

氏名	小田垣 直弥		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5704号		
学位授与の日付	平成30年3月23日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	矯正歯の移動による Sclerostin 産生と骨代謝制御機構の解析		
論文審査委員	沢 禎彦 教授	池亀 美華 准教授	原 哲也 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

Sclerostin (Sc1) は骨細胞に特異的な分泌性蛋白質で、*SOST* 遺伝子によってコードされており、骨形成を抑制し、かつ骨吸収を促進させる。骨系細胞において 90-95% を占める骨細胞は、石灰化した骨基質内に存在し、骨への力学的負荷（メカニカルストレス）の感受やその情報伝達において中心的な役割を果たすということが提唱されてきた。Sc1 は矯正歯の移動で生じる歯槽骨リモデリングを調節する因子である可能性が示唆されているが、骨および歯根膜における *SOST* 遺伝子発現の制御機構に関する詳細は未だ不明な点が多く、メカニカルストレスが *SOST* 遺伝子発現ならびに Sc1 産生をどれほど正確に調節しているのかは検討されていない。本研究は、歯槽骨に存在する骨細胞の Sc1 産生を、矯正歯の移動モデルを用いて時間的・空間的に検討すること、また *SOST* 遺伝子発現ならびに Sc1 産生の調節に関する機構を探索し、歯根膜と骨細胞との相互作用が果たす役割について明らかにすることを目的とした。

【材料ならびに方法】

in vivo における実験には 8 週齢の雄性 ICR マウス 20 匹を用いた。上顎右側第一臼歯と切歯の間にニッケルチタンコイルスプリングを装着し、それぞれ 1, 5, 10 日間、歯の移動を行った。コイルスプリングを装着していない群を対照群（0 日目）として用いた。Sc1 産生のパターンは、上顎第一臼歯冠状断切片に抗 Sc1 抗体による蛍光免疫染色を施し、領域単位および細胞単位で時空間的解析を行った。*in vitro* における実験には、矯正歯の移動における圧迫側を模倣した実験系として、ヒト歯根膜線維芽細胞（hPDL cells）および 3 次元培養を行った骨細胞様株 ML0-Y4 の間接的共培養モデルを構築し、連続的な圧迫力を負荷した後、定量 RT-PCR 法を用いて骨代謝関連遺伝子への影響を検討した。

【結果および考察】

矯正歯の移動によって、圧迫側歯根膜腔の狭窄ならびに牽引側歯根膜腔の伸展が認められた。領域単位における歯槽骨領域での Sc1 産生を解析した結果、牽引側では歯の移動

開始1日目においてのみ有意に減少する一方、圧迫側では5日目をピークに10日目まで有意な上昇を認めた。次に Sc1 陽性細胞の割合に関する解析では、牽引側では Sc1 陽性骨細胞の割合に顕著な変化を認めなかったのに対して、圧迫側では5日目において有意な増加を認め、10日目では移動開始前の水準に戻った。

単離した hPDL cells の初代培養系に対し圧迫負荷を行ったところ、hPDL cells における *SOST* および *Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)* 遺伝子発現は、圧迫力依存的に二相性の発現調節を受け、 2.4 g/cm^2 の圧迫負荷では hPDL cell の *SOST* 遺伝子の発現亢進ならびに Sc1 産生の活性化を確認した。次に、14日間3次元培養した MLO-Y4 に対し 2.4 g/cm^2 の圧迫負荷したところ、*Sost* 遺伝子発現は過去の報告と同様に負の調節を受けた。hPDL cells に対する同様の圧迫負荷を MLO-Y4 との共培養モデル環境下で加えた場合、*in vivo* で確認された結果と類似して、MLO-Y4 中の *Sost* 遺伝子発現が約3倍に増加した。*in vitro* におけるこれらの結果は、歯根膜と骨細胞の間接的相互作用が、圧迫力に対する *SOST* 遺伝子発現ならびに Sc1 産生の増加に関して重要な役割を果たすことを示唆している。以上の結果から、歯根膜への圧迫負荷により放出された分泌因子が歯槽骨中の骨細胞における *SOST* 遺伝子発現ならびに Sc1 産生の制御機構に影響を及ぼすという仮説を立て、抗 Sc1 中和抗体を培養溶液中に添加した場合の遺伝子発現を比較することで仮説の検証を試みた。その結果、圧迫負荷によって hPDL cells および MLO-Y4 に誘発される *SOST* 遺伝子発現の増加は、有意に抑制された。

【結論】

本研究では Sc1 産生の時空間的制御について検討を行い、矯正歯の移動に対する Sc1 産生の影響を高い分解能で捉えることに成功した。過度な圧迫負荷を受けた歯根膜細胞は、*SOST* 遺伝子発現の上昇並びに Sc1 の産生を来し、歯槽骨中の骨細胞においては Sc1 の産生亢進が認められた。本研究によって、歯根膜由来の Sc1 によるパラクリン作用が骨リモデリングにおける主要なメディエーターである可能性を示し、矯正歯の移動により生じる圧迫力が *in vivo* の歯槽骨においてなぜ Sc1 産生の増加を引き起こすのかについて、その理由の一端を明らかにした。

論文審査結果の要旨

本論文は、矯正歯の移動における歯槽骨骨細胞の骨形成抑制タンパク sclerostin (Sc1) の産生について、マウスの歯の移動モデルで時空間的に解析し、さらにヒト歯根膜線維芽細胞と骨細胞様細胞株の共培養系により、骨細胞と歯根膜線維芽細胞の Sc1 とこれをコードする遺伝子 *SOST* の圧迫負荷誘導性発現を明らかにすることで、歯の移動で歯根膜が果たす役割を検討したものである。

8 週齢の雄 ICR マウス第 1 臼歯と切歯の間にニッケルチタンコイルスプリングを装着して 1、5、および 10 日間 (10 gf/cm²) の矯正負荷をかけた後、両側上顎第一臼歯を通る冠状断でパラフィン切片を作製し、抗 Sc1 抗体による蛍光免疫染色を施行して、Sc1 陽性領域の ImageJ による経時的・空間的定量解析を行った。この結果、顕著な Sc1 産生が圧迫側で見られたため、マウス大腿骨由来骨細胞様細胞株 MLO-Y4 の 3 次元培養で得られた骨細胞様細胞と、臨床サンプルから確立したヒト歯根膜線維芽細胞の初代培養物の間接的共培養モデルを作製し、2.4 gf/cm² の連続的圧迫負荷培養後、定量 RT-PCR を用いて *SOST* と破骨細胞分化因子 *receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)* 発現を解析した。

In vivo では、歯槽骨の Sc1 産生は、牽引側は負荷 1 日目に有意に減少しその後元のレベルに戻った。圧迫側は 5 日目をピークに 10 日目まで有意な上昇が見られた。*In vitro* では、ヒト歯根膜線維芽細胞の *SOST* と *RANKL* の発現は圧迫負荷培養で増加し、Sc1 産生は促進する、という新しい知見を得た。また歯根膜と異なり、単培養の圧迫負荷骨細胞様細胞 MLO-Y4 の *Sost* 発現は、これまでの報告同様に減少し、*RANKL* 発現は増加した。歯根膜と骨細胞で *SOST* 発現の異なることに疑問を持ち、圧迫刺激により歯根膜細胞から分泌された Sc1 が歯槽骨骨細胞の *SOST* 発現を誘導すると考え、MLO-Y4 と歯根膜線維芽細胞の共培養で同様の試験を行った結果、MLO-Y4 の *Sost* 発現は圧迫負荷で約 3 倍に増加し、*RANKL* 発現は変化しないという新しい知見を得た。そこで、歯根膜線維芽細胞と MLO-Y4 の共培養モデルに抗 Sc1 抗体を添加して圧迫負荷培養を行った結果、歯根膜線維芽細胞と MLO-Y4 両者の負荷誘導性 *SOST* 発現は抑制された。

以上より、本論文は、歯槽骨の生体応答は 3 次元培養した骨細胞、および歯根膜線維芽細胞で構成する生体環境に近い共培養モデルで解析しなければならないこと、矯正歯の移動による応力応答性の骨形成抑制は骨細胞と歯根膜線維芽細胞の両者が関与すること、また、圧迫側歯根膜線維芽細胞は骨形成抑制因子 Sc1 と破骨細胞分化因子 *RANKL* のパラクリン作用により、圧迫側歯槽骨の吸収と骨形成制御に貢献する可能性を新たに示した。これらの結論は本領域に先駆的で非常に興味深いものであり、*SOST*-Sc1 系を標的とした歯の移動の制御法の確立への展開が期待される。

以上より、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文の価値を認める。