

セメント芽細胞における歯の移動実験による Wnt7a と歯根吸収の関連性

Wnt7a inhibits through suppression of apoptosis in cementoblasts root resorption.

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

歯科矯正学

船崎 紅緒

(指導：根岸 慎一 教授)

本稿は、主となる参考文献 “Relationship between Wnt7a and root resorption by experimental tooth movement in Rat model.” (International Journal of Oral-Medical Sciences に掲載予定) および副となる参考文献 “ラットの実験的 Jiggling モデルにおける Wnt7a と歯根吸収の関連性について” (日大口腔科学に掲載予定) をまとめたものである。

Abstract

The goal of orthodontic treatment is to achieve aesthetic dentition and functional occlusion, and orthodontic root resorption (ORR) is one of the most common contingencies.

Although multiple factors are thought to be involved in the occurrence of ORR, its cause has not yet been clearly elucidated. Recently, it has been reported that jiggling is one of the causes of ORR. In this study, the author focuses on cementoblasts and ORR, and examine changes in apoptosis in cementoblasts and the expression of Wnt7a and ORR when the tooth movement style is changed. In addition, the author examines the expression of Dickkopf1 (Dkk1), which as a repressor of Wnt signaling, because Wnt7a may be repressed during heavy force and jiggling.

In vivo, 6-week-old male Wistar rats are used to examine the expression of Wnt7a, Caspase-3, and Dkk1 proteins in the ORR area of maxillary right first molars orthodontic forces of 10 g and 50 g are applied to the teeth for 7 days in study 1. In study 2, the same rats as in study 1 are used in the Jiggling (JF) group, in which maxillary first molars are moved with an optimal orthodontic force, in the Optimal force (OF) group, in which the teeth are moved only lingually, and in the Heavy force (HF) group, in which the teeth are moved lingually with HF. *In vitro*, the author focused on the compression side to examine the relationship with ORR, and applied 1.0 g/cm² group and 4.0 g/cm² group, while the non-applied group served as the control group. In order to observe the inhibitory effect of Wnt7a on ORR, the author added 2 groups, 1.0 g/cm² + Dkk1 group and 4.0 g/cm² + Dkk1 group, in which the inhibitor Dkk1 was added to the medium, and compared mRNA expression levels of Wnt7a, Caspase-3, and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), a bone resorption factor. In study 1 Wnt7a-positive cells are increased in the 10 g group and the 50 g group, and Caspase-3 and Dkk1-positive cells are increased in the 50 g group. In study 2, Caspase-3 and Dkk1-positive cells are increased in the JF group compared to the HF group, and Wnt7a-positive cells are increased in the OF group compares to the HF and JF

groups. *In vitro*, gene expression of Wnt7a is increased in the 1.0 g/cm² group, and gene expression of Caspase-3 and RANKL is increased in the 4.0 g/cm² group. The gene expression levels of Wnt7a in the 1.0 g/cm² + Dkk1 group and the 4.0 g/cm² + Dkk1 group with inhibitors are decreased. Gene expression levels of Caspase-3 and RANKL are increased in the 1.0 g/cm² + Dkk1 group and 4.0 g/cm² + Dkk1 group with the inhibitor.

Therefore, the expression of Wnt7a in the cementum decreases and that of Caspase-3 and Dkk1 increases when HF or JF is applied, which causes ORR. In addition, the expression of Caspase-3 and Dkk1 is further increased in the JF group than in the unidirectional HF group, despite the OF. Furthermore, the expression of Caspase-3 and RANKL increases when Wnt7a inhibitor is added, suggesting that Wnt7a suppressed the expression of these proteins.

In conclusion, Wnt7a increases during optimal force, Caspase-3 and Dkk1 are suppressed, and apoptosis of cementoblasts is also suppressed, thus ORR does not occur. However, the increase of Dkk1 in Jiggling and heavy force may suppress the resorptive system and promote apoptosis of cementoblasts, resulting in ORR.

緒 言

矯正歯科治療は、審美的歯列と機能的な咬合を得ることを目的とするが、偶発症として歯根吸収がある。矯正治療既往のある人のほとんどに歯根の短小化が認められ、歯根の 1/4 を超える重度の歯根吸収は上顎中切歯で全体の 3 %に認められる¹⁾。その発生には多因子が関与しており²⁾、そ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³⁾、歯根の形態不良やセメント質の硬さ⁴⁾、治療期間の長期化⁵⁾、jiggling^{6,7)}が挙げられる。矯正学的歯の移動は、歯槽骨において圧迫側と牽引側における代謝が重要であると考えられており、歯根膜周囲の破骨前駆細胞、骨芽前駆細胞の発現および均衡した活性化が必須である^{8,9)}。Hikida ら⁷⁾は jiggling は至適矯正力でも圧迫側と牽引側が入れ替わるため、一方向の強い矯正力と比較し、歯根吸収を増悪させると報告した。また本講座では、Wnt シグナルと歯根吸収の関連性に着目し、Wnt5a が歯根吸収を促進することを見出した¹⁰⁾。Takagi ら¹¹⁾は、矯正歯科治療中の jiggling 力が Wnt5a の活性化により破歯細

胞の分化・融合を促進し、歯根吸収の発現に関与している可能性を報告した。Wnt シグナルは歯周組織の恒常性維持において重要であると同時に歯根吸収因子の一つと考えられている^{12,13)}。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¹⁴⁾。これら受容体と Wnt タンパク質の結合は、 β -catenin 依存性 canonical 経路（古典的経路）と β -catenin 非依存性 canonical 経路（非古典的経路）の 2 種類の伝達経路を活性化する¹⁵⁾。古典経路では Wnt3a または Wnt7a と LRP5/6 の結合により骨形成の活性化を行い、非古典経路では Wnt5a と Ror2 の結合により破骨前駆細胞の Receptor activator for nuclear factor-kappaB (RANK) 形成の促進が起こるなど、骨代謝のシグナル伝達の役割を担っている¹⁰⁾。

Wnt7a は、細胞生存シグナルを活性化することにより apoptosis を抑制し、古典経路において骨形成因子として未分化間葉細胞から骨芽細胞への分化において重要な役割を果たしていると言われている^{16,17)}。また Wnt7a を含めた Wnt の阻害因子である Dickkopf1 (Dkk1) は骨細胞や骨芽細胞から産生され、骨芽細胞の分化抑制により骨代謝を阻害するといわれており、Dkk1 の発現が減少し Wnt7a の発現が増加すると骨量が増加することが報告されている¹⁸⁾。Minato ら¹⁹⁾ は、強い矯正力をセメント芽細胞に負荷することにより apoptosis 関連因子が増加し、歯根吸収を発現させることを報告している。近年、骨細胞の apoptosis は破骨細胞形成を促進することが報告されており²⁰⁾、セメント質と骨組織は極めて類似した生物学的特徴を有することから、セメント芽細胞の apoptosis が破骨細胞形成を促進する可能性がある。

これらのことより、Wnt7a により至適矯正力下では歯根吸収の発生を抑えることが出来るが、強い矯正力や jigging の場合は Wnt7a が抑制され apoptosis が生じ、歯根吸収が発生すると仮説を立てた。そこで本研究ではセメント芽細胞と歯根吸収に焦点を当て、*in vivo* において 2 種類のラットの歯牙移動モデルを用いて歯の移動様式を変えた際や異なる矯正力を負荷した際のセメント芽細胞における apoptosis 発現の変化と歯根吸収の発現について検討するため Wnt7a, Caspase-3, Dkk1 のタンパク発現について免疫組織化学的に検討を行った。さらに Wnt7a と歯根吸収との関連性について検討するため、*in vitro* においては培養ヒトセメント芽細胞様細胞 (human cementoblast-like cells, HCEM) を用いて Wnt シグナルに対して抑制的に働く Dickkopf1 (Dkk1)

を添加し, Wnt7a を発現低下時の apoptosis に関連する Caspase-3 および破歯細胞の分化促進因子の receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) の遺伝子発現について検討した。

材料および方法

1. *In vivo study*

1) 実験動物および飼育条件

研究①: 72 頭の 6 週齢の Wistar 系雄性ラット, 研究②: 50 頭の 6 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い, 研究①②ともに日本大学松戸歯学部動物実験倫理に関する指針 (研究①: 承認番号第 AP20MAS014 号, 研究②: 承認番号第 AP13MD003 号) に従い実験を行った。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。

2) 歯牙移動モデル

研究①: ラットに 3 種混合麻酔薬 (塩酸メデトミジン, ミダゾラム, 酒石酸ブトルフェノール) を腹腔内注射した。Asano ら²¹⁾ の方法に従い, 全身麻酔下にて上顎右側第一臼歯にニッケルチタンコイルスプリング (太さ: 0.005inch, 直径 1/12 inch, accurate, Inc., Tokyo, Japan) を stainless steel (SS) 結紮線 (太さ 0.008 inch, Tomy International. Inc. Tokyo, Japan) で結び, 反対側を前歯と結んで当該臼歯の近心移動を行った (図 1)。矯正力を負荷しない対照群, 至適矯正力 (10 g) 群, または強い矯正力 (50 g) 群を負荷した 3 群に分類し, 歯の移動を 1, 3, 5, 7 日間行った。72 頭の内訳は, 1, 3, 5, 7 日毎に 6 頭×実験群 3 群とした。

研究②: ラットに 3 種混合麻酔薬を腹腔内注射した。Hikida ら⁷⁾ の方法に従い, 上顎両側第一臼歯の移動を行うために, 歯牙移動装置 (直径: 0.018 inch, SS 線, Tomy International Inc. Tokyo, Japan) を作製し, 上顎両側第一臼歯と SS 結紮線 (太さ: 0.008 inch, Tomy International Inc. Tokyo, Japan) で結紮, 上顎両側切歯にスーパーボンド[®] (Sun Medical Co, Shiga, JAPAN) を用い固定した (図 2)。対照群, 至適矯正力 (10 g) (Optimal force : OF) 群, 強い矯正力 (50 g) (Heavy force : HF) 群, 至適矯正力 (10 g) で上顎両側第一臼歯を頬舌側に交互に移動する jiggling (jiggling force : JF) 群

の計4群に分け、力の方向は、OFおよびHF群では舌側（口蓋側）方向へ、JF群では舌側、頬側と7日間毎に方向転換を行った（図3）。対照群は装置装着のみ行った。50頭の内訳は、対照群5頭、実験群45頭（7, 14, 21日毎に5頭×実験群3群）とした。

3) 標本作製

研究①は歯牙移動1, 3, 5, 7日後、研究②は歯牙移動7, 14, 21日後にそれぞれラットを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300μmの範囲で横断方向に厚さ4μmで連続的に薄切し、各種染色を行った。

研究①: 観察部位はKikutaら²²⁾の方法を参考にし、上顎右側第一臼歯の近心1/4の歯周組織で、近心歯根の中心(M)と遠心頬側歯根の中心(DB)を結ぶ線とそれに垂直な線で形成される領域とした。光学顕微鏡下200倍にて観察した（図1）。

研究②: 観察部位はHikida⁷⁾らの方法を参考にし、上顎左側第一臼歯の遠心口蓋根を観察、口蓋側歯槽頂から300μm根尖側までを「A領域」、根間中隔歯槽頂の根尖側150μmから300μm根尖側までを「B領域」とした（図4）。これは、OFおよびHF群において「A領域」は圧迫側となる一方、「B領域」は牽引側となる。JF群において7日目はOF群と同様であるが、14日目および21日目においては圧迫側と牽引側が転換する。

4) 組織化学染色および免疫組織化学染色

研究①②ともにヘマトキシリン・エオジン重染色（H.E.染色）は、試料の脱パラフィン後、通法に従って行った。免疫組織化学染色は、試料の脱パラフィン後、各切片は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。各切片は、tris-buffered saline（TBS）で洗浄し、一次抗体を室温で1時間反応させた。一次抗体には、polyclonal ウサギ抗 Wnt7a 抗体（Abcam 社, USA: 希釈倍率 1: 100）、polyclonal ウサギ抗 Caspase-3 抗体（Cell Signaling Technology, Inc, USA: 希釈倍率 1:400）、polyclonal ウサギ抗 Dkk1

抗体（R&D Systems 社, USA: 希釈倍率 1:100）を用いた。次に、二次抗体には Histofine Simple Stain MAX-Po (multi) 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 tris-buffered saline (TBS) で洗浄し、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB: Merck Kagan, Darmstadt, Germany) にて発色後、マイヤーの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、陽性コントロールとして、骨芽細胞を陽性細胞とした。陰性コントロールとして一次抗体の代わりに TBS を用いた。茶褐色に染色された細胞を陽性細胞とした。

5) Wnt7a, Caspase-3 ならびに Dkk1 の陽性細胞率

研究①, ②ともに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、関心領域中の全セメント芽細胞中の陽性細胞数を細胞率とした。各群の平均値を算出し、比較検討した。

2. *In vitro* study

1) HCEM の細胞培養

HCEM は当時の高田隆教授（広島大学）から享受された。HCEM の培養は, Kitagawa ら²³⁾ の方法に従い, α -MEM (Wako, Osaka, Japan) に 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペニシリン-G (Sigma Chemical Co, MO, USA), 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の硫酸ゲンタマイシン (Sigma Chemical Co, MO, USA) を混合した培地を用い 37 °C で培養した。

2) 圧迫力の適用

HCEM は 10cm dish におおよそ 7.0×10^6 cells/well なるように播種し, near confluent になった時点で 1 % FCS 含有 α MEM 培地に変更した。Yamaguchi ら²⁴⁾ の方法に従い, 80 mm のカバーガラス, 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) を再現した。圧

迫力を負荷しない (control) 群, 至適圧迫力 (1.0 g/cm²) 群, 強い圧迫力 (4.0 g/cm²) 群とした (図 5)。

3) Wnt7a 阻害薬 (Dkk1) の添加

Wnt7a 阻害実験は, CF を負荷する前に, Wnt の共働レセプターLRP5/6 のリガンドである 150 ng/ml の Dkk1 (R&D Systems 社, USA) を培地に添加することで行った²⁵⁾。

分銅による圧迫力をかけていないものを control 群, 1.0 g/cm²群に添加したものを 1.0 g/cm² +Dkk1 群, 4.0 g/cm²群に添加したものを 4.0 g/cm² +Dkk1 群と設定した (図 5)。

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

RNeasy Mini kit (Qiagen Co., Tokyo, Japan) を使用し total RNA Prime Script™ RT Reagent Kit (Takara Co., Shiga, Japan) を用いてプロトコールに従って cDNA を作製した。Real-time PCR は SYBR Green I を用いたインカレーター法にて行った。Real-time PCR は Thermal Cycler (TP-800 Thermal Cycler Dice; Takara) にて行い, PCR 反応は DNA 変性を 95°C で 5 秒間, アニーリングおよび伸長を 60°C で 30 秒間を 40 サイクル行い, Wnt7a, Caspase-3, RANKL の遺伝子発現量の検討を行った。使用した PCR プライマーは DNA 配列を設計したものを Takara 社から受託合成した。それぞれの cDNA 配列を参照して設計した。プライマー配列は表 1 に示す。

3. 統計処理

4 群間の差の比較は Kruskal-Wallis 検定で行い, 2 群間の比較は Mann-Whitney *U* 検定を行った。有意水準は 3 群間では †: $p < 0.05$ および ††: $p < 0.01$ とし, 2 群間では * $p < 0.05$ 及び ** $p < 0.01$ とした。統計分析には SPSS (SPSS version 28.0®, IBM Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いた。

結 果

in vivo 研究

1. 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)

研究①：歯の移動 1, 3, 5, 7 日後の組織像において、対照群の歯周組織は、比較的密な結合組織および線維芽細胞が認められた（図 6a-d）。10 g 群の 1, 3, 5, 7 日目および、50 g 群の 1, 3, 5 日目において歯根表面に著変はなかった（図 6e-k）。50 g 群では、7 日目において歯根表面は一部波状に吸収し、吸収窩に多核の細胞が認められ、歯根吸収窩はセメント質及び象牙質まで及んでいた（図 6l）。

研究②：対照群の 7, 14, 21 日目「A, B 領域」において、歯根表面のセメント質から歯槽骨に向かって水平方向に走行する線維性結合組織と線維芽細胞が認められた。歯根表面のセメント質は比較的平滑な面を呈していた（図 7a-f）。

OF 群の 7, 14, 21 日目「A, B 領域」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ったが、歯根表面のセメント質に多核破骨（歯）細胞を含む歯根吸収窩は認められなかった（図 7g-l）。

HF 群の 7 日目「A 領域」において、歯根表面に多核破骨（歯）細胞、歯根吸収窩が認められ（図 7m）、14 日目では歯根吸収窩が徐々に増加（図 7n）、21 日目ではさらに多核破骨（歯）細胞を含む象牙質まで達する歯根吸収窩が多数認められた（図 7o）。「B 領域」において 14 および 21 日目では線維性結合組織と線維芽細胞の走行は伸展していた（図 7p, r）。

JF 群の 7 日目「A, B 領域」において、OF 群と同様に線維性結合組織および線維芽細胞の走行は不規則であったが、歯根表面のセメント質に多核破骨（歯）細胞を含む歯根吸収窩は認められなかった（図 7s, v）。14 日目「A, B 領域」においては多核破骨（歯）細胞を含む歯根吸収窩が認められ（図 7t, w）、21 日目「A, B 領域」において多数認められた（図 7u, x）。

2. Wnt7a, Caspase-3 ならびに Dkk1 の免疫組織化学染色

研究①：対照群の 1, 3, 5, 7 日目において、Wnt7a および Caspase-3 陽性細胞はほとんど認められなかった（図 8, 9a-d）。10 g 群において、3 日目から経時的に Wnt7a 陽性細胞の発現が多く認められ、Caspase-3 陽性細胞はほとんど認められなかった（図 8, 9e-h）。一方 50 g 群で、3 日目には Wnt7a 陽性細胞が認められたが、7 日目には歯根吸収部位にはほとんど認められなかった（図 8i-l）。また、50 g 群において Caspase-3 陽性細胞が 3, 5 日目に発現し、7 日目には歯根吸収部位に

も認められた (図 9i-l) 。 Dkk1 の陽性細胞は, 対照群, 10 g 群, 50 g 群の 1, 3, 5, 7 日目を通して観察されたが, 3 日目では 10 g 群および 50 g 群にて多く認められ, 5, 7 日目においては 50 g 群でさらに多く認められた (図 10a-l) 。

研究② : Wnt7a 陽性細胞は, 対照群の 7, 14, 21 日目「A, B 領域」, HF 群の 7, 14, 21 日目「A 領域」, JF 群の 14, 21 日目「A 領域」および 21 日目「B 領域」においてほとんど認められなかった (図 11a-f, m-o, t, u, x) 。 OF 群においては 7, 14, 21 日目を通して認められ, 7 日目の「A, B 領域」にて多く認められた (図 11g-l) 。 HF 群の 7, 14, 21 日目「B 領域」において観察され (図 11p-r) , JF 群においては, 7 日目の「A 領域」および 7, 14 日目の「B 領域」において観察され, 7 日目の「A, B 領域」にて多く認められた (図 11s, v, w) 。

Caspase-3 陽性細胞は, 対照群の 7, 14, 21 日目「A, B 領域」, OF 群の 7, 14 日目「A 領域」および 7, 14, 21 日目「B 領域」, HF 群の 14 日目「B 領域」, JF 群の 7 日目「A, B 領域」においてほとんど認められなかった (図 12a-l, p, s, v) 。 OF 群においては 21 日目「A 領域」に認められた (図 12i) 。 HF 群の 7, 14, 21 日目「A 領域」および 14, 21 日目の「B 領域」で認められ, 21 日目の「A 領域」にて多く認められた (図 12m-o, q, r) , JF 群においては, 14 日目の「A, B 領域」で認められ, 21 日目の「A, B 領域」にて多く認められた (図 12t, u, w, x) 。

Dkk1 陽性細胞は, 対照群の 7, 14, 21 日目「A, B 領域」, OF 群の 7, 14 日目「A 領域」および 7, 14, 21 日目「B 領域」, HF 群の 14 日目「B 領域」, JF 群の 7 日目「A, B 領域」においてほとんど認められなかった (図 13a-l, p, s, v) 。

OF 群においては 21 日目「A 領域」に認められた (図 13-i) 。 HF 群の 7, 14, 21 日目「A 領域」および 14, 21 日目の「B 領域」において認められ, 21 日目の「A 領域」にて多く認められた (図 13m-o, q, r) , JF 群においては, 14 日目の「A, B 領域」において認められ, 21 日目の「A, B 領域」にて多く認められた (図 13t, u, w, x) 。

3. Wnt7a, Caspase-3 ならびに Dkk1 陽性細胞率の定量的評価

研究①：Wnt7a の陽性細胞率は，5, 7 日目の 10 g 群において対照群および 50 g 群と比較して有意に増加した。Caspase-3 の陽性細胞率は，50 g 群において対照群および 10 g 群と比較して有意に増加した（図 14a, b）。

Dkk1 の陽性細胞率は，3 日目で対照群と比較し 10 g および 50 g 群にて有意に増加し，5, 7 日目においては対照群および 10 g 群と比較して 50 g 群が有意に増加した（図 14c）。

研究②：Wnt7a の陽性細胞率は，OF 群「A, B 領域」，HF 群「A, B 領域」，JF 群「B 領域」において，対照群と比較し有意な増加を認め，さらに HF 群「A, B 領域」において JF 群「A, B 領域」と比較し，有意な増加が認められた（図 15a）。Caspase-3 の陽性細胞率は，OF 群「A 領域」，HF 群「A, B 領域」，JF 群「A, B 領域」において，対照群と比較し有意な増加を認め，さらに JF 群「A, B 領域」において HF 群「A, B 領域」と比較し，有意な増加が認められた（図 15b）。Dkk1 の陽性細胞率は，OF 群「A 領域」，HF 群「A, B 領域」，JF 群「A, B 領域」において，対照群と比較し有意な増加を認め，さらに JF 群「A, B 領域」において HF 群「A, B 領域」と比較し，有意な増加が認められた（図 15c）。

***in vitro* 研究**

1) HCEM での Wnt7a, Caspase-3 ならびに RANKL の遺伝子発現に対する CF の影響

Wnt7a の遺伝子発現は，1.0 g/cm² 群において control 群と比較し，3 時間後から有意に増加し，6 時間後にピークを示したが，9 時間後以降は減少した。一方，Wnt7a の遺伝子発現は，4.0 g/cm² 群において control 群と比較し，3 時間後から有意に減少した（図 16a）。Caspase-3 の遺伝子発現は，1.0 g/cm² 群において control 群と比較し増加した。4.0 g/cm² 群において control 群と比較し，3, 6, 9 時間後に有意に増加し，ピークは 6 時間後であった（図 16b）。また，RANKL の遺伝子発現も同様に，1.0 g/cm² 群において control 群と比較し増加した。4.0 g/cm² 群において control 群と比較し，3, 6, 9, 12 時間後に増加し，12 時間後にピークを示した（図 16c）。一方，control 群では Wnt7a および Caspase-3, RANK の mRNA 発現に大きな変化は認められなかった（図 16a-c）。

2) Wnt7a 阻害剤 (Dkk1) が Wnt7a, Caspase-3 ならび RANKL 遺伝子の発現に及ぼす影響

Wnt7a の遺伝子発現は control 群と比較し、1.0 g/cm² + Dkk1 群および 4.0 g/cm² + Dkk1 群で減少傾向を示した (図 16a)。Caspase-3 の遺伝子発現は、1.0 g/cm² + Dkk1 群において control 群と比較して増加し、6, 9 時間後に有意に増加した。4.0 g/cm² + Dkk1 群において control 群と比較し、3, 6, 9 時間後に有意に増加した (図 16b)。RANKL の遺伝子発現は 1.0 g/cm² + Dkk1 群において control 群と比較して増加し、9, 12 時間後に有意に増加した。4.0 g/cm² + Dkk1 群において control 群と比較して増加し、3, 6, 9, 12 時間後に有意に増加した (図 16c)。

考 察

本研究の結果から *in vivo* 研究①では、50 g 群では対照群と 10 g 群と比較して多くの多核の破骨 (歯) 細胞の発現を認めた。また、研究②の HE 染色においては Hikida ら⁷⁾ と同様に、JF 群および HF 群の「A 領域」で 21 日目にかけて歯根表面の多核破骨 (歯) 細胞と歯根吸収窩の増加が認められた。これは強い矯正力により出現する多核破骨 (歯) 細胞がセメント質を吸収することにより歯根吸収が生じるという報告²⁶⁾ を裏付ける結果であった。Eross ら²⁷⁾ は短期間で多方向に矯正力が負荷される *jiggling* 力において至適矯正力であっても重度歯根吸収を惹起すると報告しており、本研究でも同様に HF 群より JF 群で歯根吸収の増加が観察された。

また研究①では、矯正力を負荷したラットのセメント質では 10 g 群の 3, 5, 7 日目で Wnt7a 陽性細胞が多く認められたのに対し歯根吸収像はほとんど認められず、50 g 群においては Wnt7a 陽性細胞数が各日数で減少し歯根吸収像が多く観察された。さらに研究②では 21 日目の OF 群「A・B 領域」において Wnt7a 陽性細胞数は対照群と比較し有意に増加したが、HF 群、JF 群の順に減少した。*in vitro* においては、Wnt7a の遺伝子発現量は control 群と比較し、1.0 g/cm² 群で 3 時間後から有意に増加し、4.0 g/cm² 群では 3 時間後以降から減少した。これらのことから至適矯正力を負荷した群では Wnt7a が増加し歯根吸収が抑制されるのに対し、強い矯正力や *jiggling* 力を負荷した群では Wnt7a が減少し歯根吸収が発現するといえる。Hwang ら¹⁷⁾ は、Wnt7a は関節軟骨細胞の apoptosis を阻害することを示している。また、Wnt シグナルは細胞質内の β -catenin のタンパク質量を調整することにより遺伝子発現を制御することが知られており、これを欠損させたマウスの歯根膜では、RANKL / osteoprotegerin 比率の亢進により破骨細胞の活性が上昇し、広範な

歯根吸収が観察されると報告されている¹⁶⁾。ゆえに Wnt7a が至適矯正力を負荷した際にはセメント質の apoptosis を阻害し、歯根吸収を阻害したが、jiggling 力を負荷した際には Wnt7a が抑制されることで破骨細胞が活性化され歯根吸収が発現したと思われる。近年、癌・感染症・筋骨格系疾患などの疾患で Wnt7a の阻害因子である Dkk1 発現の増加が報告されており、その発現の増加は疾患転帰不良と関連していると考えられている²⁸⁾。本研究①での Dkk1 陽性細胞は、5, 7 日目において強い矯正力群において有意に増加した。また、研究②における Dkk1 陽性細胞は、21 日目においては、OF 群と比較し HF 群および JF 群において有意な増加を認め、歯根吸収が最も多くみられた JF 群において最も多く認められた。研究①、②の結果により、Dkk1 陽性細胞発現は歯根吸収の出現と関連しているといえる。また、Dkk1 と Wnt7a の陽性細胞の発現は相対する増減を示し、強い矯正力や jiggling 力を負荷した際に Dkk1 が Wnt7a を阻害していると考えられる。実際に *in vitro* において Dkk1 を添加した群では Wnt7a が抑制された。

また Wnt7a と apoptosis と破骨細胞活性との関連性について Caspase-3, RANKL 発現を検討した結果、研究①において、対照群および 10 g 群と比較し、50 g 群の 3 日目で Caspase-3 陽性細胞が発現し、経時依存的に 7 日目で多く認められた。研究②の対照群および OF 群と比較し HF 群、JF 群の 7 日目で陽性細胞が出現し 21 日目で多く認められた。*In vitro* では、Caspase-3, RANKL の遺伝子発現は、control 群と比較し、4.0 g/cm², 1.0 g/cm² + Dkk1 群, 4.0 g/cm² + Dkk1 群において増加し、RANKL の遺伝子発現においても増加した。

以上より、至適矯正力を加えた際には Wnt7a の発現が増加し、Dkk1 の発現は抑制され、セメント芽細胞の Caspase-3 を介した apoptosis が抑制され、セメント質の分化形成が促進されることで歯根吸収の発生を抑制することが考えられる。しかしながら、jiggling 力や強い矯正力を負荷した際には Dkk1 の発現が増加することにより Wnt7a の発現が抑制され、Caspase-3 を介した apoptosis の発現が増加した結果、RANKL が増加し、歯根吸収が多く発生したといえる可能性がある。またこれらのセメント質近傍での Wnt7a の発現が優位になれば歯根吸収の発生が抑制される可能性がある。これにより矯正力の負荷時に Wnt7a を発現させることで歯根吸収を減少させる可能性が考えられる。

しかし, Lan ら²⁹⁾ は, Wnt7a の過剰発現は apoptosis を増強することにより非古典的経路を介した肝細胞癌細胞の成長と浸潤を阻害すると報告している。このことから, Wnt7a の発現が著しく増加すると apoptosis を増加させるという逆の働きをする可能性もあるため, 今後さらなる検討の余地がある。また, Li ら³⁰⁾ は, マウス骨芽細胞様細胞および初代頭蓋骨芽細胞で TNF- α 処理により, Dkk1 のタンパク質レベルが有意に増強されることを明らかにし, BMP2 誘導性骨前駆細胞が Dkk1 による Wnt シグナルの阻害が, RANKL を介した破骨細胞形成を促進することも報告されている³¹⁾。また, Dkk1 を介した apoptosis は Caspase-3/7 を介して作用すると報告されており³²⁾, Caspase 阻害剤の適用により, Dkk1 を介した apoptosis を回避できることを示している。

これらのことより, 至適矯正力を負荷した際にはセメント質での Wnt7a の発現が増加し Caspase-3 の発現が減少しセメント芽細胞の apoptosis が抑制され歯根吸収は発生しないが, 強い矯正力を負荷した際には Wnt7a の発現が Dkk1 の発現により阻害されセメント芽細胞の Caspase-3 を介した apoptosis が促進し, RANKL の発現が増加することで破骨細胞が活性化し, 歯根吸収が発生すると考えられる。また, Jigging 力は, 広範囲な炎症を引き起こすため Dkk1 の発現が増加し, Wnt7a の発現が強く抑制されることにより歯根吸収がさらに発現したと考えられる。また Wnt7a は apoptosis 発現抑制だけでなく間葉系幹細胞のセメント質形成の促進作用を有することが報告されている³³⁾ ことから, 今後臨床において注射等で歯根膜に投与し Wnt7a の発現を優位にすることにより歯根吸収の発生を抑制するだけでなく, 吸収した歯根の修復もできる可能性が考えられる。

結論

本研究の結果から, 至適矯正力においては Wnt7a の発現によりセメント質形成が優位となり, Caspase-3, Dkk1 が抑制されることでセメント芽細胞のアポトーシスも抑制され, 歯根吸収は発生しなかった。一方, Jigging や強い矯正力においては Dkk1 が増加し, Wnt7a が抑制されセメント芽細胞でのアポトーシスが促進されることで歯根吸収が発生する可能性が示された。

文献

1. Kaley J, Phillips C: Factors related to root resorption in edgewise practice, Angle Orthod, 61: 125-132,1991.

2. Mirabella AD, Artun J: Risk factors for apical root resorption of maxillary anterior teeth in adult orthodontic patients, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*,108: 48-55,1995.
3. 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: 101-110, 2013.
4. 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. *J Hard Tissue Biol*, 25: 345-350, 2016.
5. 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: 427-434, 1998.
6. Brezniak N, Wasserstein A: Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part II: The clinical aspects. *Angle Orthod*, 72: 180-184, 2002.
7. Hikida T, Yamaguchi M, Shimizu M, Kikuta J, Yoshino T, Kasai K: Comparison of orthodontic root resorption under heavy and jiggling forces during experimental tooth movement in a rat model. *Korean Journal Orthod*, 46: 228-241, 2016.
8. 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.
9. Krishnan V, Davidovitch Z: Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 129: 469, 2006.
10. Goto H, Kikuta J, Shimizu M, et al: Heavily Induced Root Resorption Stimulates Wnt5a Expression in Cementoblasts, *Int J Oral-Med Sci*,17: 69-80, 2019.
11. Takagi K, Shimizu M, Negishi S: Effect of Jiggling Force on Notch and Wnt Signaling Pathways during Experimental Tooth Movement in Rat, *Int J Oral-Med Sci*, 20: 255-264, 2022.
12. Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y: Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med*, 91: 15-23, 2013.

13. Lim WH, Liu B, Cheng D, Mah SJ, Helms JA: Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *J Periodontal Res*, 49: 751-759, 2014.
14. 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.
15. Dale TC: Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J*, 329: 209-223, 1998.
16. Yang L, Li Q, Zhang J, Li P, An P, Wang C, Hu P, Zou X, Dou X, Zhu L: Wnt7a promotes the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*, 47: 94, 2021. Doi: 10.3892/ijmm.2021.4927.
17. Hwang SG, Ryu J, Kim I, Jho EH, Jung HC, Kim K, Kim SG, Chun JS: Wnt7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J Biol Chem*, 18; 279: 26597-26604, 2004.
18. Zeng HB, Dong LQ, Xu C, Zhao XH, Wu LG: Artesunate promotes osteoblast differentiation through miR-34a/DKK1 axis. *Acta Histochem*, 122, 2020. doi: 10.1016/j.acthis.2020.151601.
19. Minato Y, Yamaguchi M, Shimizu M, Kikuta J, Hikida T, Hikida M, Suemitsu M, Kuyama K, Kasai K: Effect of Caspases and RANKL induced by heavy force in orthodontic root resorption. *Korean J Orthod*, 48: 253-261, 2018.
20. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Abiko Y: Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int*, 70: 117-126, 2002.
21. 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: 489-498, 2011.
22. 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: 140-147, 2015.
23. Kitagawa M, Tahara H, Kitagawa S, 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*, 39: 1035-1042, 2006.

24. Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K: RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res*, 85: 751-756, 2006.
25. Li S, Yang S, Ren Y, Dai H: Investigation of Wnt/ β -catenin signaling pathway on regulation of Runx2 in cementoblasts under mechanical stress in vitro. *West China J of Stom*, 33, 2015. doi: 10.7518/hxkq.2015.01.008.
26. Kvam E. Scanning electron microscopy of tissue changes on the pressure surface of human premolars following tooth movement. *Scand J Dent Res*, 80: 357-368, 1972.
27. Eross E, Turk T, Turk SE, Cakmak F, Jones AS, Vegh A, Papadopoulou AK, Darendeliler MA: Physical properties of root cementum: Part 25. Extent of root resorption after the application of light and heavy buccopalatal jiggling forces for 12 weeks: A microcomputed tomography study, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 147: 738-746, 2015.
28. Chae W, Alfred L M Bothwell A: Dickkopf1: An immunomodulatory ligand and Wnt antagonist in pathological inflammation. *Differentiation*, 108: 33-39, 2019.
29. Lan L, Wang W, Huang Y, Zhao C, Bu X: Wnt7a overexpression inhibits growth and migration of hepatocellular carcinoma via the β -catenin independent pathway. *Biomed Res Int*, 18, 2019. doi: 10.1155/2019/3605950.
30. Li S, Yin Y, Yao L, Zhao XH, Wu LG: TNF- α treatment increases DKK1 protein levels in primary osteoblasts via upregulation of DKK1 mRNA levels and downregulation of miR-335-5p. *Mol Med Rep*, 22: 1017-1025, 2020.
31. Fujita K, Janz S: Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer*, 6: 71, 2007. doi: 0.1186/1476-4598-6-71.
32. Scharr M, Scherer S, Hirt B, Neckel PH: Dickkopf1 induces enteric neurogenesis and gliogenesis in vitro if apoptosis is evaded. *Commun Biol*, 6: 808, 2023. doi: 10.1038/s42003-023-05072-x.
33. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, Shimauchi H: Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone*, 44: 805-812, 2009.

図および表

GAPDH	Fw: 5´ - GCACCGTCAAGGCTGAGAAC- 3´
	Rv: 5´ - TGGTGAAGACGCCAGTGA- 3´
Wnt7a	Fw: 5´ - TGCATGAGTGAAAGCCTACG- 3´
	Rv: 5´ - TGATGAAGAGCCTTGTGTGC- 3´
Caspase- 3	Fw: 5´ - AAGGCAGAGCCATGGACCA- 3´
	Rv: 5´ - CTGGCAGCATCATCATCCACACATAC- 3´
RANKL	Fw: 5´ - TGGATGCCTTGAATAATAAGCAGGA- 3´
	Rv: 5´ - AATTGCGGCACTTGTGGAA- 3´

表 1

表 1 real-time PCR で使用したプライマー

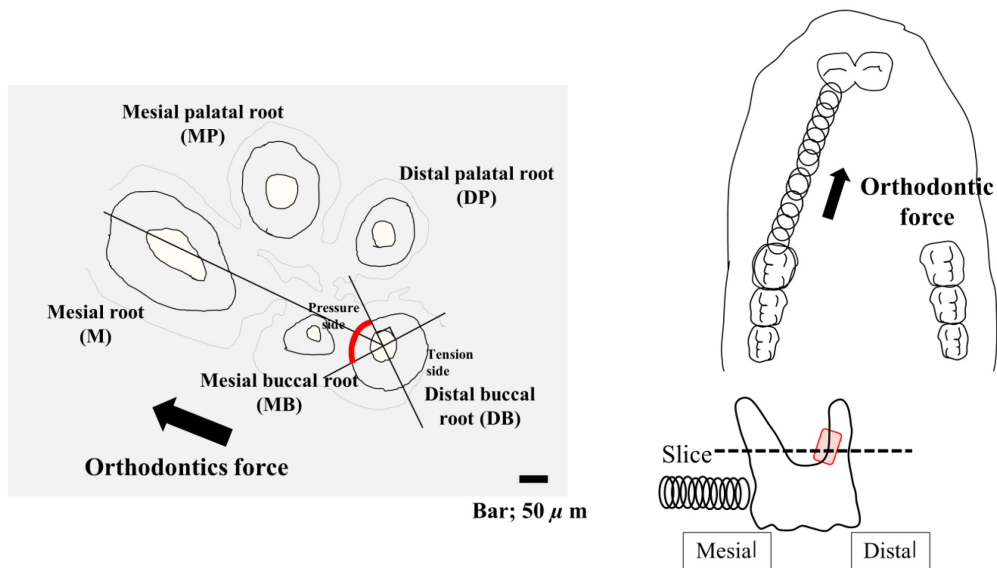


図 1 研究① 歯牙移動モデルと観察部位

研究①の歯牙移動は、コイルスプリングを用いて歯を近心移動させた。矯正力を負荷しない対照群，至適矯正力（10 g）群，または強い矯正力（50 g）群を負荷した 3 群に分類し，歯の移動を 1, 3, 5, 7 日間行った。観察部位は上顎右側第一大臼歯の近心 1/4 の歯周組織で，近心歯根の中心（M）と遠心頬側歯根の中心（DB）を結ぶ線とそれに垂直な線で形成される領域とした。大きな矢印：矯正力の方向，Bar= 500 μm，MP: 近心口蓋根，DP: 遠心口蓋根，MB: 近心頬側根

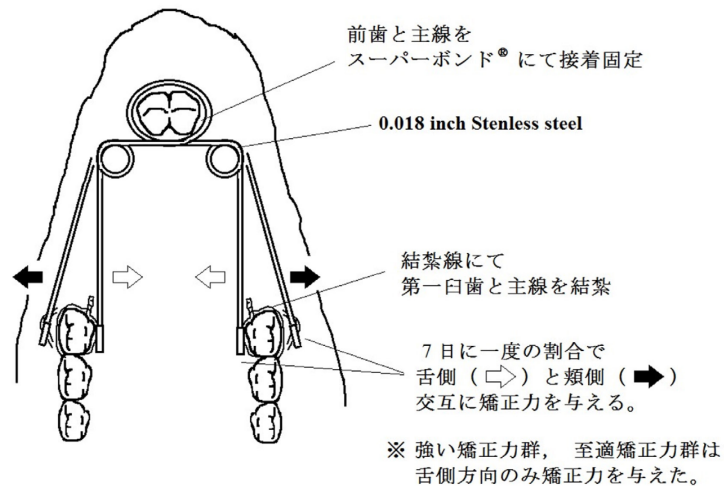


図 2

図 2 研究② Jigging モデルによる歯牙移動

研究②の歯牙移動は、クワドヘリックス型装置（直径 0.018 inch，ステンレス製ワイヤー）を用いて，装置と上顎第一臼歯部を 0.008 inch のステンレス製結紮線で結紮し歯牙移動した。上顎第一臼歯を 10 g または 50 g の力で舌側（口蓋側）または頬側に移動させた。

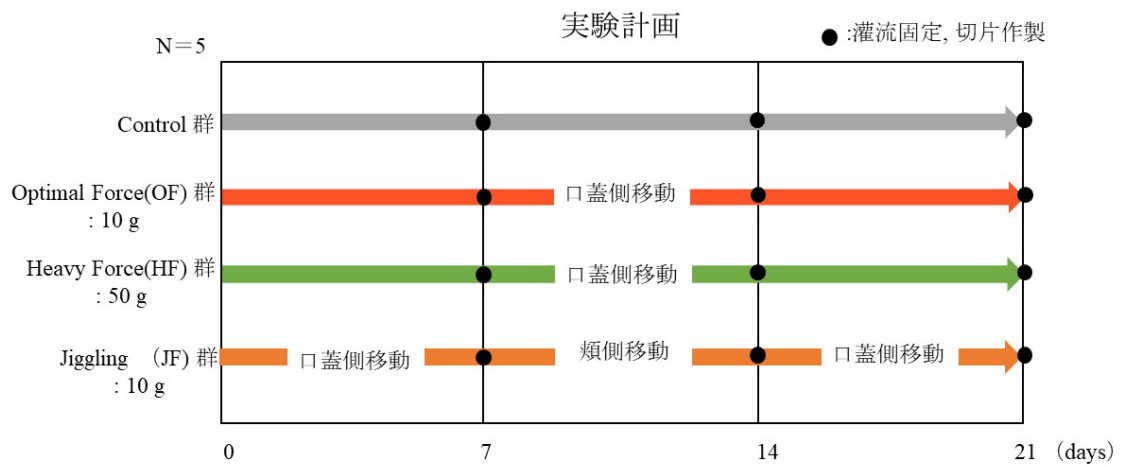


図3

図3 研究②のスケジュール

対照群, 至適矯正力 (10 g) (Optimal force; OF) 群, 強い矯正力 (50 g) (Heavy force; HF) 群, 至適矯正力 (10 g) の Jiggling (Jiggling force; JF) 群の 4 群に分類した。力の方向については, OF および HF 群では舌側 (口蓋側) 方向へ, JF 群では舌側 (口蓋側), 頬側と 7 日間毎に方向転換を行った。

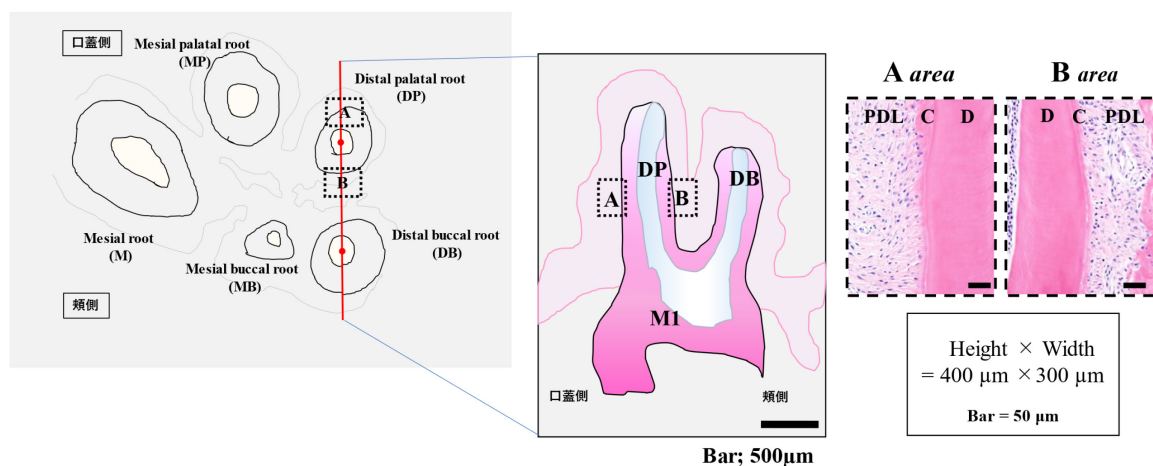


図 4

図 4 研究②の観察部位を示す模式図

観察部位は Hikida らの方法を参考にし、上顎左側第一臼歯の遠心口蓋根を観察、口蓋側歯槽頂から 300 μm 根尖側までを「A 領域」、根間中隔歯槽頂の根尖側 150 μm から 300 μm 根尖側までを「B 領域」とした。これは、OF および HF 群において「A 領域」は圧迫側となる一方、「B 領域」は牽引側となる。JF 群において 7 日目は OF 群と同様であるが、14 日目および 21 日目においては圧迫側と牽引側が転換する。

DP: 遠心口蓋側根, DB: 遠心頬側根, PDL: 歯根膜, bar: 500 μm

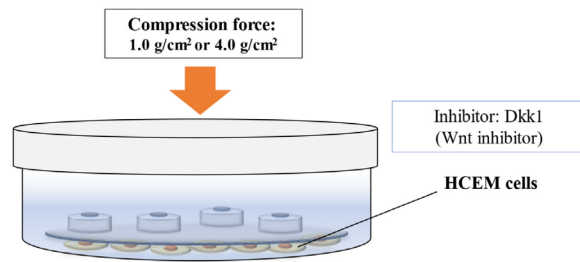


図 5

図 5 *In vitro* での圧迫側モデル

HCEM を near confluent になるまで培養した後、カバーガラスを上置き、至適圧迫力（1.0 g/cm²）または強い圧迫力（4.0 g/cm²）が加わるよう分銅を用いて負荷した。圧迫力に対する Wnt7a, Caspase-3, RANKL の遺伝子発現量の変化を調べた。

また、Wnt7a 阻害剤である Dkk1 を添加し、圧迫力に対する阻害剤を添加した場合の Wnt7a, Caspase-3, RANKL の遺伝子発現量の変化を調べた。

Results (H.E.)

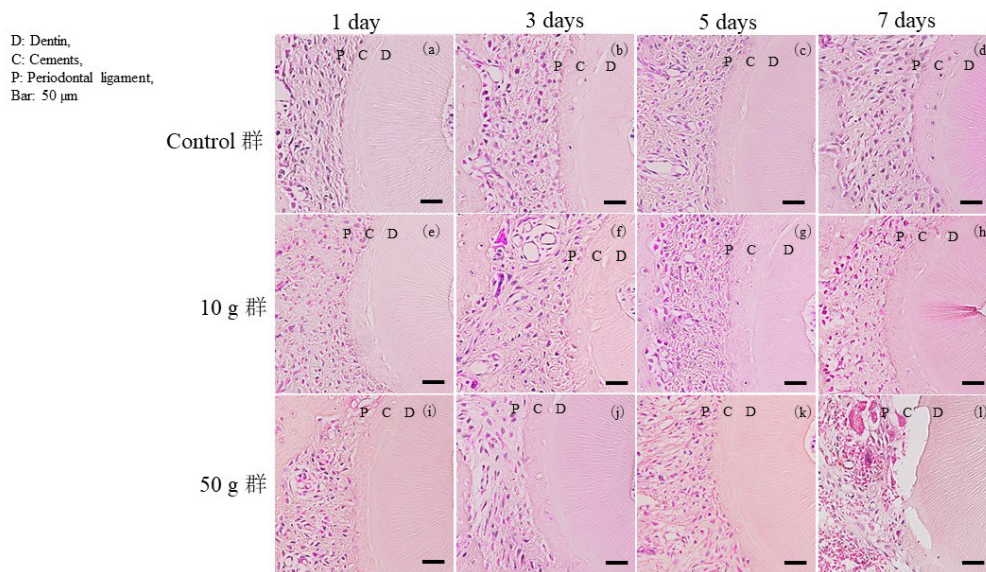


図6

図 6 研究①における病理組織学的染色 (H. E.染色 \times 200)

bar=50 μ m, P: 歯根膜, C: セメント質, D: 象牙質

5日目および7日目には、歯槽骨表面に多数の不規則な吸収窩が観察され、単核細胞および多核細胞が観察された。50 g 群では、7日目に歯根表面が部分的に波打ち、吸収窩に多核細胞が観察された。歯根吸収窩はセメント質と象牙質にまで及んでいた。

Results (H.E.)

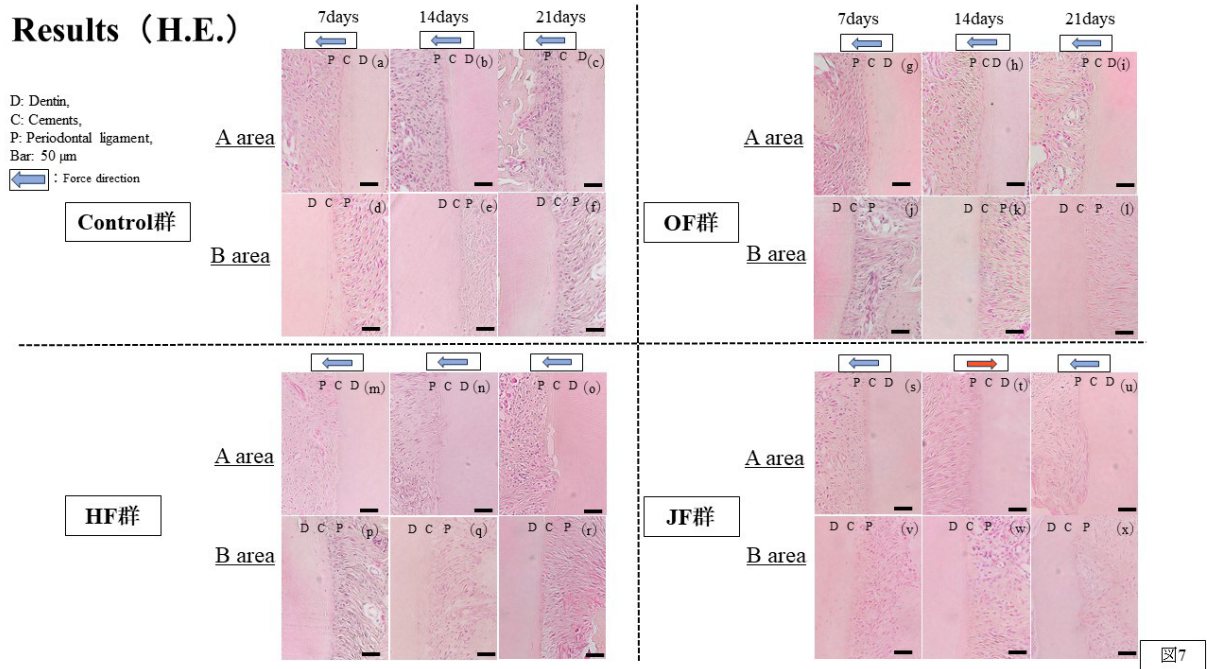


図7 研究②における病理組織学的染色 (H.E.染色×200)

OF 群の 7, 14, 21 日目「A, B 領域」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ったが、歯根表面のセメント質に多核破骨（歯）細胞を含む歯根吸収窩は認められなかった。

HF 群, JF 群の 7 日目「A 領域」において、歯根表面に多核破骨（歯）細胞と硝子様変性、さらに歯根吸収窩が認められ、14 日目では歯根吸収窩が徐々に増加、21 日目ではさらに多核破骨（歯）細胞を含む象牙質まで達する歯根吸収窩が多数認められた。JF 群では、「B 領域」の 21 日目においても歯根吸収窩が認められた。

bar=50 μm, P: 歯根膜, C: セメント質, D: 象牙質。

Wnt7a

D: Dentin,
C: Cements,
P: Periodontal ligament,
Arrow head: Wnt7a positive cell,
Bar: 50 μ m

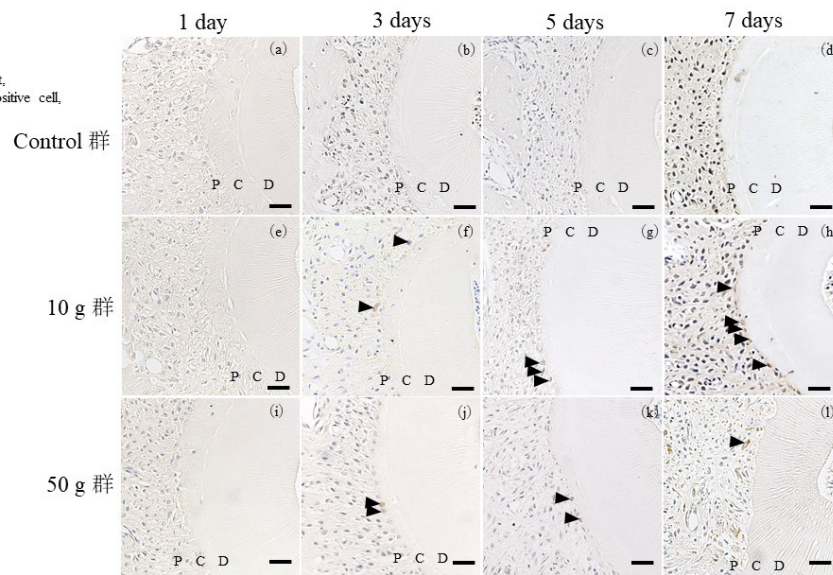


図8

図 8 研究①における Wnt7a の免疫組織化学染色 ($\times 200$)

対照群では 1, 3, 5, 7 日目には Wnt7a 陽性細胞はほとんど観察されないが, 10 g 群では 3 日目から経時的に多くの wnt7a 陽性細胞が観察される。一方, 50 g 群では 3 日目に Wnt7a 陽性細胞が観察されるが, 7 日目の歯根吸収部にはほとんど観察されない。

Arrow head : Wnt7a 陽性細胞, bar=50 μ m , P: 歯根膜、C: セメント質、D: 象牙質

Caspase-3

D: Dentin,
C: Cements,
P: Periodontal ligament,
Arrow head: Caspase3 positive cell,
Bar: 50 μ m

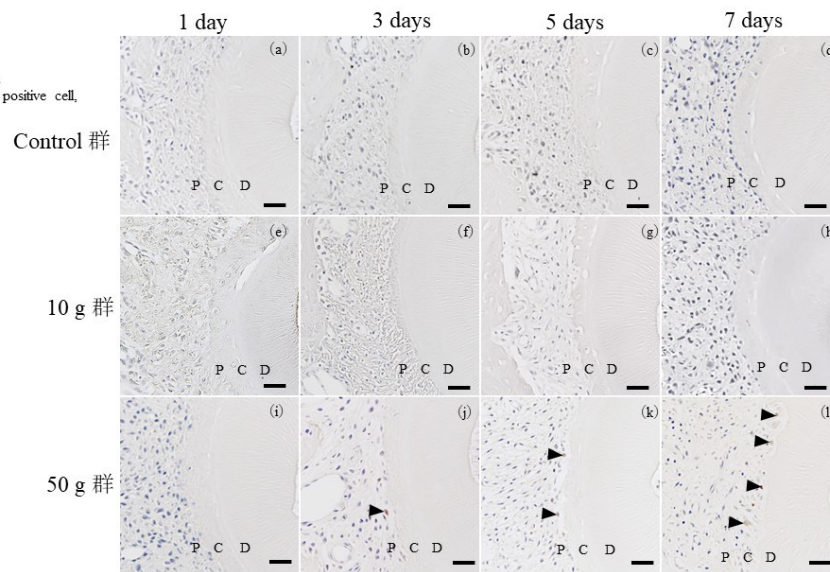


図9

図 9 研究①における Caspase-3 の免疫組織化学染色 (×200)

対照群では 1, 3, 5, 7 日目に Caspase-3 陽性細胞はほとんど観察されないが, 50 g 群では 3, 5 日目に Caspase-3 陽性細胞が出現し, 7 日目には歯根吸収領域にも観察される。

Arrow head ; Caspase-3 陽性細胞, bar=50 μ m , P: 歯根膜, C: セメント質, D: 象牙質

Dkk1

D: Dentin,
C: Cements,
P: Periodontal ligament,
Arrow head: Dkk1 positive cell,
Bar: 50 μ m

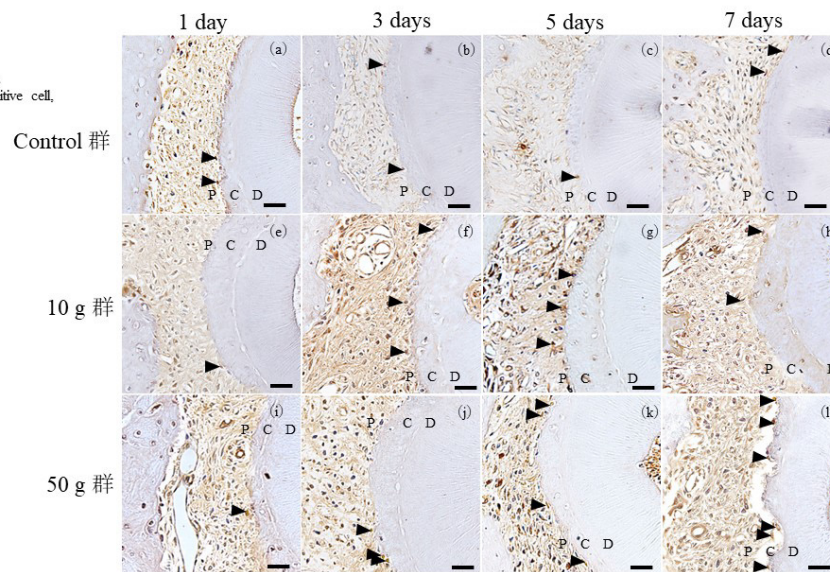


図10

図 10 研究①における Dkk1 の免疫組織化学染色 ($\times 200$)

Dkk1 陽性細胞は、1, 3, 5, 7 日目に対照群, 10 g 群, 50 g 群で観察されるが, 3 日目には 10 g 群と 50 g 群で, 5 日目と 7 日目には 50 g 群でより多く観察される。

Arrow head: Dkk1 陽性細胞, bar = 50 μ m, P: 歯根膜, C: セメント質, D: 象牙質

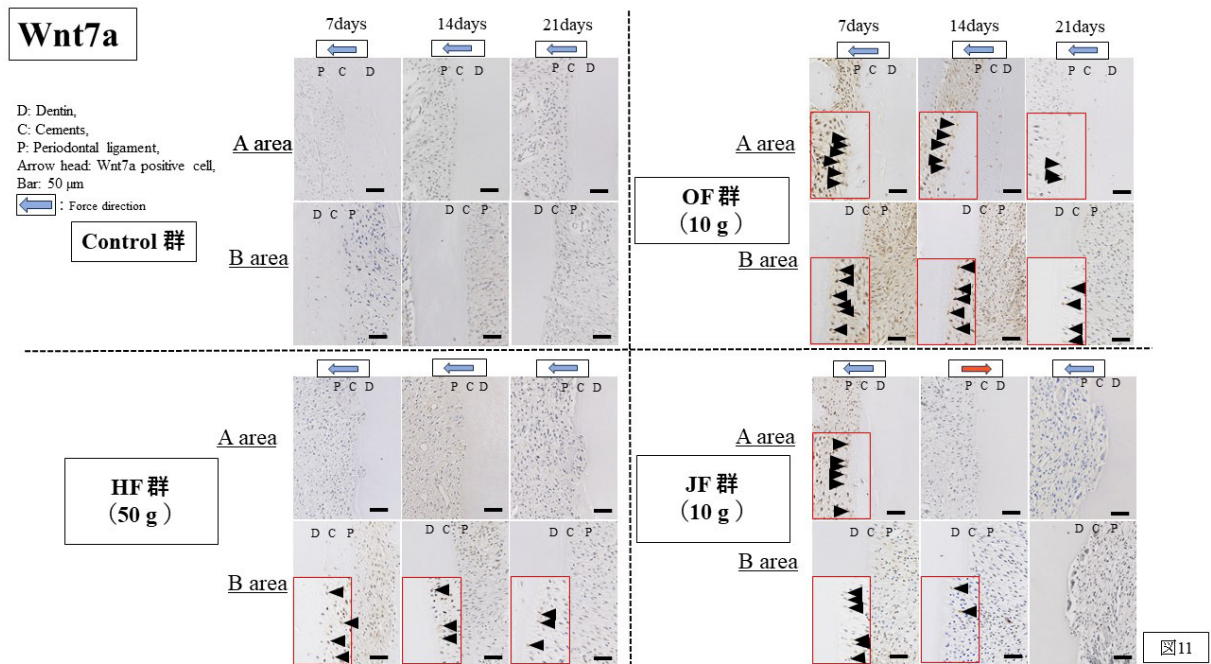


図 11 研究②における Wnt7a の免疫組織化学染色 (×200)

Wnt7a 陽性細胞は 7, 14, 21 日目 OF 群および 7 日目 JF 群の「A, B 領域」に多く観察される。

Arrow head: Wnt7a 陽性細胞, bar=50 μm, P: 歯根膜, C: セメント質, D: 象牙質

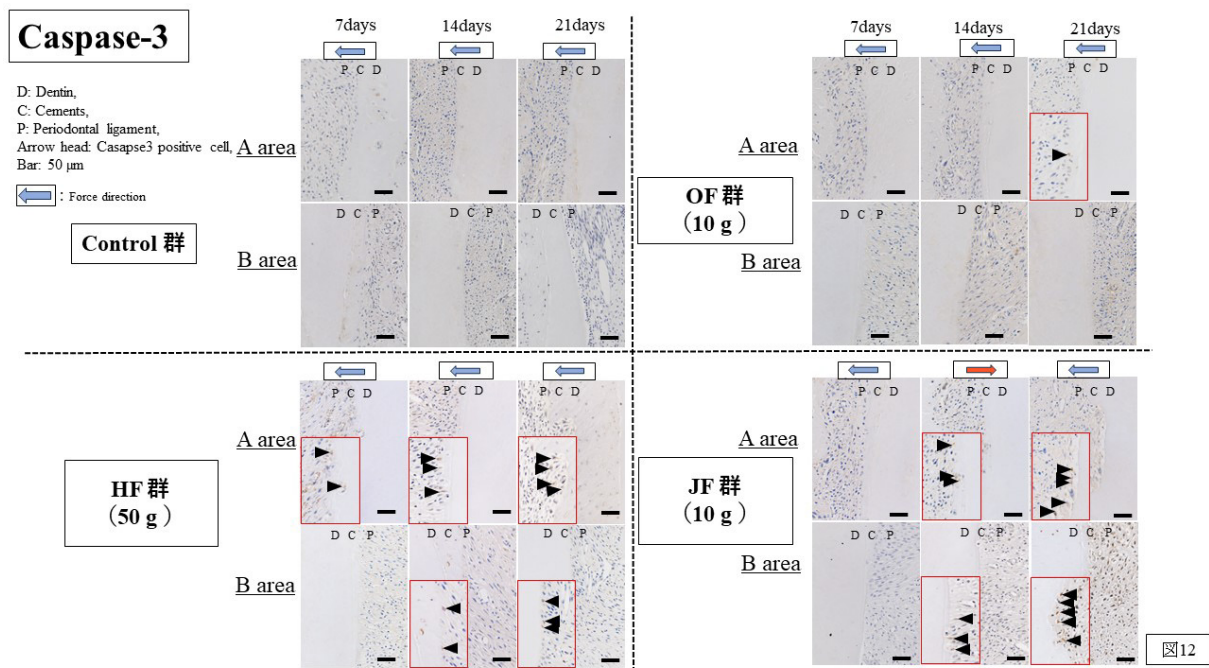


図 12 研究②における Caspase-3 の免疫組織化学染色 (×200)

Caspase-3 陽性細胞は 14, 21 日目 HF 群および JF 群の「A 領域」においての増加が認められる。

Arrow head: Caspase-3 陽性細胞, bar=50 μm, P: 歯根膜, C: セメント質, D: 象牙質

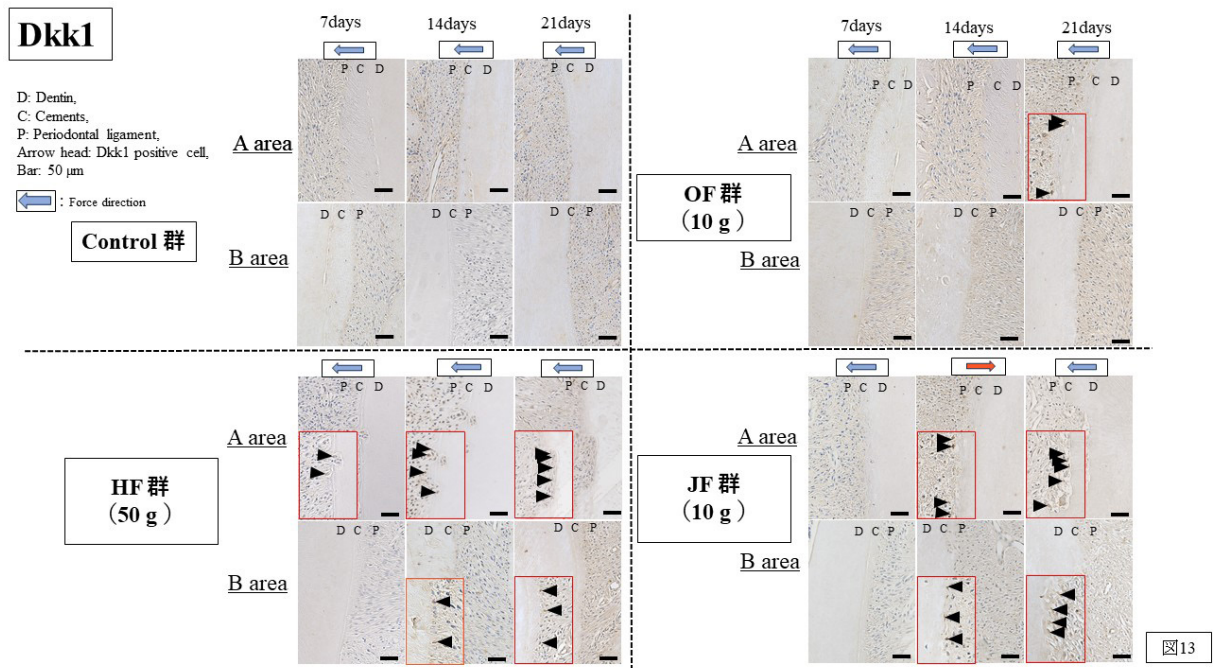


図 13 研究②における Dkk1 の免疫組織化学染色 (×200)

研究②において、Caspase-3 陽性細胞の 14, 21 日目 HF 群および JF 群の「A 領域」においての増加が認められる。

Arrow head: Dkk1 陽性細胞, bar=50 μm

, P: 歯根膜, C: セメント質, D: 象牙質

Results (cell count)

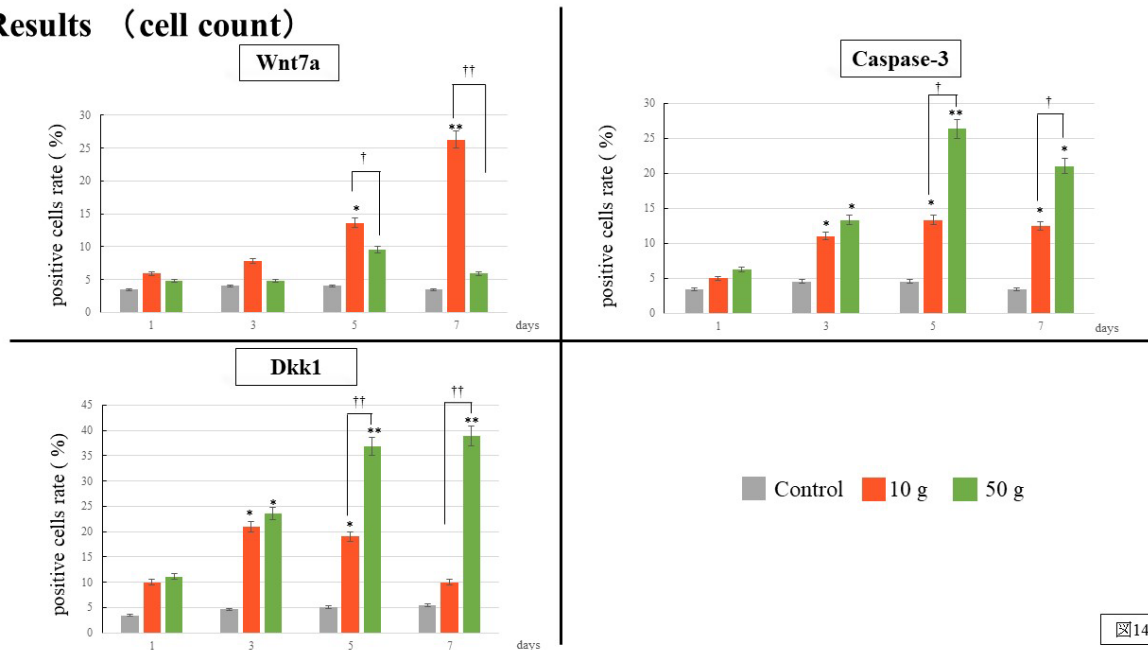


図14

図 14 研究①における Wnt7a, Caspase-3, Dkk1 陽性細胞率の 3 群間比較

Wnt7a の陽性細胞数は、5、7 日目の 10 g 群において対照群および 50 g 群と比較して有意に増加した。Caspase-3 の陽性細胞数は、50 g 群において対照群および 10 g 群と比較して有意に増加した。Dkk1 の陽性細胞数は、3 日目で対照群と比較し 10 g 群および 50 g 群にて有意に増加し、5、7 日目においては対照群および 10 g 群と比較して 50 g 群が有意に増加した。

*: $P < 0.05$ and, **: $P < 0.01$, Significant difference when compared with the control group.

†: $P < 0.05$ and, ††: $P < 0.01$, Significant difference when compared with the 50 g group.

Results

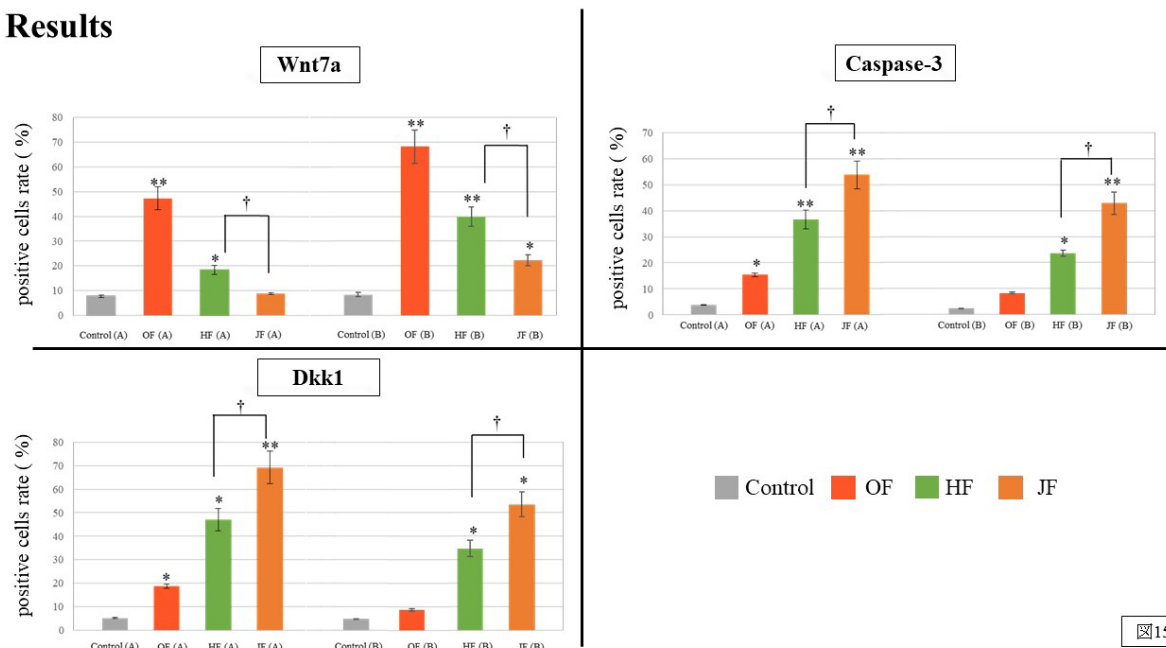


図15

図 15 研究②における 21 日目の Wnt7a, Caspase-3, Dkk1 陽性細胞率の 3 群間比較

Wnt7a の陽性細胞数は、OF 群「A, B 領域」、HF 群「A, B 領域」、JF 群「B 領域」において有意な増加を認められた。Caspase-3 の陽性細胞数は、OF 群「A 領域」、HF 群「A, B 領域」、JF 群「A, B 領域」において有意な増加を認め、さらに JF 群「A, B 領域」において HF 群「A, B 領域」と比較し、有意な増加が認められた。Dkk1 の陽性細胞数は、OF 群「A 領域」、HF 群「A, B 領域」、JF 群「A, B 領域」において有意な増加を認め、さらに JF 群「A, B 領域」において HF 群「A, B 領域」と比較し、有意な増加が認められた。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, Significant difference when compared with the control (A) .

†: $P < 0.05$, ††: $P < 0.01$, Significant difference when compared with the HF group.

Results (PCR)

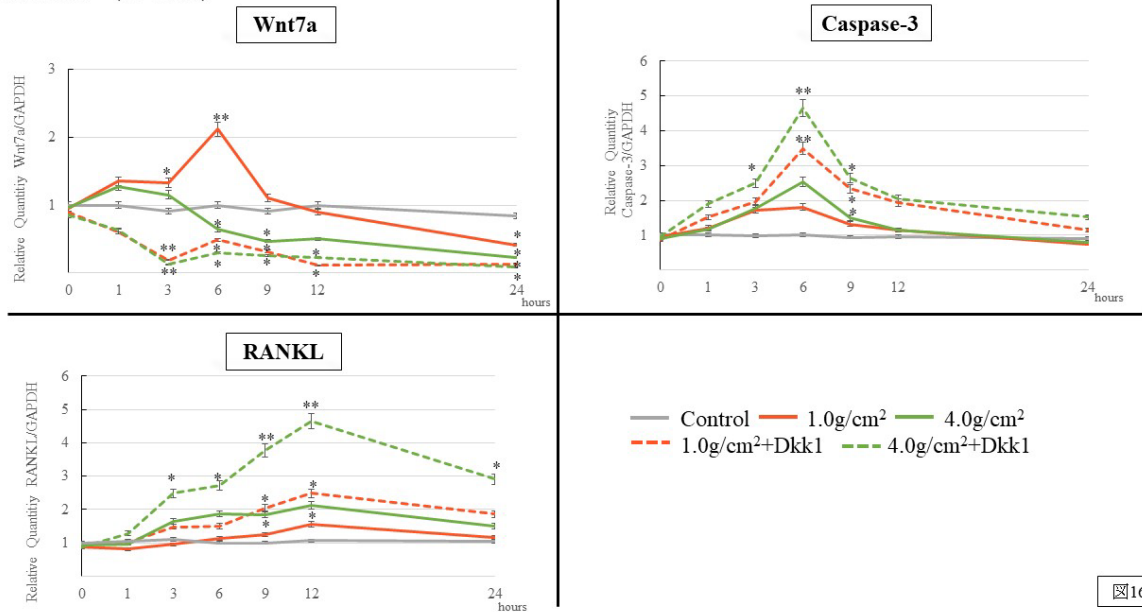


図 16 HCEM に圧迫力を負荷した際の Wnt7a, Caspase-3, RANKL の遺伝子発現量の比較

Wnt7a の遺伝子発現量は、1.0 g/cm² 群において有意に増加し、4.0 g/cm² 群において有意に減少した。Caspase-3 の遺伝子発現量は、4.0 g/cm² 群において 3, 6, 9 時間後に有意に増加した。RANKL の遺伝子発現量は 4.0 g/cm² 群において有意に増加した。Wnt7a 阻害剤の影響下では、Caspase-3 の遺伝子発現量は、1.0 g/cm² +Dkk1 群において 6, 9 時間後に有意に増加し、4.0 g/cm² +Dkk1 群において 3, 6, 9 時間後に有意に増加した。RANKL の遺伝子発現量は 4.0 g/cm² +Dkk1 群において 3, 6, 9, 12 時間後に有意に増加した。

* $P < 0.05$ and, ** $P < 0.01$, Significant difference when compared with control group