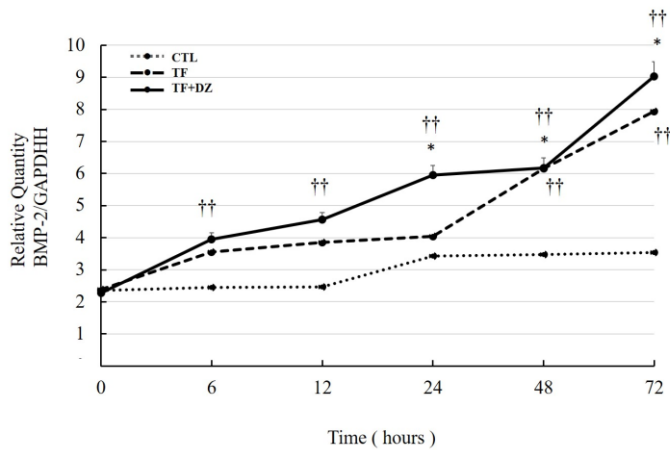
CTL : 無処置群, CF : 圧迫力を負荷した群, CF+DZ : 圧迫力を負荷した後に DZ 添加を与えた群。

(A) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs CF ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, CF vs CF+DZ; Mann-Whitney U 検定

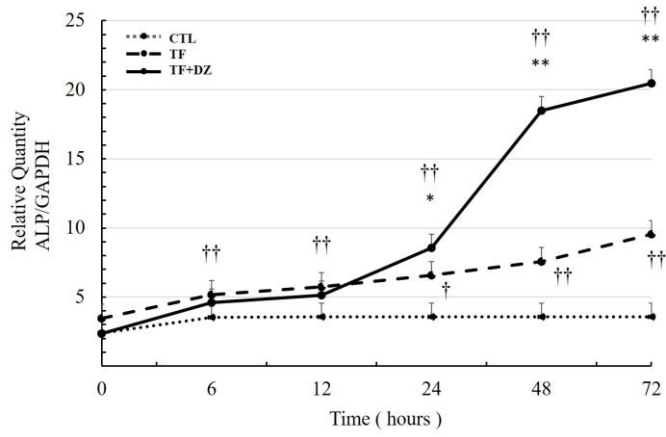
(B) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs CF+DZ ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, CF vs CF+DZ; Mann-Whitney U 検定

(C) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs CF ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, CF vs CF+DZ; Mann-Whitney U 検定

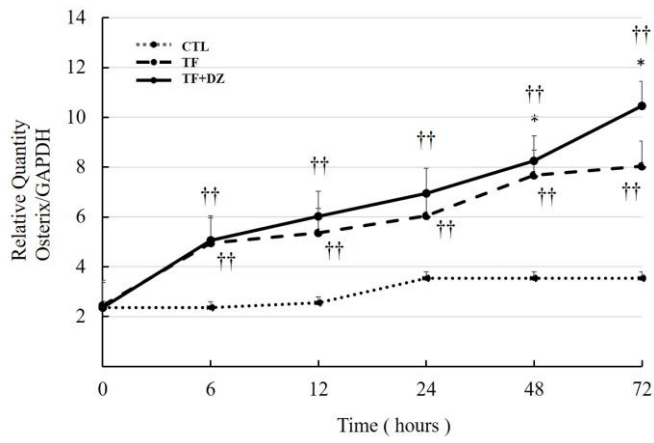
(A)



(B)



(C)



(D)

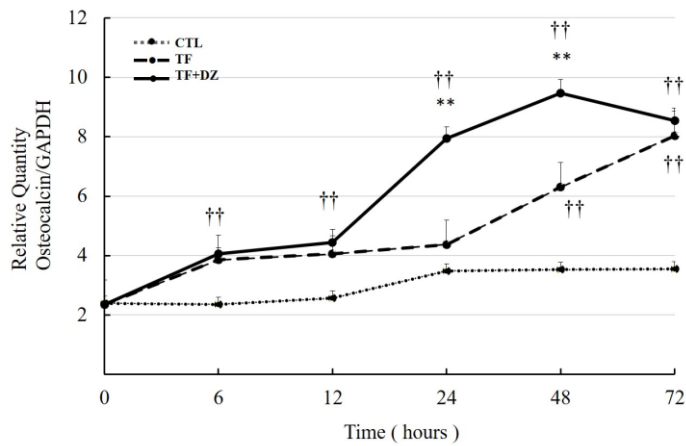


Fig.4 A-D. 伸展力を負荷した骨芽細胞における DZ の BMP-2, ALP, OSX, OC の遺伝子発現量に対する時間経過

CTL 群と比較して TF 群及び TF+DZ 群で BMP-2, ALP, OSX, OC の遺伝子発現量は経時依存的に有意に増加した (A-D)。TF 群と比較して TF+DZ 群では BMP-2, ALP の遺伝子発現量は DZ を添加してから 24 時間以降有意に増加した (A, B)。TF 群と比較して TF+DZ 群の OSX の遺伝子発現量は DZ を添加してから 48 および 72 時間で有意に増加した。TF 群と比較して TF+DZ 群の OC の遺伝子発現量は DZ を添加してから 24 および 48 時間で有意に増加した (D)。(CTL: 無処置群。TF: 伸展力を負荷した群。TF+DZ: 伸展力を負荷した後に DZ 添加を与えた群。

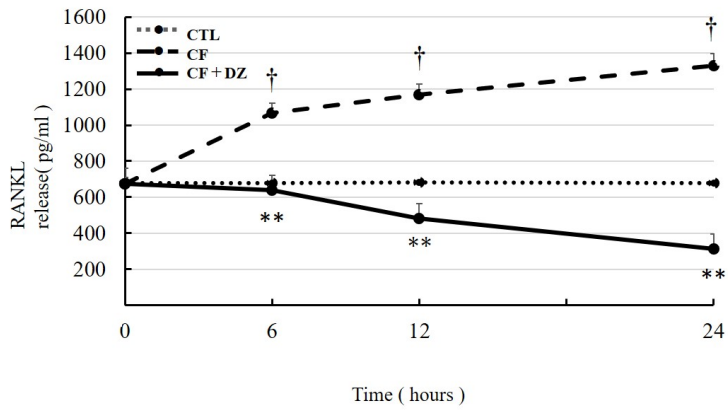
(A) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs TF, TF+DZ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TF vs TF+DZ; Mann-Whitney U 検定

(B) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs TF, TF+DZ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TF vs TF+DZ; Mann-Whitney U 検定

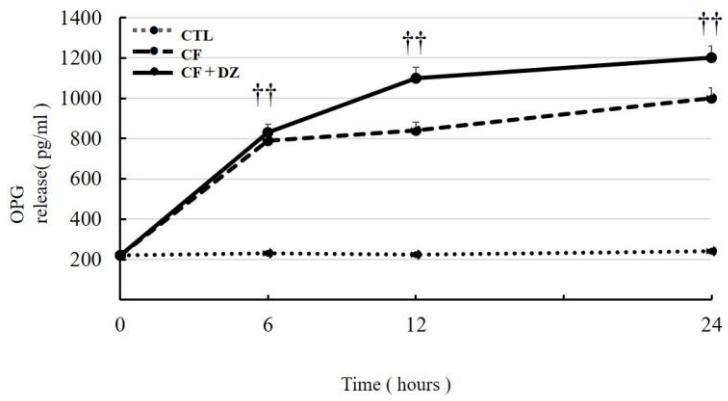
(C) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs TF, TF+DZ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TF vs TF+DZ; Mann-Whitney U 検定

(D) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs TF, TF+DZ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TF vs TF+DZ; Mann-Whitney U 検定

(A)



(B)



(C)

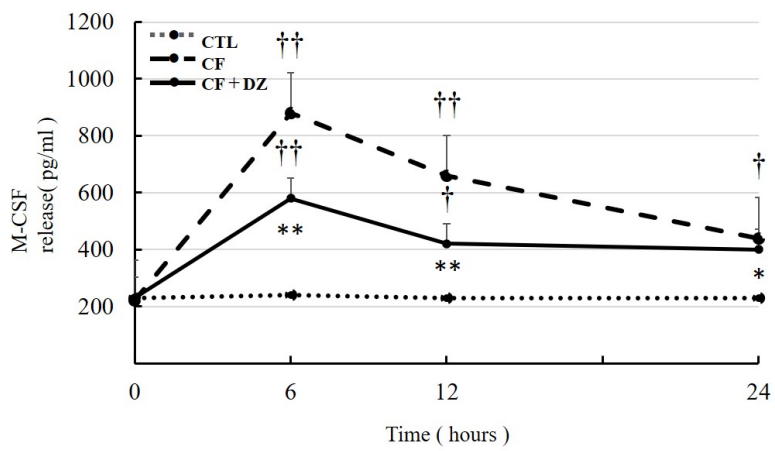


Figure 5 A-C. 圧迫力を負荷した骨芽細胞における DZ 添加による RANKL, OPG, M-CSF のタンパク質産生量の経時的変化

CTL 群と比較して CF 群で RANKL, M-CSF のタンパク質産生量は増加した(A, C)。CTL 群と比較して CF+DZ 群で OPG のタンパク質産生量は増加した (B)。 CF+DZ 群の RANKL, M-CSF のタンパク質産生量は, CF 群と比較して減少した(A, C)。 CF+DZ 群の OPG のタンパク質産生量は, CF 群と比較して増加した (B)

CTL : 無処置群, CF : 圧迫力を負荷した群, CF + DZ : 圧迫力を負荷した後に DZ 添加を与えた群。

(A) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs CF ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, CF vs CF + DZ; Mann-Whitney U 検定

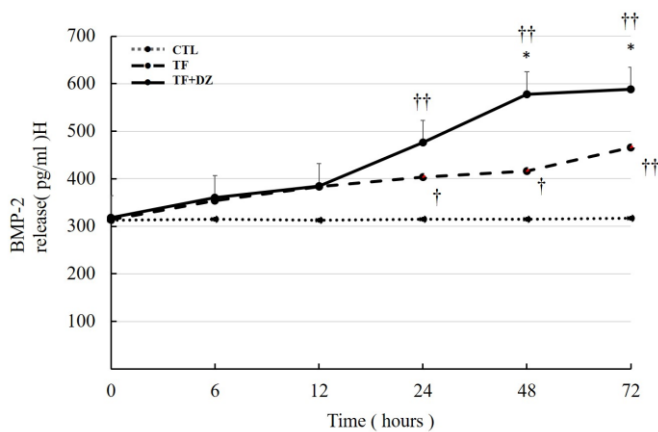
(B) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs CF + DZ ; Mann-Whitney U 検定

† $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs CF 及び CF + DZ ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, CF vs CF + DZ; Mann-Whitney U 検定

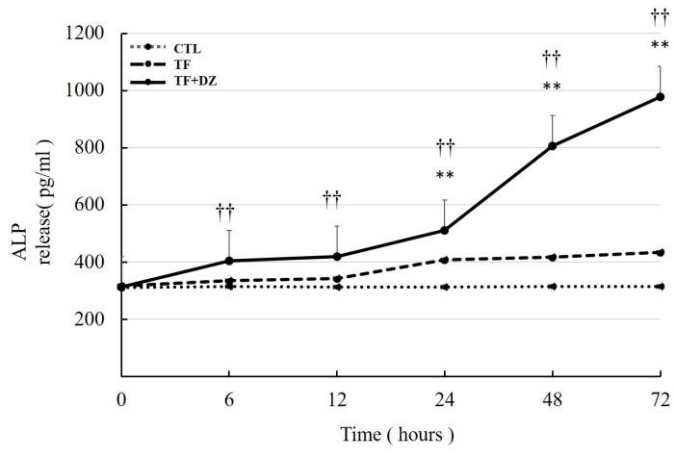
(C) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs CF 及び CF + DZ ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, CF vs CF + DZ;

Mann-Whitney U 検定

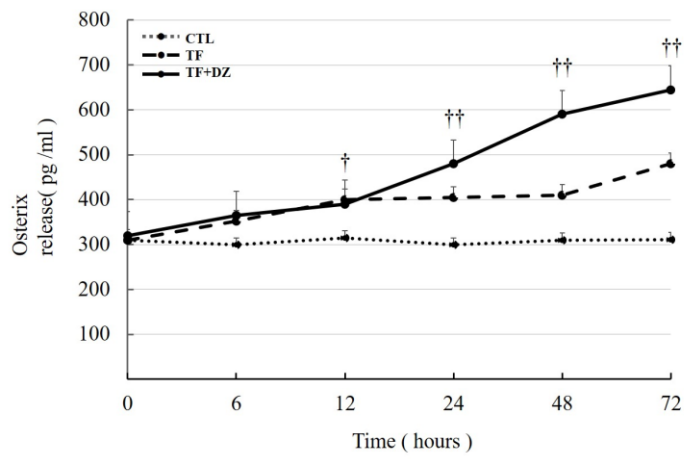
(A)



(B)



(C)



(D)

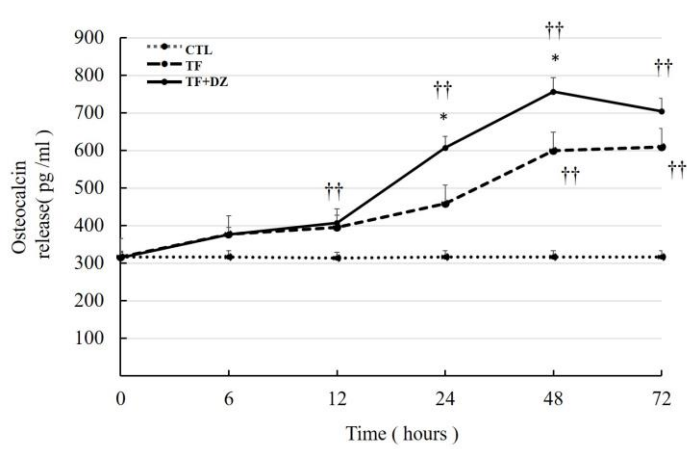


Figure 6A-D. 伸展力を負荷した骨芽細胞における DZ の BMP-2, ALP, OSX, OC のタンパク
産生量に対する時間経過

CTL 群と比較して TF 群及び TF+DZ 群で BMP-2, ALP, OSX, OC のタンパク発現量は時間依存的に増加した (A-D)。TF 群と比較して BMP-2 は TF+DZ 群のタンパク産生量は DZ を添加してから 48 時間, 72 時間で有意に増加した (A)。TF 群と比較して TF+DZ 群では ALP のタンパク発現量は DZ を添加してから 24 時間以降有意に増加した (B)。TF 群と TF+DZ 群間で OSX のタンパク産生量に有意差はなかった (C)。TF 群と比較して TF+DZ 群の OC のタンパク産生量は DZ を添加してから 24 時間, 48 時間で有意に増加した (D)。

(A) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs TF, TF + DZ ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TF vs TF + DZ; Mann-Whitney

U 検定

(B) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs TF, TF + DZ ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TF vs TF + DZ; Mann-Whitney

U 検定

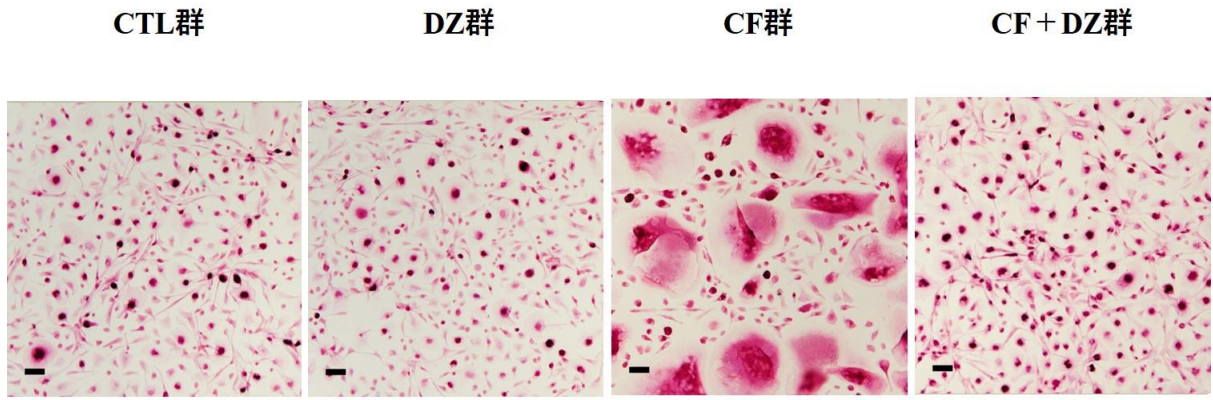
(C) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs TF, TF + DZ ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TF vs TF + DZ; Mann-Whitney

U 検定

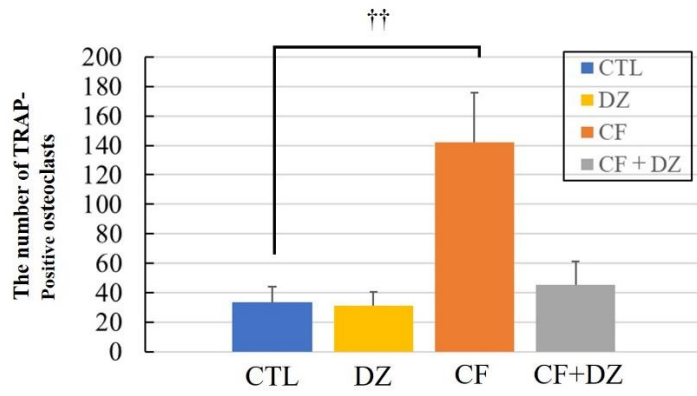
(D) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs TF, TF + DZ ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TF vs TF + DZ; Mann-Whitney

U 検定

(A)



×100, Bar; 50μm



(B)

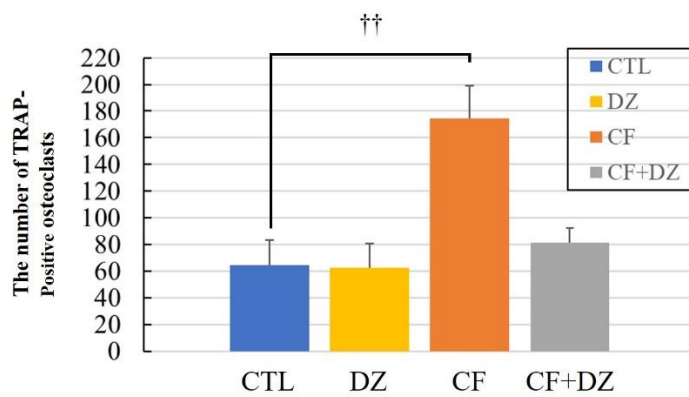
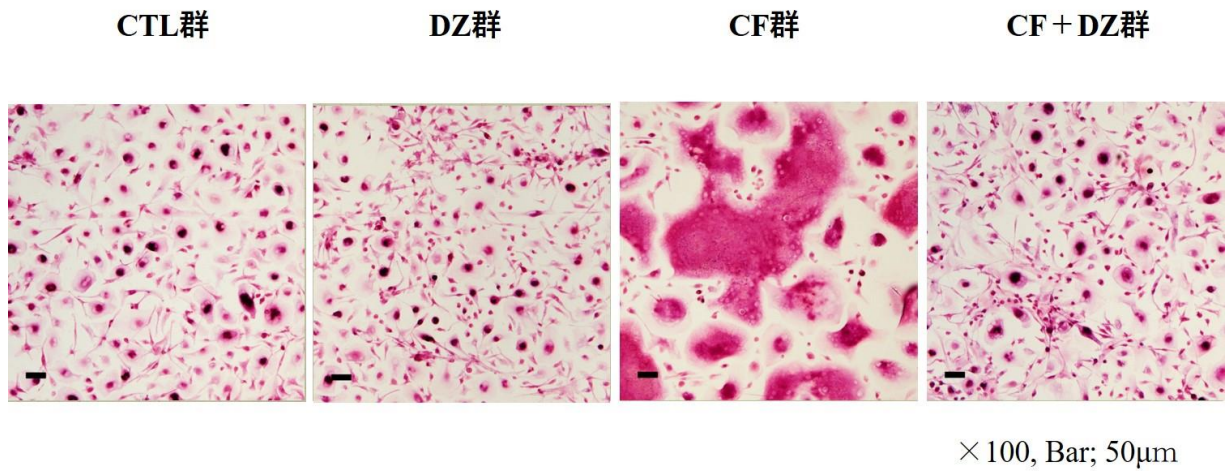


Figure 7A, B. 圧迫側における TRAP 陽性多核細胞の数

TRAP 陽性多核細胞の数は 5, 7 日目において CTL 群と比較して, CF 群で有意に増加し, CF 群と比較して CF+DZ 群では減少した。また DZ 群の 5, 7 日目ともに TRAP 陽性多核細胞の数は CTL 群と比較し有意差は認められなかった (A, B)。

CTL : 無処置群, DZ: DZ を添加した群, CF : 圧迫力を負荷した群, CF+DZ : 圧迫力を負荷した後に DZ 添加した群。

(A, B) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, CTL vs CF; Mann-Whitney U 検定