

# 学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 686 号	論文提出者 源 千里
<p>論 文 題 目</p> <p>破骨細胞特異的抑制剤（リベロマイシン A）を用いた 持続的矯正力による歯の移動のコントロールについて</p>	

## I. 緒言

骨組織においては、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が絶え間なく繰り返されており、矯正治療での歯の移動時にも、圧迫側の破骨細胞による骨吸収と牽引側の骨芽細胞による骨形成が起こり、歯槽骨の改変がなされている。破骨細胞は、石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞であり、破骨細胞の分化・成熟・機能は、骨芽細胞あるいは骨髄間質細胞の細胞膜上に発現する RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) によって厳格に調節されている。そして、破骨細胞とその前駆細胞はこの RANKL を認識し、成熟破骨細胞に分化する。骨芽細胞が産生する Osteoprotegerin (OPG) は、RANKL のデコイ受容体であり、RANKL と RANK の相互作用を強力に抑制することで、破骨細胞の分化と機能発現を抑制する。OPG 遺伝子欠損マウス (OPG KO マウス) では、破骨細胞の形成が促進し、骨吸収が亢進するといわれている。このマウスは出生時において骨は正常であるが、成長後は骨梁が疎で骨密度が低く重篤な高回転型骨粗鬆症を呈し、骨粗鬆症や歯周組織が脆弱した患者の歯槽骨を調べる上で非常に有用と考えられる。

近年成長期の若者のみならず、補綴前処置や歯周病予防のために矯正治療を希望する成人や高齢者が増加し、矯正治療の需要が増加している。しかし、成人患者の中には歯周組織が脆弱していたり、骨粗鬆症などの全身疾患を有している者が少なくない。

骨粗鬆症治療薬の第一選択薬としてはビスフォスフォネート (BP) があるが、BP は長期にわたり骨に残存し、骨が硬く、脆くなることや、抜歯時の顎骨壊死などの副作用が報告されている。また矯正治療では、歯を積極的に動かす時ばかりでなく、一時的に歯の移動を抑制し、その後再移動させるなど、歯の移動を複雑にコントロールする必要があるが、BP を一旦投与してしまうと、その残存により歯が動かなくなってしまうおそれがある。

そこで近年開発された破骨細胞特異的抑制剤、リベロマイシン A(以下 RMA)に着目した。RMA は半減期が著しく短く、骨吸収能を有する活性型破骨細胞にのみ顕著に取り込まれ、アポトーシスへと導くことで骨吸収を阻害することが報告されている。これを矯正治療に応用することで、投与の中断、再開により歯の移動をコントロールできるのではないかと考えられる。

本研究では、高回転型骨粗鬆症モデルマウスといわれる OPG KO マウスを用いて実験的歯の移動モデルを作成し、歯の移動や周囲歯槽骨を観察した。そして BP および RMA を連続投与、または投与を中断することで、歯の移動や周囲歯槽骨に及ぼす影響について観察を行った。また、高回転型骨粗鬆症や歯周組織が脆弱した患者に対する矯正治療に RMA が有用かどうかを考察し、骨代謝機構を解明することを目的とした。

## II. 実験材料および方法

### 1. 動物および試薬

本研究の実験動物には、生後 8 週齢の雄性 OPG KO マウス (n=24) および

対照群として Wild-type マウス (WT マウス (C57BL/6J)) (n=24) を使用した。試薬は RMA (Reveromycin A 3Na salt)、BP はテイロック (Teijin Pharma, Tokyo, Japan) を用いた。歯の実験的移動は、全身麻酔下で、上顎切歯と左側第一臼歯間に 10gf の Ni-Ti closed coil spring を装着し、左側第一臼歯 (M1) を 14 日間近心移動し、実験群とした (以下 loaded)。対照群は、右側第一臼歯とした (以下 unloaded)。

8 週齢の OPG KO マウス (n=4) ならびに WT マウス (n=4) を用い、RMA 非投与群として 14 日生理食塩水 (saline) を連続投与する群 (以下 SA) と RMA (1.0mg/kg of weight) を 7 日連続投与後中断する群 (RMA+/-)、14 日連続投与する群 (RMA+) の 3 群に対し、Ni-Ti closed coil spring 装着 3 日前より 1 日 2 回腹腔内投与した。BP (1.25mg/kg of weight) は Ni-Ti closed coil spring 装着 5 日前より RMA と同様に 3 群 (SA, BP+/-, BP+) に分け、1 日 1 回腹腔内投与した。

## 2. 評価方法

歯の移動距離、歯周組織のマイクロ CT 像、病理組織学的観察、血清骨代謝マーカーにて評価を行った。

実験的移動 7 日後に吸入麻酔下においてマイクロ CT (実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R\_mCT, Rigaku, Tokyo, Japan) 撮影を行い、14 日後に上顎骨を採取し、検体を撮影し、歯の移動距離を計測した。移動距離の解析は、ソフト TRI/3D-BON (RATOC SYSTEM ENGINEERING CO., LTD, Tokyo, Japan) で行った。

移動距離計測は、矢状断と水平断にて最狭窄部が観察できるよう調節し、計測を行った。

病理組織学的観察は、上顎骨を歯の実験的移動 14 日後に摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。次に、10%EDTA(pH7.2)で約 4 週間、4°C の条件下で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋を行い、5  $\mu$ m の水平断方向の連続組織切片を作製した。組織観察部位は根分岐部から根尖までを 3 等分した根分岐部より 1/3 部位を観察した。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色(H-E 染色)を行い、光学顕微鏡下で歯周組織を観察した。根間中隔の骨量計測に関しては、Sprogar らの方法に準じて行った。

血清骨代謝マーカーの測定は、血清 ALP 値と血中 TRAP 値を計測した。

### 3. 統計的処理

得られた実験データは平均値と標準誤差で示し、統計的な有意差検定は多重比較検定(Turkey' s multiple comparison test)を用いた。全ての統計解析は、GraphPad Prism v.6(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いて行った。p<0.05 を統計的有意差ありと判定した。

## III. 結果

### 1. 移動距離

歯の実験的移動7日後および14日後ではWTマウス SA群と比較してOPG KOマウス SA群では有意に移動距離の増加が認められた。BP投与では、7日後、14日後のOPG KOマウスにおいて、BP+/-群、BP+群はSA群と比較し有意に

移動距離が減少し、WT マウスに近似した値を示した。そして BP+/-群、BP+群の両群間には有意な差は認められなかった。RMA 投与では、7 日後の OPG KO マウス SA 群と比較して RMA+/-群、RMA+群に移動距離が抑えられている傾向があり、14 日後では OPG KO マウス RMA+群は SA 群と比較し有意に移動距離が減少し、WT マウス SA 群に近似した値を示した。そして OPG KO マウス RMA+/-群は RMA+群と SA 群の中間の値を示した。

## 2. マイクロ CT 画像による歯の実験的移動 14 日後における根間中隔歯槽頂部の観察

OPG KO マウス SA 群は M1 根分岐部の粗鬆化および、遠心口蓋根歯槽骨の著しい吸収が認められ、M1、M2 間歯槽骨にも著しい吸収が認められた。BP 投与では、OPG KO マウス SA 群の骨吸収と比較し、BP+/-群、BP+群の骨吸収が著しく抑制されていた。RMA 投与では、RMA+群の骨吸収が抑制され、RMA +/-群では、SA 群に近似した骨吸収を認めた。

## 3. 歯周組織の H-E 染色組織所見および骨量計測

loaded 側 14 日後において、OPG KO マウス SA 群では歯根膜腔の牽引側での拡大や、圧迫側での狭小が認められ、unloaded 側と比較し、著しい歯槽骨吸収が認められ骨梁は疎になっていた。BP 投与では、loaded 側の OPG KO マウス SA 群で認められた根間中隔の骨吸収が BP+/-群、BP+群では抑制され、両群間に有意差は認められなかった。RMA 投与では、RMA+群において根間中隔の骨吸収が抑制され、歯槽骨の骨量が維持された。一方、RMA+/-群にお

いては根間中隔の骨吸収を認め、骨量は SA 群と有意な差を認めなかった。

#### 4. 血清骨代謝マーカーの測定

WT マウス SA 群と比較し、OPG KO マウス SA 群の血中 TRAP 値、血清 ALP 値とも有意に高い値を示していた。BP 投与では、OPG KO マウス BP+/-群、BP+群において血中 TRAP 値、血清 ALP 値ともに著しく減少し、両群間に有意差を認めなかった。RMA 投与では、RMA+群は有意に血中 TRAP 値、血清 ALP 値が減少した。RMA+/-群の血清 ALP 値では SA 群と RMA+群の中間の値を示し、血中 TRAP 値でも、同様の傾向が認められた。

#### IV. 結論

本研究は、矯正治療時における薬剤投与によって自由な歯の移動のコントロールが可能かを探ることを目的とし、高回転型骨粗鬆症モデルマウスである OPG KO マウスに対して持続的矯正力を加えた場合の歯の移動や周囲歯槽骨を観察した。さらに BP、RMA を連続投与、もしくは投与の中断を行った。その結果、OPG KO マウスにおいて、一時的な根周囲歯槽骨の著しい骨吸収によって病的な歯の移動が認められた。そして、BP および RMA を連続投与した結果、破骨細胞活性を抑制し、根周囲歯槽骨は維持され、骨代謝が正常化されたことが示された。さらに、BP を中断した際にはその後の歯の移動距離は抑制され続けたのに対し、RMA を中断した際は歯の移動が再開し、歯の移動距離が増加していた。以上のことより RMA は、矯正治療を行う際に、歯の移動を望まない場合には投与を行い、望む場合には投与を

( 内 容 の 要 約 )

No. 7

愛知学院大学

中止することで歯の移動のコントロールができる有効な薬剤である可能性が示唆された。