原著

歯科矯正力によりマウス歯周組織に発現する Osterix の 免疫組織化学的観察

松田浩和^{1,2)}、原田寿久³⁾、村岡理奈^{1,2)}、共田真紀^{1,2)}、岡藤範正³⁾

¹⁾松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患病態解析学

²⁾松本歯科大学 歯学部 歯科矯正学講座

³⁾松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 臨床病態評価学

(受理：平成 23 年 10 月 20 日)

抄録：歯科矯正学的メカニカルストレスを負荷した歯周組織における Osterix の発現状況を、免疫組織化学的に検討した。実験動物として 8 週齢の ddY マウスを使用し、歯根膜に持続的なメカニカルストレスを加えるため、Waldo の方法により上顎臼歯間にラバーダムシートを挿入した。挿入 3 時間後から最大 24 時間後まで経時的に免疫組織化学的手法を用い検索した。対照群の Osterix は、当該歯根膜組織の全周にわたって、その歯根膜線維芽細胞などに極めて弱く陽性を呈する部もあったが、ほとんど陰性だった。実験群では、9 時間以降において牽引側歯根膜線維芽細胞に陽性反応が出現し、一部ではその核内における活性が確認できた。24 時間では、陽性核の数が増えていた。以上の結果から、メカニカルストレスを負荷した後は、主として牽引側歯根膜に Osterix は 9 時間以降に発現し、同部を骨形成に大きくシフトさせることが示唆された。

Immunohistochemical Observation of Osterix Appearing in the Mouse Orthodontic Periodontal Tissues

Hirokazu Matsuda^{1,2)}, Toshihisa Harada³⁾, Rina Muraoka^{1,2)},
Maki Tomoda^{1,2)} and Norimasa Okafuji³⁾

¹⁾Hard Tissue Pathology Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, Japan

²⁾Department of Orthodontics, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, Japan

³⁾Clinical Evaluation Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, Japan

Abstract : The purpose of the study is to investigate the expression of Osterix in the mouse orthodontic periodontal tissues using Waldo method. Immunohistochemically in the control group, without experimental orthodontic mechanical stress, there was almost negative and/or quietly weekly positive reactions in the periodontal tissues. In the experimental group after 9 hours, orthodontic tension sides react positively. The positive reactions became stronger over time. The result suggest that Osterix expression in the orthodontic periodontal tension sides act as one of the key factors of osteogenic cell differentiation.

Key words : Orthodontic force, Mechanical stress, Periodontal ligament, Osterix, Immunohistochemistry

緒言

歯科矯正治療時に起こる当該歯根膜腔での組織反応、すなわち牽引側歯槽骨表面に骨芽細胞、圧迫側表面に破骨細胞

が出現し、骨の吸収と添加が起こることは周知の事実である。このメカニズムの解明のために、古くから実験動物を用いた研究が為されて来た¹⁾。また、株化した歯根膜線維芽細胞を用いた *in vitro* の研究も数多く為されている^{2,3)}。この時に重要な位置を占める骨芽細胞や破骨細胞の分化を司る各種因子については、多くのものが同定されると共に、その機構が明らかにされてきている⁴⁻¹⁰⁾。

著者連絡先：松田浩和 〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原1780、
松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患病態解析学、
Phone and Fax: 0263-51-2035 E-mail: hmatsuda0@gmail.com

表 1. 実験時間別の例数

時間	対照群	3 時間	9 時間	24 時間	計
例数	5	5	5	5	20

In vitro の実験系である Saito ら (2002)²⁾ と Yoshizawa ら (2004)³⁾ は、培養歯根膜線維芽細胞は、一般の線維芽細胞と異なりかなり特異な性格を持っており、骨芽細胞の分化因子である Runx2 が発現しているが、そのレベルは低い状態で維持されており、これは Msx2 が抑制している事を明白に示した。しかし、歯科矯正治療に直結する *in vivo* での実験的研究においてこれを追究したものは少ない¹¹⁾。この領域での数少ない *in vivo* 研究として、Watanabe ら (2007)¹¹⁾、(2008)¹²⁾ および、Matsuda (2009)¹³⁾、(2011)¹⁴⁾ のマウスを用いたものがある。Watanabe ら (2008)¹²⁾ は、*in vivo* の実験系を用いた Saito ら (2002)²⁾ と Yoshizawa ら (2004)³⁾ の結果を基に *in vivo* の実験系で追究し、一度歯科矯正学的メカニカルストレスを受けた歯根膜組織では、その牽引側において Runx2 の強発現が起こり、骨形成方向に大きくシフトすることを明らかにした。また、この時に Msx2 も共に強発現し Runx2 の働きをサポートすることを示した。さらに、その際に起こる反応はメカニカルストレスを付与後 3 時間ですでに発現増強がみられるとしている¹²⁾。このことから Matsuda ら (2010)¹⁴⁾ は Runx2 の上流に位置する BMPs とその関連因子について、メカニカルストレスを負荷した場合には、実験開始のごく初期より、牽引側歯根膜に BMP と Smad の発現増強が起こり、BMPs シグナルは、ストレス負荷後短時間の内に牽引側で強く発現し、その後に Runx2 など骨形成方向へ大きくシフトする端緒となる事を明らかにした。

そこで、今回我々は同じ実験系を用いて Runx2 の下流に位置する因子の 1 つ Osterix に着目し、メカニカルストレスを与えた後の経時的変化について、牽引側における Osterix における発現動態の経時的な詳細を、免疫組織化学的に追究することにした。

材料と方法

実験動物としては、8 週齢の ddY 系雄性マウス計 20 匹を日本 SLC 株式会社 (浜松) から購入し用いた。マウスは、空調設備により 24 ± 1 に制御された環境下で水と固形飼料 (Picolab Rodent Diet 20: 日本 SLC 株式会社、浜松) を自由に摂取できるように、床敷き (Paper clean: ペパーレット株式会社、静岡) を用いたプラスチック製のゲージ内にて飼育した。

今回の実験方法は、我々の既報¹³⁾ と同様である。すなわち、その概略は以下の通りである。実験に先立ち、イソフルラン (イソフル、大日本住友製薬株式会社、大阪) の吸入による全身麻酔下にてマウスを手製の実験台に固定した。この状態下にて、歯根膜部に持続的なメカニカルストレスを加えるために、Waldo の方法 (1953)¹⁾ により $2 \times 2\text{mm}$ 角

に切ったラバーダムシート (Ivory, Premium Rubber Dam Pure Latex: Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Germany) を二つ折りにし、上顎右側の第一臼歯と第二臼歯間に挿入した。実験群は、3 時間、9 時間および 24 時間とした。各群の数は 5 とした (表 1)。それぞれの実験時間が経過した後、同様の吸入全身麻酔下に当該部を一塊として摘出固定した。検索するのは、マウスの上顎左側第一臼歯遠心類側根部の横断像である。対照として反対左側の同部位を使用した。本実験は松本歯科大学動物実験指針に則って計画し、動物実験室運営委員会の審査・承認のもとに行った。

切片材料は、4% パラホルムアルデヒド 0.05M リン酸緩衝固定液にて 24 時間浸漬固定を行い、10% EDTA 溶液にて約 2 週間脱灰した後、アルコール系列にて脱水し、パラフィンに包埋した。上顎臼歯の歯根部において厚さ 4mm の水平断連続切片標本作製し、病理組織学的および免疫組織化学的手法を用い検索した。

免疫組織化学染色に際しては、脱パラフィンした標本を 37 で 30 分間、0.13% ペプシンにて前処理した。染色は、Dako Envision + Kit-K4006 (Dako, Glostrup, Denmark) により行い、一次抗体として、Osterix (ab 14933), Abcam, 1/5000) を用い、発色は DAB、対比染色はヘマトキシリンにより行った。

結果

病理組織学的所見

今回検索した上顎第一臼歯遠心類側歯根部対照群においては、歯槽内の位置は概ねその中心にあり歯根膜組織の幅は約 $50\mu\text{m}$ であった。同部にみられた歯根膜線維束の間には毛細血管が介在し、歯根膜内には歯根膜線維の走向に沿って、紡錘形の細胞質の中に長楕円形の核を持つ線維芽細胞がみられた。

実験群では、3 時間群では、歯槽内における歯根の相対位置は近心に移動し、遠心の牽引側歯根膜腔は、その幅が約 $100\mu\text{m}$ にまで拡大していた。同部の歯根膜線維はかなり伸展しており、また線維間が疎となっていた。歯根膜線維芽細胞の細胞質と核は長紡錘形であった。これにともない、圧迫側では歯根は歯槽骨と近接していた。9 時間群では、歯槽内における歯根の相対移動により牽引側となった遠心側の歯根膜腔は約 $100\mu\text{m}$ であった。その為、近心の圧迫側では歯槽骨と極めて近接しており、組織細胞の変性や萎縮が進み、細胞はほとんど確認されなかった。牽引側では歯根膜線維の隙間は減少していた。歯根膜線維芽細胞の細胞質は短紡錘形となり、核は長楕円形を呈していた。一方、歯根表面のセメント芽細胞も楕円形ないし類円形であった。歯槽骨の表面に接する骨芽細胞の形は楕円形ないし類円形

図1．上顎第一臼歯遠心頬側歯根部近心側には陰性ないし極めて弱い発現がみられる（Osterix, 対照群, $\times 300$ ）

図2．上顎第一臼歯遠心頬側歯根部遠心側歯周組織においてほぼ陰性ないし極めて弱い発現状態である（Osterix, 対照群, $\times 300$ ）

図3．圧迫側歯根膜線維芽細胞にほぼ陰性ないし極めて弱い発現している（Osterix, 実験群3時間, $\times 300$ ）

図4．牽引側歯根膜線維芽細胞に発現が増強している（Osterix, 実験群3時間, $\times 300$ ）。

図5．牽引側歯根膜線維芽細胞に強く発現している（Osterix, 実験群9時間, $\times 300$ ）

図6．牽引側歯根膜線維芽細胞の発現が強い（Osterix, 実験群24時間, $\times 300$ ）

で、数の増加が認められた。

24時間群における圧迫側では歯槽骨と近接し、細胞成分はほとんど確認されなかった。一方、牽引側では歯根膜細胞における細胞質は紡錘形で、核はやや太い楕円形を呈していた。歯槽骨の表面の骨芽細胞は類円形、ないし短い楕円形のものが多かった。またこの傾向はセメント芽細胞においても同様であった。

免疫組織化学的所見

対照群では、上顎第一臼歯遠心頬側歯根部近心側においてもその歯根膜線維芽細胞などに今回検討したOsterixは極めて弱く陽性を呈する部もあったが、ほとんど陰性だった(図1)。遠心側歯根部においても同様であり、歯槽骨表面に分布する骨芽細胞は弱い活性が認められた(図2)。

実験群では、3時間の標本において歯根膜全周の線維芽細胞にOsterixが弱く発現していた。しかしそれは牽引側において強く、圧迫側では弱く(図3)、発現の強弱が異なっていた。しかし、いずれの部においても歯根膜線維芽細胞の核内には発現していなかった(図4)。9時間では、牽引側歯根膜線維芽細胞の核内におけるOsterixの活性が確認できる細胞が散見された(図5)。24時間では、陽性核の数が増えていた(図6)。以上についてまとめると、メカニカルストレスを負荷した後は、主として9時間以降の牽引側歯根膜のOsterix発現があった。

考察

歯科矯正治療においては、矯正装置によるメカニカルストレスを受けた歯周組織に改造現象が惹起され、その結果として歯が動いているのである⁶⁾。すなわち、歯槽骨の当該歯根膜腔の牽引側表面には骨芽細胞の活性化により骨の添加が起こり、反対に圧迫側には破骨細胞の出現により骨の吸収が起こる。最近では、骨の吸収と添加の様相やその機構に関して細胞分化、さらには形態形成などを調節する各種の転写因子に関する研究が盛んになり、多くの報告が為されるようになってきている。これら歯科矯正時におこる歯根膜線維芽細胞の免疫組織化学的反応については渡邊(2009)の総説に詳しい⁹⁾。そこで今回我々は、Watanabeら(2008)⁷⁾、Matsudaら(2010)¹⁴⁾の研究結果、すなわちマウス歯根膜はメカニカルストレスを受けてから、早期にRunx2とMsx2の共同作用により、いわゆる牽引側歯根膜は骨芽細胞への分化方向にシフトする。これを受けて、骨芽細胞の分化ではRunx2の下流に位置するOsterixに着目したのである。また、実験期間はRunx2の強発現がみられる3時間以降から最大で24時間に設定した。なお、観察する歯根として我々は、松田ら(2009)¹³⁾、Matsudaら(2011)¹⁴⁾と同様に第一臼歯の遠心頬側根を用いた。

さて、Osterixは未分化間葉細胞から骨芽細胞への分化についての分子調節機構において、その最終段階の前骨芽細胞を成熟骨芽細胞へ分化誘導する際に発現し、調節されている因子である。最近では、歯科矯正学的歯根膜に

おけるOsterixの発現を含む骨芽細胞分化誘導因子関連の免疫組織化学的に、その遺伝子の発現状況についての研究成果が報告されつつある¹⁵⁻²⁴⁾。しかし、そのいずれもが培養細胞を用いた*in vitro*の報告であり、またメカニカルストレス負荷からの時間は数日単位と比較は長いものばかりである¹⁶⁾。今回我々が行った実験結果では、対照の歯根膜線維芽細胞はその全周にわたってOsterixは、その免疫組織化学反応の弱い活性がみられた。これは、Watanabeら(2008)⁷⁾やSaitoら(2002)⁵⁾、Yoshizawaら(2004)⁶⁾にて、Runx2やMsx2が弱い活性を恒常的に発現しているのと同様と考えられる。さらに、メカニカルストレスを与えた後経時的変化について、牽引側ではOsterixは、3時間以降から発現が開始し、歯根膜線維芽細胞に免疫染色陽性所見がみられた。これは、Runx2からの発現など歯根膜細胞の骨芽細胞への分化に関わる大きな変化があることを示しており、骨芽細胞分化に関連する因子であることを示しているものであろう。なお、9時間経過で牽引側歯根膜線維芽細胞の核内におけるOsterixの活性が確認できる細胞が散見された。この事より骨形成方向へ大きくシフトしている事が明らかになったと考えられる。24時間では陽性核の数が増えており、メカニカルストレスを負荷した後はBMPsやRunx2の発現に若干遅れ、主として牽引側歯根膜にOsterixは9時間以降に発現していた。これは、歯根膜組織においてもOsterixがBMPsやRunx2の下流で骨芽細胞の分化調節している事が示唆された。しかし、今回の結果からは牽引側では今回の実験では使用した動物の数が小さく、これが真の傾向なのか否かについて断定はできない。そこで今後は、検索例を追加し検討したい。さらに、Osterixの細胞内発現部位の変化についても詳細に追究するとともに、その発現状況についても同時に検討する予定である。

謝辞

稿を終えるに臨み、終始ご親篤なるご指導を頂いた松本歯科大学大学院硬組織疾患病態解析学ユニットの川上敏行教授ならびに中野敬介准教授に衷心より感謝申し上げます。なお、本研究の一部は日本学術振興会科学研究補助金(若手研究(B) 23792456 および基盤研究(C) 22592303)の補助によって行った。

参考文献

1. Waldo CM. Method for the study of tissue response to tooth movement. J Dent Res 32: 690-691, 1953
2. Saito Y, Yoshizawa T, Takizawa F, Ikegami M, Ishibashi O, Okuda K, Hara K, Ishibashi K, Obinata M and Kawashima H. A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. J Cell Sci 115: 4191-4200, 2002
3. Yoshizawa T, Takizawa F, Iizawa F, Ishibashi O, Kawashima

- H, Matsuda A, Endo N and Kawashima H. Homeobox protein Msx2 acts as a molecular defense mechanism for preventing ossification in ligament fibroblasts. *Mol Cell Biol* 24: 3460-3472, 2004
4. King GN and Cochran DL. Factors that modulate the effect of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 73: 925-936, 2002
5. Cho JH, Lee SK, Lee JW and Kim EC. The role of heme oxygenase-1 in mechanical stress-and lipopolysaccharide-induced osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells. *Angle Orthod* 80: 552-559, 2010
6. Chen YP, Han GH, Jin CW, Shi RX and Hou JH. Effect of simvastatin on bone morphogenetic protein-2 expression in the periodontal tissue after rat tooth movement. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 43: 21-25, 2008
7. Zhao YH, Li HF, Wang CL, Zheng Z, Fu YL and Wei FL. Expression of Osterix mRNA and protein levels in cultured human periodontal ligament cells after mechanical stimulation. *Hau Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 28: 214-218, 228, 2010
8. Zhao Y, Wang C, Li S, Song H, Wei F, Zhu K, Yang P, Tu Q and Chen J. Expression of Osterix in mechanical stress-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament cells *in vitro*. *Eur J Oral Sci* 116: 199-206, 2008
9. Enokiya Y, Hashimoto S, Muramatsu T, Jung HS, Tazaki M, Inoue T, Abiko Y and Shimono M. Effect of stretching stress on gene transcription related to early-phase differentiation in rat periodontal ligament cells. *Bull Tokyo Dent Coll* 51: 129-137, 2010
10. Komori T. Mechanical of transcriptional regulation by Runx2 in osteoblasts. *Clin Calcium* 16: 801-807, 2006
11. Watanabe T, Okafuji N, Nakano K, Shimizu T, Muraoka R, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. Periodontal tissue reaction to mechanical stress in mice. *J Hard Tissue Biol* 16: 71-74, 2007
12. Watanabe T, Nakano K, Muraoka R, Shimizu T, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. Role of Msx2 as a promoting factor for Runx2 at the periodontal tension sides elicited by mechanical stress. *Eur J Med Res* 13: 425-431, 2008
13. Matsuda H, Muraoka R, Tomoda M, Nakano K, Okafuji N, Yamada K and Kawakami T. Immunohistochemical observation of BMP in the mouse orthodontic periodontal tension sides. *J Hard Tissue Biol* 18: 181-184, 2009
14. Matsuda H, Nakano K, Muraoka R, Tomoda M, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. BMPs and related factors appearing in the mouse periodontal tissues due to orthodontic mechanical stress. *J Hard Tissue Biol* 19: 153-160, 2010
15. Yanagita M, Kojima Y, Mori K, Yamada S and Murakami S. Osteoinductive and anti-inflammatory effect of royal jelly on periodontal ligament cells. *Biomed Res* 32: 285-291, 2011
16. Kim JY, Kim BI, Jue SS, Park JH and Shin JW. Localization of osteopontin and osterix in periodontal tissue during orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod*. DOI: 10.2319/030911-173.1
17. Lee YM, Shin SI, Shin KS, Lee YR, Park BH and Kim EC. The role of sirtuin 1 in osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 11: 1600-0765, 2011
18. Heo JS, Lee SY and Lee JC. Wnt/ β -catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell* 30: 449-454, 2010
19. Yanagita M, Kojima Y, Kawahara T, Kajikawa T, Oohara H, Takedachi M, Yamada S and Murakami S. Suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells. *Oral Dis* 16: 812-817, 2010
20. Zhao YH, Li HF, Wang CL, Zheng Z, Fu YL and Wei FL. Expression of Osterix mRNA and protein levels in cultured human periodontal ligament cells after mechanical stimulation. *West China J Stomatol* 28: 214-218, 228, 2010
21. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ and Shimauchi H. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone* 44: 805-12, 2009
22. Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Takahashi M and Nakamura H. Formation of bone-like mineralized matrix by periodontal ligament cells *in vivo*: a morphological study in rats. *J Bone Miner Metab* 27: 149-157, 2009
23. Zhao Y, Wang C, Li S, Song H, Wei F, Pan K, Zhu K, Yang P, Tu Q, Chen J. Expression of Osterix in mechanical stress-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament cells *in vitro*. *Eur J Oral Sci*, 116: 199-206, 2008
24. Ueda-Maeda M. The expression of transcription factor Osterix in human periodontal ligament cells. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 73: 62-69, 2006