原	著

歯の移動に伴う歯槽骨改造現象における
osteopontin mRNA の発現
—— *in situ* hybridization 法による観察 ——

藤 田 叔 宏

東京医科歯科大学歯学部歯科矯正学第1講座（主任・指導：相馬邦道教授）

（1992年12月20日 受付）

Osteopontin mRNA Expression in Remodeling Alveolar Bone
Incident to Tooth Movement
—— Visualized by *In Situ* Hybridization ——

Yoshihiro Fujita

The First Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Chief and Director : Prof. Kunimichi Soma)

The purpose of this study was to investigate the osteopontin mRNA expression in the alveolar bone incident to the physiologic and experimental tooth movement.

The upper jaws of female rats (7 weeks old) which were submitted to experimental molar tooth movement and control specimens were decalcified and sliced into paraffin sections. Osteopontin mRNA expression and tartrate-resistant acid phosphatase (TRACPase) activity were examined in the alveolar bone by use of *in situ* hybridization techniques and enzyme histochemistry, respectively.

In the control specimens high levels of osteopontin mRNA expression was observed in the osteocytes and lining cells close to the osteoclasts which were detected by TRACPase staining in the distal areas of the tooth sockets. In the mesial tooth socket areas however, low levels of osteopontin mRNA expression was observed. In the experimental specimens high levels of osteopontin mRNA expression of both the osteoblasts and osteocytes was observed in the mesial areas of tooth sockets in response to the experimental tooth movement.

These results indicated that osteopontin gene expression is related to the alveolar bone remodeling as far as the bone resorption incident to the physiologic tooth movement and that this expression level significantly increased in response to a certain mechanical stress incident to the experimental tooth movement.

I. 緒 言

歯科矯正においては、不正咬合の改善の際、咬

合素材としての歯および顎骨に主として機械的刺激を加え、顎骨の形状や内部構造を変化させて、人為的な歯の移動や顎骨の整形を行い、咬合の再

構築を行ってきている。特に、歯の移動に関しては、その移動機構の解明が重要であり、生理的移動や人為的移動における骨改造現象を、骨の細胞や基質レベルから把握することに関心がもたれるところである。

歯槽骨には、生理的および人為的歯の移動に伴い、骨の細胞による吸収と形成を伴う骨改造現象が起こるが、特に人為的歯の移動では、機械的圧迫刺激を加えた骨組織に、顕著な骨吸収が起こることが報告されてきている^{1,2)}。

一方、骨基質には、最近種々の非コラーゲン性蛋白の存在が報告され、この非コラーゲン性蛋白が骨組織の形成や改造に重要な機能をもつことが指摘されている³⁾。osteopontin はそのような非コラーゲン性蛋白の一つで、そのアミノ酸配列中に、細胞接着に関与する Arg-Gly-Asp 配列、またハイドロキシアパタイトと強い結合性を有すると考えられる 9 個連続した Asp 配列や、カルシウムやヘパリンとの結合の可能性のある配列などを有しているリン酸化糖蛋白である⁴⁻⁶⁾。この osteopontin の骨組織における組織学的研究においては、膜性骨、線維性骨や軟骨性骨の骨芽細胞や骨細胞などに mRNA や免疫反応が認められている⁷⁻¹¹⁾。一方、osteopontin の発現は、dexamethasone などにより抑制されるのと反対に、1,25-dihydroxyvitaminD₃ などにより増強される¹²⁻¹⁴⁾。特に、この 1,25-dihydroxyvitaminD₃ が、破骨細胞の活性を高め骨吸収を促進する効果を有する^{15,16)}ことより、osteopontin と破骨細胞性骨吸収の関係が注目され、これまでに osteopontin の破骨細胞の骨表面への接着への関与すること¹⁷⁾、細胞内カルシウム濃度の減少による細胞シグナルを起こすこと¹⁸⁾、さらに、骨吸収に伴う mRNA 発現の上昇¹⁹⁾などが報告されている。

このようなことから著者は、生理的歯の移動に伴う骨改造現象のみられる歯槽骨の骨組織では、特に骨吸収部において osteopontin の発現が起こり、また、人為的歯の移動による機械的圧迫刺激に反応して骨吸収を起こすような骨組織においては、osteopontin の発現が増加するであろうと考

えた。

そこで本研究においては、生理的歯の移動に伴う骨改造現象において、osteopontin の発現を観察し、さらに、人為的歯の移動の際の機械的圧迫刺激に反応する骨組織における osteopontin の発現の応答について検討することを目的として、osteopontin 発現の指標と考えられる osteopontin mRNA の発現を、骨組織の細胞レベルにおいて観察することを考え、硬組織脱灰標本に *in situ* hybridization 法を応用した組織学的観察を試みた。

II. 実験方法

1. 実験試料

Sprague-Dawley 系の雌性のラット（7 週齢）を実験動物に使用した。実験は、人為的歯の移動を行う実験群と対照群に分け、対照群において生理的歯の移動についての観察を行い、実験群において人為的歯の移動についての観察を行った。実験群には Waldo の方法²⁰⁾を参考に、上顎臼歯に 3 日間の歯の移動を行った。すなわち、ラットにエーテル麻酔を行い、上顎左側第一臼歯と第二臼歯の間に歯科矯正用ゴム（2oz., 5/16" Unitek/3M）を挿入することにより、上顎第一臼歯と第二、第三臼歯を相反的に移動した（図 1）。対照群および実験群の上顎部を試料として摘出し、図 2 に示すように、両群において臼歯咬合面に平行に咬合面

図 1 試料の咬合面観
上顎右側第一臼歯と第二臼歯の間にゴム（矢印）を挿入して歯の移動を行った

図2 対照群および実験群試料の観察部位

a: 対照群, b: 実験群, m1: 第一臼歯, m2: 第二臼歯, m3: 第三臼歯, M: 近心側, D: 遠心側, 矢印: 移動方向, 実線: 臼歯咬合面から約1.3mmの観察部位

から約1.3mmの部位の水平断連続切片を作製し, *in situ* hybridization法による osteopontin mRNAの検出, 破骨細胞同定のため酵素組織化学による酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色および対比染色のトルイジンブルー染色を行った。

2. *in situ* hybridization 法

Yamada ら²¹⁾, Weinreb ら⁸⁾の方法に従って *in situ* hybridizationを行った。各操作は特に記さない限り室温で行った。

1) 試料の固定と脱灰

摘出した試料を4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde reinst, Merck) (以後 PFAと記す), 0.1% diethyl pyrocarbonateを含むリン酸緩衝液 (PBS²²⁾) にて4℃で一晩浸漬固定し, 5%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (第一化学薬品), 0.1% diethyl pyrocarbonateを含むPBSにて3週間, 4℃で脱灰操作を行った²³⁾。

2) パラフィン包埋, 切片作製

パラフィン (融点58~60℃, 和光) 標本を作製し, 厚さ約10μmに薄切した。スライドガラスは, 蒸留水で洗浄し, 200℃で3時間乾熱処理を行った後, 50μg/ml poly-L-lysine (SIGMA) 溶液中に30分間浸漬し, 乾燥させたものを使用した。薄切したパラフィン切片はこのスライドガラス上に採取し, Slide Warmer (サクラ精機) にて40℃で3時間乾燥させた。

3) Probe の作製

in situ hybridizationに使用した probe は, pBS+ Vector plasmid (Stratagene) に組み込まれたラット osteopontin cDNA の EcoRI 断片 (1.2Kb)⁸⁾ より調製した。plasmid を制限酵素 *Xmn*I・*Bam*HI (Takara) を用いて切断して DNA テンプレートを作製し, このテンプレートから T3・T7RNA polymerase (boehringer manheim) を用いて, [α -³⁵S] UTP (uridine triphosphate) で標識した antisense および sense (negative control) 双方向の一本鎖 RNA probe を作製した。なお, sense RNA probe は, *in situ* hybridization の非特異的バックグラウンドの検出のために使用した。

4) hybridization

hybridization に際して, 薄切片標本には通法に従って前処理を行い, hybridization 溶液 [probe 濃度: 1×10^4 cpm/μl] を切片上にのせ, Parafilm で覆い, 50%ホルムアミドで湿潤させ密閉した箱のなかで16時間, 50℃で反応させた。反応後, 通法に従って, 過剰の probe の分解・洗浄を行い, 脱水し, 風乾した。

なおオートラジオグラフィーには, ニュークリアトラックエマルジョン NTB-3 (Kodak) を用い, 露光は4℃で5日間行い, ディベロッパー-D19 (Kodak), フィクサー (Kodak) を用いて現像・定着を行った。

3. 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色

破骨細胞の同定を行うために, *in situ* hybridizationを行った切片およびその連続切片において, Toyosawa ら²⁴⁾の方法を参考に, 50mM L(+)

-酒石酸 (和光) 加0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.2) ; 50ml, naphthol AS-MX phosphate (Sigma) ; 10mg, N-N'ジメチルホルムアミド (和光) ; 1ml, fast red violet LB salt (Sigma) ; 8mg の割合に各試薬を混合した反応液を用いて, 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色を行った。

4. 組織観察・銀粒子の定量

第二臼歯歯根部の歯周組織において, antisense および senseRNA probe による *in situ* hybridization 法のみを行った標本, 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色のみを行った標本, および antisense RNA probe による *in situ* hybridization 法を行った後, 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色とトリイジンプルー染色を行った標本において, 光学顕微鏡観察を行った。

各細胞の hybridization のシグナルの強度を比較するために, 各細胞において観察される銀粒子数/100 μ m²を光学顕微鏡下で計測し⁸⁾, 各細胞の計測値群 (n=10) の平均値と標準偏差を求めた。また, 各群間の差の検定は Mann-Whitney 検定²⁵⁾で行った。

III. 結 果

1. 生理的歯の移動に伴う骨改造における観察

生理的歯の移動のみられる対照群の上顎骨歯槽部の水平断連続切片に, 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色, osteopontin の antisense および sense probe による *in situ* hybridization を行った観察結果について記す。

図3 a の模式図に示すような, 上顎の第二臼歯の4歯根〔近心舌側根(mlR), 近心頬側根(mbR), 遠心舌側根(dlR), 遠心頬側根(dbR)〕と, その周囲の歯根膜(PDL)および歯槽窩を形成する歯槽骨(B)において観察を行った。各歯根の歯槽窩において, 歯根に対して遠心にある歯槽骨部(DA), 歯根に対して近心にある歯槽骨部(MA)を, それぞれ歯槽窩遠心部, 歯槽窩近心部と呼ぶこととする。

図3 c に対照群の組織標本に酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色のみを行った組織像を示

す。酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性反応は組織中に赤紫色に観察され, Mohri らの報告²⁾などにあるように, 各歯槽窩の生理的吸収側である歯槽窩遠心部とその近傍の骨組織中の血管周囲に顕著な酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性反応が認められた。歯槽窩遠心部から近心部にかけて酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性反応は検出されなくなり, 生理的形成側である歯槽窩近心部には, 陽性反応はほとんど観察されなかった。

図3 d には, 図3 c に示した組織標本の連続切片標本において, osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization のみを行った組織像を示す。各歯槽窩の生理的吸収側である歯槽窩遠心部とその近傍の骨組織および骨組織中の血管周囲に, 多量の黒色の銀粒子の集積的分布が観察された。歯槽窩遠心部から近心部にかけて銀粒子の集積的分布は少なくなり, 生理的形成側である歯槽窩近心部においては, 歯槽窩遠心部に比較して銀粒子の集積的分布はあまり観察されなかった。一方, 歯根表面部にも銀粒子の分布が観察されたが, 歯根の象牙質部や歯髓腔, 歯根膜および歯槽骨の骨基質部には銀粒子はほとんど観察されなかった。

図3 b に, 図3 d に示した組織標本の連続切片標本において, *in situ* hybridization の negative control として osteopontin の sense probe による *in situ* hybridization を行った組織像を示す。これには, 組織に特異的な銀粒子の分布は観察されなかった。

図4 a に対照群の歯槽中隔部において, osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization を行った後, 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色を行い, さらにトリイジンプルー染色を行った組織像を示す。

歯根(R)の表面にはトリイジンプルーに濃染されるセメント質(C)に接して存在するセメント芽細胞(cb)が観察された。生理的骨形成側である歯槽骨の遠心側すなわち遠心歯根の歯槽窩近心部の歯根膜(PDL)においては, 歯根の表面から歯

図3 対照群試料の水平断連続切片標本における観察像

a: 観察部位の模式図, mIR: 第二臼歯の近心舌側根, mbR: 第二臼歯の近心頬側根, dIR: 第二臼歯の遠心舌側根, dbR: 第二臼歯の遠心頬側根, PDL: 歯根膜, B: 歯槽骨, DA: 歯槽窩遠心部, TA: 歯槽窩移行部, MA: 歯槽窩近心部, M: 近心側, D: 遠心側, L: 舌側, B: 頬側, 矢印: 歯根の生理的移動の方向, b: osteopontin の sense probe による *in situ* hybridization の組織像, c: 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色による組織像, d: osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization の組織像 (b~d: $\times 20$)

槽骨に向かって放射状に走行する歯根膜線維および線維芽細胞(fb)が観察された。その歯根膜の附着する骨表面には、突起状骨構造(P)が観察され、骨表面には多数の骨芽細胞(歯槽窩近心部の骨芽細胞:m-ob)が、また、骨内部には多数の骨細胞(歯槽窩近心部の骨細胞:m-ocy)が観察された。

一方、生理的骨吸収部である歯槽骨の近心部、すなわち近心歯根の歯槽窩遠心部においては、歯根膜(PDL)にはやや配列が乱れた歯根膜線維と線維芽細胞(fb)が観察され、歯槽骨表面の骨吸収窩(Howship's lacunae)には酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色により赤紫色に染色される多数

図 4 対照群の歯槽中隔部における観察像

a : osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization・酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色・トルイジンブルー染色を行った組織像, b : a の連続切片標本に osteopontin の sense probe による *in situ* hybridization・トルイジンブルー染色を行った組織像

R : 歯根, C : セメント質, cb : セメント芽細胞, PDL : 歯根膜, fb : 線維芽細胞, P : 突起状骨構造, m-ob : 歯槽窩近心部の骨芽細胞, m-ocy : 歯槽窩近心部の骨細胞, oc : 破骨細胞, bv : 血管, bm : 骨髄, d-ocy : 歯槽窩遠心部の骨細胞, cc : 破骨細胞に隣接する細胞, bv-lc : 血管部の lining cell (a, b : $\times 80$)

の破骨細胞 (oc) が観察された。また、歯槽骨内には多数の血管 (bv) や骨髄 (bm) が観察された。

銀粒子の分布を観察すると、生理的骨形成部である歯槽窩近心部の突起状骨構造 (P) に観察される骨芽細胞 (m-ob) および骨細胞 (m-ocy) に比較して、生理的骨吸収部である歯槽窩遠心部の骨細胞 (d-ocy) および破骨細胞に隣接する細胞 (cc) において多量の銀粒子が観察された。一方、歯根膜 (PDL) の線維芽細胞 (fb) および血管部には少量の銀粒子しか観察されなかった。

図 4 b には、図 4 a に示した組織標本の連続切片標本において osteopontin の sense probe によ

る *in situ* hybridization を行った後、トルイジンブルー染色を行った組織像を示す。この組織には特異的な銀粒子の分布は観察されなかった。

図 4 a において観察した生理的骨形成部の強拡大像を図 5 a に示す。歯根膜の線維芽細胞 (fb) に比較して、骨表面の骨芽細胞 (歯槽窩近心部の骨芽細胞 : m-ob) や骨内部の骨細胞 (歯槽窩近心部の骨細胞 : m-ocy) には、より多い銀粒子が認められた。また、骨組織中の血管部の骨表面の lining cell²⁶⁾ (血管部の lining cell : bv-lc) には多量の銀粒子が観察された。一方、骨組織のより深部に存在する骨細胞 (成熟骨細胞²⁷⁾ : a-ocy) には、銀

図5 対照群の歯槽中隔部の強拡大像

osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization・酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色・トルイジンブルー染色を行った組織像 (×160)

a: 骨形成部である歯槽窩近心部の強拡大像, b: 骨吸収部である歯槽窩遠心部の強拡大像

fb: 歯根膜線維芽細胞, m-ob: 歯槽窩近心部の骨芽細胞, m-ocy: 歯槽窩近心部の骨細胞, bv: 血管, bv-lc: 血管部の lining cell, a-ocy: 成熟骨細胞, pre-oc: 破骨細胞の前駆細胞, i-oc: 休止期の破骨細胞, a-oc: 活性型の破骨細胞, d-ocy: 歯槽窩遠心部の骨細胞, cc: 破骨細胞に隣接する細胞 (a, b: ×160)

図6 対照群組織標本の各細胞上に観察された銀粒子数

粒子のほとんど観察されない骨細胞も多く認められた。同じく、図4aにおいて観察した生理的骨吸収部の強拡大像を図5bに示す。酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色に赤紫色に染色される細胞には、血管近傍の骨表面に存在する単核の細胞（破骨細胞の前駆細胞²⁸⁾: pre-oc) や骨表面からやや離れて存在し骨表面に細胞突起を伸ばす多核の細胞（休止期の破骨細胞²⁹⁾: i-oc) および骨吸収窩にあって多数の核を有する細胞（活性型の破骨細胞: a-oc) などが観察された。これらの破骨細胞系の細胞の周囲には多量の銀粒子の分布する細胞が多数観察され、特に、歯槽窩内の血管部の骨表面に観察される lining cell (bv-lc), 歯槽窩遠心部の骨細胞 (d-ocy), 破骨細胞に隣接する細胞 (cc) などの多くに、多量の銀粒子の集積的分布が観察された。これら骨芽細胞系の細胞に比較して、破骨細胞の前駆細胞や休止期の破骨細胞には銀粒子はあまり認められなかったが、活性型の破骨細胞にはやや多めの銀粒子が観察された。

対照群の組織標本の各細胞上に観察される銀粒子数/100μm²の計測値(n=10)の平均値と標準偏差を図6に示す。歯根膜の血管部や線維芽細胞に比較して、骨形成部である歯槽窩近心部の骨芽細胞および骨細胞、セメント芽細胞には有意に多量の銀粒子が観察された(p<0.05)。しかし、これら

の細胞に比較して、血管部の骨表面の lining cell や歯槽窩遠心部の骨細胞および破骨細胞に隣接する細胞にはさらに多量の銀粒子が観察された(p<0.05)。

2. 人為的歯の移動に伴う骨改造における観察

実験群には人為的歯の移動を行い、対照群における観察部位に対応して、上顎第2臼歯歯槽部の水平断の連続切片標本において観察を行った(図2)。第2臼歯の歯根移動を示す模式図と組織像を図7に示す。図7aに示すような第2臼歯歯根の近心移動の結果、図7bに示すように、近心舌側根の近心の歯根膜は圧迫され、歯根が歯槽窩壁に近接していた(矢頭)。連続切片における酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色および osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization を行った組織像を図7c, dに示す。対照群の酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性反応および *in situ* hybridization の銀粒子の分布(図3c, d)と比較検討したところ、対照群においては酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性反応や銀粒子の集積的分布が比較的観察されなかった歯槽窩近心部に、実験群では酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性反応および銀粒子の集積的分布が観察され、それらは歯根膜圧迫部位近傍において顕著であった。一方、歯槽窩遠心部をみると、

図7 実験群の水平断連続切片標本における観察像

a: 観察部位の歯根移動の模式図, mlR: 第二臼歯の近心舌側根, mbR: 第二臼歯の近心頬側根, dlR: 第二臼歯の遠心舌側根, dbR: 第二臼歯の遠心頬側根, PDL: 歯根膜, B: 歯槽骨, DA: 歯槽窩遠心部, MA: 歯槽窩近心部, M: 近心側, D: 遠心側, L: 舌側, B: 頬側, 矢印: 歯根の実験的移動の方向, b: osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization・酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色・トルイジンブルー染色を行った組織像, c: 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色による組織像, d: osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization の組織像, 矢頭: 歯根近接部 (b~d: $\times 20$)

対照群においては強い酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性反応および多量の銀粒子の集積の分布が観察されたが、実験群においては酒石酸抵

抗性酸フォスファターゼ染色陽性反応および銀粒子の分布の減少が認められ、歯槽窩近心部や移行部と同程度以下の陽性反応や銀粒子の分布しか観

図 8 対照群の対応する部位と実験群の圧迫部の観察像

osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization, 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色, トルイジンブルー染色を行った組織像

a: 対照群標本, b: 実験群標本, R: 歯根, PDL: 歯根膜, B: 歯槽骨, 矢頭: 歯根近接部 (a, b: $\times 80$)

察されなかった。

実験群の標本において、歯根の近心移動による歯根膜の圧迫が観察される部位に osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization を行った後、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色を行い、さらにトルイジンブルー染色を行った組織像を図 8 b に、対照群の対応する部位の組織像

を図 8 a に示す。対照群に比較して、実験群においては歯根の近心移動により歯根膜腔が狭くなり歯根膜 (PDL) が圧迫されて、歯根膜の細胞の配列の乱れが観察された。実験群圧迫部位近傍と対照群の対応する部位の強拡大像を図 9 a, b に示す。対照群の対応する部位、すなわち生理的骨形成部である歯槽窩近心部歯槽骨に観察される骨芽

図9 対照群の対応する部位と実験群の圧迫部の強拡大像

osteopontin の antisense probe による *in situ* hybridization, 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色, トルイジンブルー染色を行った組織像

a: 対照群標本, b: 実験群標本, R: 歯根, PDL: 歯根膜, B: 歯槽骨, ob: 骨芽細胞, ocy: 骨細胞, oc: 破骨細胞 (a, b: $\times 160$)

細胞 (ob) および骨細胞 (ocy) に比較して, 実験群の圧迫部位近傍の骨芽細胞 (ob) および骨細胞 (ocy) には, 多量の銀粒子が観察された。また対

照群の歯槽窩近心部においては酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性の破骨細胞は観察されなかったが, 実験群の同部位には, 酒石酸抵抗性

図10 対照群と実験群圧迫部の細胞上に観察された銀粒子数の比較

酸フォスファターゼ染色に赤紫色に染色される破骨細胞 (oc) が観察された。

対照群および実験群の組織標本に観察される歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞および骨細胞の各細胞上に観察される銀粒子数/100μm²の計測値 (n=10) の平均値と標準偏差を図10に示す。対照群と実験群の歯根膜線維芽細胞における銀粒子数には、有意差を認めなかった ($p>0.05$) が、対照群の骨芽細胞や骨細胞に比較して、実験群の圧迫刺激を加えた部位の骨芽細胞や骨細胞には有意に多量の銀粒子が観察された ($p<0.05$)。

IV. 考 察

1. 硬組織の *in situ* hybridization 法

本研究においては、硬組織の脱灰標本に *in situ* hybridization 法を行った。前研究²³⁾においては、1週齢マウスの幼若な硬組織に3日間の脱灰操作を行い *in situ* hybridization 法を行ったが、本研究では、より骨や歯の形成の進んだ石灰化度の高い7週齢ラットの硬組織に3週間の脱灰操作を行い *in situ* hybridization 法を試みた。その結果、そのような長期の脱灰操作を行った硬組織標本においても、組織における mRNA の発現の分布を、組織に特異的な銀粒子の分布として観察し、さらに細胞レベルの分布の解析を行うことができた。なお、硬組織脱灰標本における *in situ* hybridization 法の問題点としては、標本作製における組織の mRNA の分解・脱離が指摘されている³⁰⁾。本研究においては、そのような mRNA の分解・脱離は

RNA 分解酵素による試料の汚染によると考え、摘出時の試料の洗浄、組織中の RNA 分解酵素の固定、外来の RNA 分解酵素による汚染防止のために、各操作において、RNA 分解酵素の活性阻害剤である diethyl pyrocarbonate^{23,31)}を含む溶液を使用した。

2. 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色

酒石酸抵抗性酸フォスファターゼは破骨細胞の骨吸収において重要な機能をもつ酵素である³²⁾ことから、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色は破骨細胞の同定のために有用であると考えられる。酒石酸により阻害を受けない酸フォスファターゼ、すなわち酒石酸抵抗性酸フォスファターゼが破骨細胞に特異的であることが Minkin³³⁾により提唱され、Van de Wijngaert ら³⁴⁾、Baron ら²⁸⁾などにより破骨細胞および破骨細胞の前駆細胞の同定に導入されてきている。

このような組織中の酸フォスファターゼは、酒石酸のみならず、熱によってもその活性が阻害されるが、本研究においては、融点58~60℃のパラフィンに包埋し、*in situ* hybridization 法を行った標本を用いていることから、検出された酸フォスファターゼは、酒石酸抵抗性に加えて、そのような熱処理によっても失活しない耐熱性を有する酸フォスファターゼであると考えられた²⁴⁾。本研究に用いたこのような染色方法は図5bに示されるように、骨吸収にある多核の破骨細胞を染色していたことから、他の方法と同様に、破骨細胞の特異的酵素である酒石酸抵抗性酸フォスファター

ゼ活性を検出していると考えられた。この染色法により検出される細胞には、骨吸収窩にある破骨細胞の他に、骨表面からやや離れて存在するが骨表面に細胞突起を伸ばす多核の細胞や、骨組織の血管近傍に存在する単核の細胞があり、本研究においてはこれらの細胞を Baron らの所見²⁸⁾や Rodan and Martin の仮説²⁹⁾などを参考に、それぞれ活性型の破骨細胞、休止期の破骨細胞および破骨細胞の前駆細胞と記述した。

3. 生理的歯の移動に伴う骨形成および骨吸収における osteopontin mRNA の発現

ラットの上顎歯槽骨においては、臼歯の生理的な遠心移動に伴い歯槽窩遠心部に骨吸収が起こり、歯槽窩近心部には骨形成が観察される²⁾。このような組織において酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性および *in situ* hybridization による osteopontin mRNA の発現を観察したところ、骨形成部である歯槽窩近心部には酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性は認められず、osteopontin mRNA の発現も少量しか観察されなかった。一方、骨吸収部である歯槽窩遠心部においては、強い酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性が認められ、この部位には組織中で最も活発な osteopontin mRNA の発現が認められた (図 3)。osteopontin の *in situ* hybridization と酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色を併用した組織標本 (図 4) において観察される各細胞における銀粒子数を定量し (図 6)、osteopontin mRNA の発現を比較したところ、歯槽窩近心部の骨芽細胞および骨細胞に比較して、血管部の骨表面の lining cell や、生理的骨吸収部である歯槽窩遠心部の骨細胞や破骨細胞に隣接する細胞に、より活発な osteopontin mRNA の発現が観察された。また生理的骨形成部および吸収部から離れた部位の成熟骨細胞には osteopontin mRNA の発現のほとんどない細胞が多く観察された (図 5)。このような結果より、骨芽細胞系細胞の分化の過程における osteopontin mRNA の発現のレベルは、骨形成期の骨芽細胞および骨細胞においてやや上昇し、成熟骨細胞においては減少するが、血管部の lining

cell においては上昇し、特に、破骨細胞性骨吸収を受けるような部位の lining cell や骨細胞において最も上昇することが考えられた。骨組織の未固定凍結標本においては、骨表面や骨細胞窩に osteopontin の免疫反応が認められている⁹⁾。また、osteopontin が破骨細胞の骨表面への接着に関与すること¹⁷⁾や、骨芽細胞の骨吸収の制御についての Rodan and Martin の仮説²⁹⁾を考慮すると、本研究の観察結果は、骨芽細胞系細胞が osteopontin を骨表面に分泌し、破骨細胞に対して骨吸収部位を示すような役割を行うことを示唆するものと考えられ、生理的歯の移動における骨改造現象において、特に骨吸収に関係して osteopontin が重要な役割を担うことを示唆していると考えられた。

一方、このような lining cell や破骨細胞に隣接する細胞に、その近傍の骨細胞と同様に高い osteopontin mRNA の発現の認められる細胞が多く観察された (図 5 b, 図 6)。このことから、lining cell や破骨細胞に隣接する細胞が、骨細胞と同一の遺伝子表現形を有することが考えられた。また、このような高い osteopontin mRNA の発現の認められる骨細胞や lining cell は、お互いの細胞突起により結合して骨細胞-骨芽細胞複合体を造り、骨組織のカルシウムのホメオスタシスを調節していることが考えられている²⁶⁾が、破骨細胞に隣接する細胞もそのような複合体に関与することが考えられた。

骨吸収部の観察においては、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色陽性の破骨細胞の前駆細胞、休止期の破骨細胞および活性型の破骨細胞においても銀粒子が観察された (図 5 b)。このことは破骨細胞における mRNA の発現の所見^{35,36)}を追認するものであるが、銀粒子数を計測した結果 (図 6)、破骨細胞の前駆細胞、休止期の破骨細胞において観察された銀粒子数は、歯根膜の血管や線維芽細胞において観察された銀粒子数と差が認められないことから、破骨細胞の前駆細胞および休止期の破骨細胞においては、osteopontin mRNA はあまり発現していないことが考えられ

た。一方、活性型の破骨細胞においては、多めの銀粒子が観察された(図 5 b, 図 6)。しかしながら、このような破骨細胞の近傍は多量の osteopontin mRNA を発現する骨細胞が多いためバックグラウンドが高く、活性型の破骨細胞に観察される銀粒子の評価については、そのような骨細胞の影響や、さらに活性化された破骨細胞における所見を含めた詳細な検討が必要であると考えられた。

4. 人為的歯の移動における機械的刺激に反応する osteopontin mRNA の発現

機械的刺激は骨改造現象において重要な要素であることが指摘されていることから³⁷⁾、人為的歯の移動の機構を解明するために、機械的刺激に反応する骨組織における osteopontin の発現がどのような応答をするかを検討することは重要な課題である。本研究では人為的歯の移動による機械的圧迫刺激を受けた歯槽骨における osteopontin mRNA の発現様相を生理的組織の発現様相と比較検討した。

osteopontin mRNA の発現の低い骨芽細胞および骨細胞の観察される部位に、人為的歯の移動による機械的圧迫刺激を行った結果、骨芽細胞および骨細胞に osteopontin mRNA の高い発現が観察された(図 7~10)。すなわち、骨芽細胞や骨細胞における osteopontin mRNA の発現が機械的圧迫刺激により増加することが示唆された。このような機械的刺激に対する mRNA の発現の応答の観察は、骨格筋における myosin の mRNA について報告されているが³⁸⁾、骨組織については本研究が初めての報告である。この結果は、機械的圧迫刺激に反応して骨芽細胞や骨細胞の遺伝子発現が変化し、osteopontin の発現が増加することを示唆しており、機械的刺激と骨の細胞の関係を解明する端緒となる非常に重要な所見と考えられる。また、この結果は、人為的歯の移動において機械的圧迫刺激に反応して起こる骨改造現象において、osteopontin が重要な機能を有することを示唆するものである。

今後、骨改造現象に関与するさまざまな蛋白の

遺伝子についても同様な検討を行うことにより、歯の移動の機構の解明を進めることが可能と考えられる。

V. 結 論

ラット歯槽骨において *in situ* hybridization 法を行い、生理的歯の移動に伴う骨改造が行われている骨組織の osteopontin mRNA の組織分布を検討した結果、骨形成部より、骨の血管部や骨吸収部の骨の細胞において osteopontin mRNA の発現が顕著であることが観察された。一方、人為的歯の移動による機械的刺激を加えた骨組織の osteopontin mRNA の観察から、機械的圧迫刺激に応答して骨の細胞の osteopontin の遺伝子の発現が増加することが認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご教示、ご指導を賜りました三浦不二夫名誉教授、ならびに、ご指導、ご校閲を賜りました相馬邦道教授に深甚なる謝意を表します。終始ご指導とご校閲を賜りました江藤一洋教授に謹んで感謝の意を表します。また、ご助言とご校閲をいただきました栗原三郎講師、懇切なるご助言をいただきました野田政樹教授、有益なご助言をいただきました山下典子博士に心より感謝の意を表します。さらに *in situ* hybridization 法について直接ご教示いただいた山田俊平博士、井関祥子先生に心より感謝いたします。本研究に際し終始暖かいご支援をいただきました歯科矯正学教室および発生機構制御学教室の皆様にも厚くお礼申し上げます。

本研究で用いたラット osteopontin cDNA は Gideon A. Rodan 博士のご厚意により供与を賜りました。ここに記して心より感謝の意を表します。

本研究の要旨の一部は、第40回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会にて発表した。

文 献

- 1) Macapanpan, L. C., Weinmann, J. P. and Brodie, A. G. : Early tissue changes following tooth movement in rats. Am. J. Orthod. and Oral. Surg. 24 : 79-95, 1954.

- 2) Mohri, T. Hanada, K. and Ozawa, H. : Coupling of resorption and formation on bone remodeling sequence in orthodontic tooth movement : A histochemical study. *J. Bone and Mineral. Metabolism.* 9 : 211-223, 1991.
- 3) Heinegård, D. and Oldberg, Å. : Structure and biology of cartilage and bone matrix non-collagenous macromolecules. *FASEB J.* 3 : 2042-2051, 1989.
- 4) Oldberg, Å., Franzén, A. and Heinegård, D. : Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 8819-8823, 1986.
- 5) Prince, C. W., Oosawa, T., Butler, W. T., Tomana, M., Bhowm, A. S., Bhowm, M. and Schrohenloher, R. E. : Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J. Biol. Chem.* 262 : 2900-2907, 1987.
- 6) Prince, C. W. : Secondary structure predictions for rat osteopontin. *Connect. Tissue Res.* 21 : 15-20, 1989.
- 7) Nomura, S., Wills, A. J., Edwards, D. R., Hearh, J. K. and Hogan, B. L. M. : Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J. Cell Biol.* 106 : 441-450, 1988.
- 8) Weinreb, M., Shinar, D. and Rodan, G. A. : Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J. Bone Miner. Res.* 5 : 831-842, 1990.
- 9) Mark, M. P., Prince, C. W., Oosawa, T., Gay, S., Bronckers, A. L. and Butler, W. T. : Immunohistochemical demonstration of a 44-KD phosphoprotein in developing rat bones. *J. Histochem. Cytochem.* 35 : 707-715, 1987.
- 10) Mark, M. P., Butler, W. T., Prince, C. W., Finkelman, R. D. and Ruch, J. V. : Developmental expression of 44-KDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone γ -carboxyglutamic acid (Gla) -containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation* 37 : 123-136, 1988.
- 11) Hultenby, K., Reinholt, F. P., Oldberg, Å. and Heinegård, D. : Ultrastructural immunolocalization of osteopontin in metaphyseal and cortical bone. *Matrix* 11 : 206-213, 1991.
- 12) Yoon, K., Buenaga, R. and Rodan, G. A. : Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148 : 1129-1136, 1987.
- 13) Noda, M., Yoon, K., Prince, C. W., Butler, W. T. and Rodan, G. A. : Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type β transforming growth factor. *J. Biol. Chem.* 263 : 13916-13921, 1988.
- 14) Noda, M. and Rodan, G. A. : Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J. Cell Biol.* 108 : 713-718, 1989.
- 15) Raisz, L. G., Trummel, C. L., Holick, M. F., DeLuca, H. F. : 1,25-dihydroxycholecalciferol : a potent stimulator of bone resorption in tissue culture. *Science* 175 : 768-769, 1972.
- 16) Holtrop, M. E., Cox, K. A., Clark, M. B., Holick, M. F. and Anast, C. S. : 1, 25-dihydroxycholecalciferol stimulates osteoclasts in rat bones in the absence of parathyroid hormone. *Endocrinology* 108 : 2293-2301, 1981.
- 17) Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, Å. and Heinegård, D. : Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 4473-4475, 1990.
- 18) Miyauchi, A., Alvarez, J., Greenfield, E. M., Teti, A., Grano, M., Colucci, S., Zamboni-Zallone, A., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L., Cheresch, D. and Hruska, K. A. : Recognition of osteopontin and related peptides by an $\alpha_v\beta_3$ integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 266 : 20369-20374, 1991.
- 19) 新井直也, 大谷啓一, 下川仁弥太, 春日井昇平, 大井田新一郎, 小椋秀亮, 天笠光雄 : 骨吸収に伴うオステオポンチン mRNA 発現の上昇—コルヒチン投与ラットに生じる異所性骨組織を用いた In Situ Hybridization. *日本骨代謝学会雑誌抄録* 号 10 : 147, 1992.
- 20) Waldo, C. M. : Method for the study of tissue response to tooth movement. *J. Dent. Res.* 32 : 690-691, 1953.
- 21) Yamada, S., Ikeda, M. and Eto, K. : Differential expression of c-myc and N-myc during oral organogenesis of the mouse embryo. *Devel. Growth and Differ.* 34 : 239-251, 1992.
- 22) Maniatis, T., Fritsch, F. and Sambrook, J. : *Molecular Cloning ; A Laboratory Manual.* second edition, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.
- 23) 藤田叔宏, 井関祥子, 栗原三郎, 山田俊平, 野村慎太郎, 江藤一洋, 三浦不二夫 : 骨, 軟骨組織の脱灰標本におけるオステオポンチンの発現の in situ hybridization による観察, *日本骨代謝学会雑誌* 10 : 134-142, 1992.

- 24) Toyosawa, S., Ogawa, Y., Chang, C., Hong, S., Yagi, T., Kuwahara, H., Wakasa, K. and Sakurai, M. : Histochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase and carbonic anhydrase isoenzyme II in osteoclast-like giant cells in bone tumours. *Virchows Archiv A Pathol. Anat.* 418 : 255-261, 1991.
- 25) 市原清志 : バイオサイエンスの統計学—正しく活用するための実践理論—. 東京, 1990, 南江堂, 90-99.
- 26) Talmage, R. V. : Morphological and physiological considerations in a new concept of calcium transport in bone. *Am. J. Anat.* 129 : 467-476, 1970.
- 27) 小沢英浩 : 骨の細胞, 須田立雄, 小沢英浩, 高橋栄明編. 骨の科学. 東京, 1990, 医歯薬出版, 41-64.
- 28) Baron, R., Van, P. T., Nefussi, J. R. and Vignery, A. : Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am. J. Pathol.* 122 : 363-378, 1986.
- 29) Rodan, G. A. and Martin, T. J. : Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—A hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* 33 : 349-351, 1981.
- 30) 野村慎太郎 : In situ ハイブリダイゼーション法を用いた骨基質蛋白遺伝子の発現分布. 日本骨代謝学会雑誌 9 : 159-164, 1991.
- 31) Fedorcsák, I. and Ehrenberg L. : Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* 20 : 107-112, 1966.
- 32) Zaidi, M., Moonga, B., Moss, D. W. and MacIntyre, I. : Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 : 68-71, 1989.
- 33) Minkin, C. : Bone acid phosphatase : tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif. Tissue Int.* 34 : 285-290, 1982.
- 34) Van de Wijngaert, F. P. and Burger, E. H. : Demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase in un-decalcified, glycomethacrylate-embedded mouse bone : a possible marker for (pre)osteoclast identification. *J. Histochem. Cytochem.* 34 : 1317-1323, 1986.
- 35) Ikeda, T., Nomura, S., Yamaguchi, A., Suda, T. and Yoshiki, S. : In situ hybridization of bone matrix proteins in undecalcified adult rat bone sections. *J. Histochem. Cytochem.* 40 : 1079-1088, 1992.
- 36) Tezuka, K., Sato, T., Kamioka, H., Nijweide, P. J., Tanaka, K., Matsuo, T., Ohta, M., Kurihara, N., Hakeda, Y. and Kumegawa, M. : Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts. 186 : 911-917, 1992.
- 37) Rodan, G. A. : Mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 6 : 527-530, 1991.
- 38) Dix, D. J. and Eisenberg, B. R. : Myosin mRNA accumulation and myofibrillogenesis at the myotendinous junction of stretched muscle fibers. *J. Cell. Biol.* 111 : 1885-1894, 1990.