

矯正治療と骨細胞生物学の接点

小林 泰浩

松本歯科大学 総合歯科医学研究所 硬組織機能解析学

Crosstalk between clinical orthodontics and bone cell biology

YASUHIRO KOBAYASHI

Division of Hard Tissue Research, Institute for Oral Science, Matsumoto Dental University.

Summary

The recent discovery of receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)–RANK interaction confirms the well-known hypothesis that osteoblasts play an essential role in osteoclast differentiation. Osteoblasts express RANKL as a membrane-associated factor in response to various factors such as 1,25 dihydroxy vitamin D_3 , parathyroid hormone, prostaglandin E_2 and Interleukin-11. The recent progress of bone cell biology has been exploring the mechanism of tooth movement for clinical orthodontics. This review describes the recent studies on the differentiation and survival of osteoclast in orthodontic tooth movement.

はじめに

矯正治療では、歯に矯正力を負荷することによって、歯周組織の改造を促し、歯を目的の位置に移動する。この歯周組織の改造において、歯根膜と歯槽骨の改造が特に重要である。歯根膜が圧迫された部位に近接した歯槽骨では、骨吸収が起こり、歯根膜が引き伸ばされた部位に近接した歯槽骨では、新たな骨の添加が起こる。

1998年、破骨細胞の分化と機能を調節する破骨細胞分化因子 (RANKL, OPGL, TRANCE, ODF) がクローニングされ、骨吸収の調節メカニズムの一端が分子レベルで明らかにされた。この著しい基礎研究の進歩に伴い、歯を移動した時の歯周組織の変化もまた分子レベルで明らかにされつつある。本稿では、破骨細胞の分化と活性化

の分子メカニズムと歯科矯正治療中に起こる歯周組織特に歯槽骨の改造機構との関連について概説したい。

1. 破骨細胞の分化および機能調節機構

破骨細胞の分化および機能発現は、骨芽細胞によって厳密に調節されている¹⁾。すなわち骨芽細胞は、破骨細胞の分化に必須な因子であるマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) と RANKL を発現し、破骨細胞形成を誘導する。また一方で、RANKL のデコイ受容体である分泌型タンパク質である osteoprotegerin (OPG) を産生して、破骨細胞の形成を抑制する。M-CSF は骨芽細胞によって恒常的に分泌されている。しかし、RANKL は活性型ビタミン D_3 、副甲状腺ホルモン (PTH)、プロスタグランジン E_2 (PGE_2)、イ

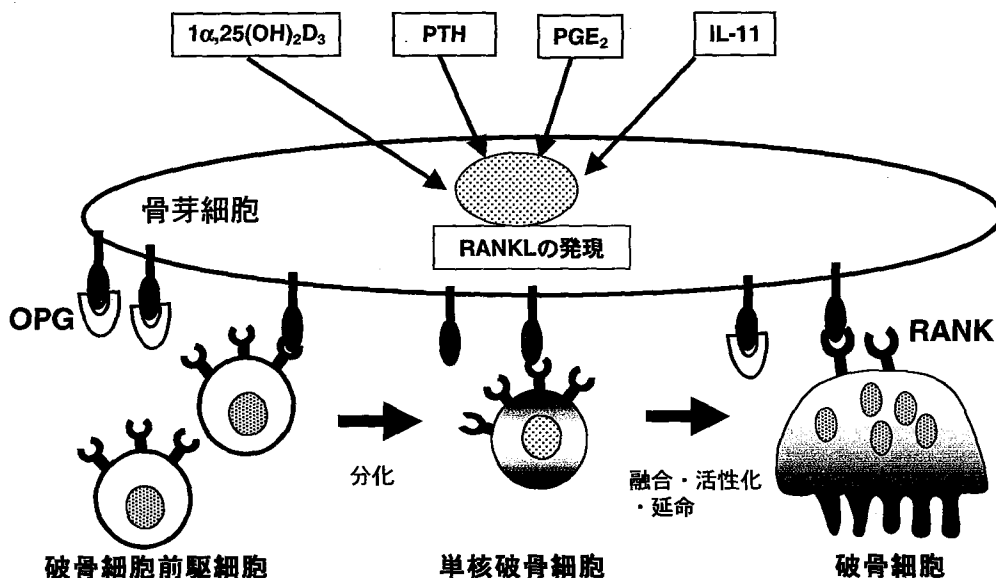


図1：破骨細胞の分化・活性化を調節する骨芽細胞の作用

骨芽細胞は各種の骨吸収促進因子の刺激により RANKL を細胞膜上に発現する。破骨細胞および破骨細胞の前駆細胞は RANKL 受容体である RANK を発現している。RANK に RANKL が結合することにより、破骨細胞の分化・活性化が誘導される。一方、OPG は RANK-RANKL の結合を阻害し、破骨細胞の分化・活性化を抑制する。

インターロイキン11 (IL-11) などの骨吸収因子の刺激により発現が促進される^{2,3)}。RANKL の受容体である RANK を発現する破骨細胞前駆細胞は、骨芽細胞との細胞間接触を介して RANKL を認識し破骨細胞に分化する。また、分化した成熟破骨細胞も RANK を発現しており、RANKL からの刺激により骨吸収活性が誘導される (図1)。

2. 歯の移動時の圧迫側歯槽骨への破骨細胞誘導機構

歯に矯正力を負荷すると、歯は歯槽骨内を移動するという事実はよく知られている。この現象を組織学的に観察すると、歯根膜が圧迫された部分の歯槽骨には破骨細胞が出現し、歯槽骨の吸収像が認められる。この事実は、1950年代に Reitan によって精力的に調べられた⁴⁾。しかし、どのような分子が、歯の移動時に働いているのか長い間不明であった。その後、Yamasaki ら⁵⁾は、プロスタグランジン合成阻害薬であるインドメタシンが、歯の移動を抑制することを示し、歯の移動にプロスタグランジンが重要であることを示した。

前述したように、プロスタグランジン類の中で PGE_2 は、骨芽細胞に作用し、RANKL の発現を強く誘導する。おそらく、圧迫側においては、 PGE_2 のように比較的早期に分泌される局所のケミカルメディエーターにより仲介されていると思われる。Kanzaki ら⁶⁾は、ヒト歯根膜細胞に機械的刺激を与えると誘導型シクロオキシゲナーゼ (cox 2) mRNA の発現が30分後から増加し始め、刺激後6時間から PGE_2 の産生が有意に増加することを報告している。さらに、この歯根膜細胞に PGE_2 を添加すると RANKL mRNA の発現が増加することを示した。この結果は、歯の移動においては、矯正力に反応してまず PGE_2 が産生され、つづいて局所の PGE_2 濃度の上昇に伴い、歯根膜細胞において RANKL が産生され、破骨細胞が誘導されることを示している。しかし、歯根膜細胞が RANKL を発現し、破骨細胞を誘導するにもかかわらず、なぜ破骨細胞は歯根膜腔内には現れないで、歯根膜に近接した歯槽骨表面にのみ出現するのであろうか？

また、 PGE_2 は骨芽細胞に作用し、RANKL の発現を誘導する一方で、破骨細胞の前駆細胞である骨髄マクロファージに直接作用し、RANKL の

破骨細胞分化作用を増強することが示された⁷⁾。我々も株化細胞である RAW 264.7 細胞において、PGE₂ が RANKL の破骨細胞分化作用を増強する所見を得ている⁸⁾。これらの所見は、RANKL 存在下では、PGE₂ は破骨細胞前駆細胞にも作用し、破骨細胞の分化を調節することを意味する。今後、破骨細胞分化における RANKL と PGE₂ の生理的役割の解明が期待される。

3. 牽引側歯槽骨の骨吸収から骨形成への転換機構

歯根膜が伸展する牽引側では、どのような変化が歯周組織に起こるのであろうか。成長期ラットの第 1 臼歯は遠心方向に移動している。したがって、遠心側歯槽骨表面には、多数の破骨細胞が存在し、活発に骨吸収を行っている (図 2A)。まず我々は矯正力を用いて、第 1 臼歯を近心方向へ移動したときに、遠心側歯周組織はどのようにに変化を起こすのか組織学的に観察した。

歯の移動後 1 日目で、歯槽骨表面の細胞はアルカリホスファターゼ陽性の細胞が出現する。また、骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシン陽性の細胞は、移動後 2～3 日目に出現し、活発に新生骨を添加し始めることが明らかになった⁹⁾。一方、歯を動かす前に歯槽骨表面に多数存在した破骨細胞は、1 日目から 2 日目にかけて、歯槽骨表面から消失した (図 2B)。破骨細胞は分化が終了すると死滅する細胞である。通常、細胞死は細胞死に至る過程の形態的な特徴からアポトーシスとネクローシスに分類することができる。では、歯を移動した時に観察される破骨細胞の細胞死はどちらの過程をたどるのであろうか。

牽引側では、前述したように骨芽細胞の分化が起こること、歯根膜の断裂など組織傷害が認められないこと、および破骨細胞が特異的に消失することから、破骨細胞のアポトーシスが起きている可能性が推察された。

そこで、アポトーシスを起こした細胞を検出する方法である TUNEL 法を用いて染色し、破骨細胞を観察した。その結果、歯槽骨から離れた破骨細胞の核は核萎縮を起こしており、この核に特異的に TUNEL 陽性反応が観察された。また、その周囲の歯根膜細胞の核は、完全な形態を保っており、TUNEL 非陽性であった。さらに、透過

型電子顕微鏡においても歯槽骨から離れた破骨細胞の核は、核膜周囲にクロマチンの凝集が観察された。これらのことから、牽引力を負荷すると破骨細胞はアポトーシスを起こして消失することが明らかとなった¹⁰⁾。

次に、この牽引側で認められる破骨細胞のアポトーシスがどのような機構で誘導されているのか検討した。OPG は破骨細胞の延命を阻害すること、また、transforming growth factor β (TGF- β) は骨芽細胞に作用し、OPG の発現を上昇させることが報告されている¹¹⁾。そこで、牽引側における TGF- β および OPG mRNA の発現を *in situ hybridization* 法で検討した。その結果、TGF- β および OPG mRNA は矯正力負荷後 1 日目より歯槽骨近傍の歯根膜内の細胞において著明に増加した (図 2, C-F)。また、この OPG を発現する細胞は、抗オステオカルシン抗体陽性であることから、新たに分化してきた骨芽細胞であることが示唆された¹⁰⁾。次に、*in vitro* の実験系で OPG は破骨細胞のアポトーシスを促進するか検討した。対照と比較して、100 ng/ml の OPG は有意に破骨細胞のアポトーシスを促進した。以上のことから、牽引側では、骨芽細胞の分化に伴い発現する OPG が、急速な骨吸収から骨形成への転換に働いていると考えられる。

また、Itoh ら¹²⁾は、TGF- β ファミリーである bone morphogenetic protein 2, TGF- β , activin A が RANKL の作用を増強し、破骨細胞の分化と延命を促進することを示した。一方、TGF- β は骨芽細胞に直接作用すると OPG の発現を亢進すると報告されている。このような骨芽細胞と破骨細胞に対する TGF- β の作用の相違点は非常に興味深く、その詳しい機構の解明が待たれる。

また、OPG 遺伝子欠損マウスでは、歯周組織における矯正力によって誘導される RANKL の発現は野生型マウスと比較して差が認められない。しかし、破骨細胞は圧迫側に有意に多く出現することが報告されている¹³⁾。この所見は、歯の移動において、十分な RANKL の存在下では、OPG が破骨細胞による歯槽骨吸収を調節していることを示している。

以上のことから、牽引側では、OPG 発現の増加によって、RANKL の作用が著しく阻害されるため、TGF- β による RANKL 増強作用つまり破

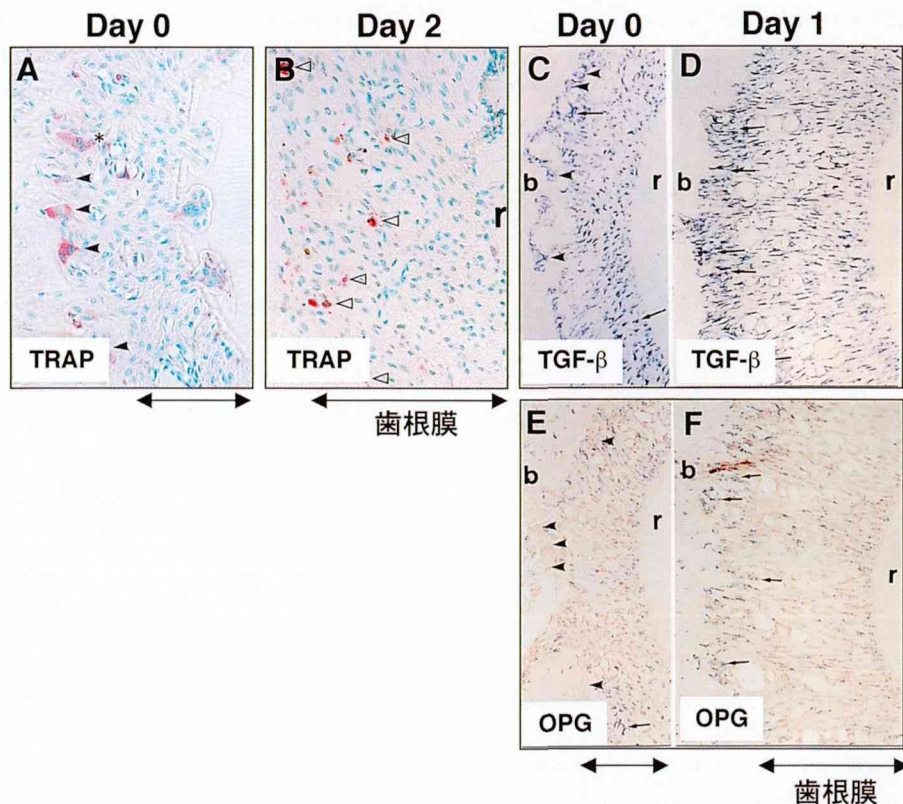


図2：牽引側における破骨細胞の形態およびTGF- β , OPG mRNAの発現変化

5週齢雄性Wistarラットの第1臼歯を20gの矯正力で近心移動した。A, B) 牽引側のTartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色像。A) 矯正力負荷前では、多数のTRAP陽性多核細胞が歯槽骨表面に存在した。B) 2日目の歯槽骨表面にTRAP陽性多核細胞はほとんど存在せず、歯根膜内にアポトーシス破骨細胞が多数認められる(open arrow head)。TGF- β mRNA (C, D) および OPG mRNA (E, F) のin situ hybridization。歯の移動後1日目で、歯槽骨近傍の細胞においてTGF- β mRNA (D, arrow) および OPG mRNA (F, arrow) 発現の著明な増加が認められた。B, D, Fでは歯根膜腔が拡大し、歯根膜細胞が引き伸ばされている。文献10)より改変。

骨細胞の分化・活性化作用は抑制されると考えられる。さらに、OPGは破骨細胞の細胞死を促進し、骨吸収から骨形成への転換を円滑に進めているものと推察される。OPG遺伝子欠損マウスでは、歯の移動に伴う骨吸収から骨形成への転換が変化しているか、今後明らかにされるべき課題である。

4. 破骨細胞の延命に影響を及ぼす因子

破骨細胞は分裂能をもたず、一旦分化が終了すると試験管内では数日で死滅する。このとき、アポトーシスの特徴である核の凝集、DNAの分断化などが認められる。IL-1¹⁴⁾、RANKL¹⁵⁾、M-

CSF¹⁶⁾などのサイトカインやカルシトニン(CT)¹⁷⁾は破骨細胞のアポトーシスを抑制する。一方、骨粗鬆症の治療薬であるビスホスホネートは破骨細胞のアポトーシスを促進することが報告されている¹⁸⁾。我々は、高濃度の一酸化窒素(NO)が高効率に破骨細胞のアポトーシスを誘導すること、さらにM-CSF、RANKL、CTはこのNOによる破骨細胞のアポトーシスを抑制することを報告した¹⁹⁾。この系では、M-CSF、RANKL、CTは、ともにアポトーシスを誘導するcaspase 3、9の活性化を抑制する。さらに、細胞内のアポトーシス抑制因子(caspase 3、7、9の活性化抑制因子)であるXIAP(X linked in-

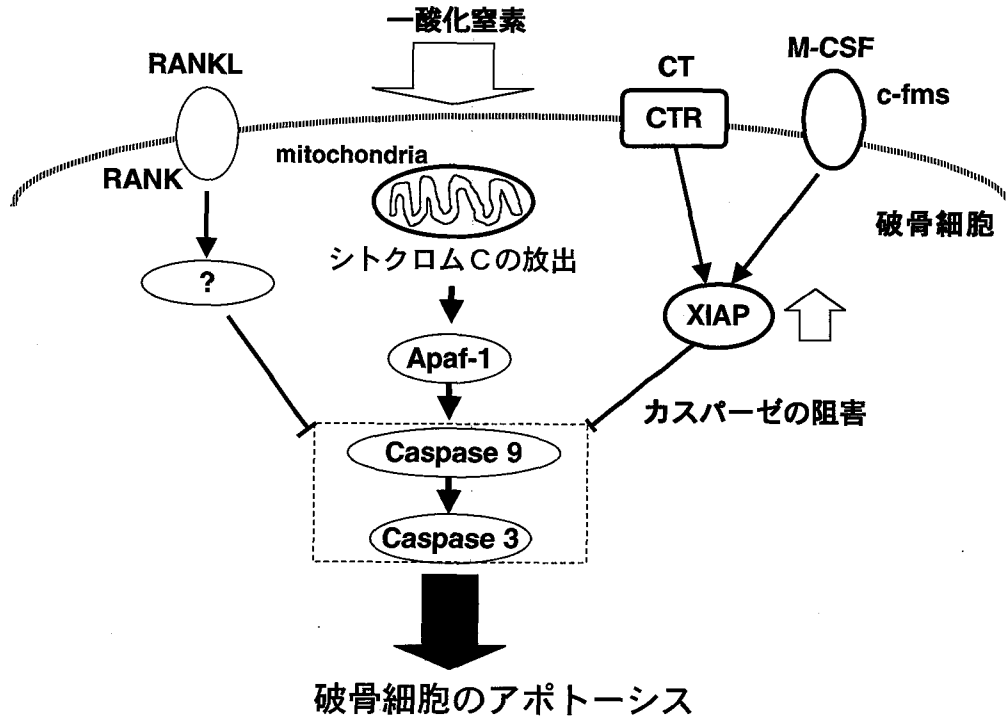


図3：一酸化窒素による破骨細胞のアポトーシスにおける生存因子の作用点

高濃度の一酸化窒素は、破骨細胞の caspase 3 および 9 を活性化する。その結果、破骨細胞はアポトーシスを起こす。caspase 9 が活性化されることから、ミトコンドリアにおけるシトクロム C の放出に伴う Apaf-1 の活性化が起こっているものと推察される。破骨細胞生存因子である M-CSF, CT は caspase 3 および 9 の活性化阻害因子である XIAP を増加させることで、アポトーシスを抑制する。また、RANKL も caspase 3 および 9 の活性化を抑制するが、その機構はいまのところ不明である。

hibitor of apoptosis) をウエスタンブロット法で解析した結果、M-CSF と CT により XIAP が増加したが、RANKL では増加しなかった¹⁹⁾ (図3)。この知見は興味深いもので、破骨細胞に対して骨吸収を抑制しつつ延命させる因子 (M-CSF, CT) と骨吸収を活性化しつつ延命させる因子 (RANKL) のシグナル伝達における共通点と相違点を解くきっかけになるかもしれない。菌を移動したときの菌周組織における破骨細胞の延命や細胞死を促進する分子の発現変化の同定が、今後進展することを期待する。

ところで、基質への接着に依存して増殖または延命する細胞を、基質に接着できない様になるとアポトーシスを起こして死滅する。Frisch ら²⁰⁾ は、このことを細胞の家なし状態 “anoikis” と呼んだ。成熟破骨細胞を浮遊させた状態で培養すると、同様な anoikis が起こり、18時間以内に約 60% の破骨細胞がアポトーシスを起こす¹⁸⁾。この

現象は、肺胞マクロファージでは認められない。さらに、 α -VAD-FMK などのカスパーゼ阻害剤、Zn イオンなどの抗アポトーシス因子は、破骨細胞の anoikis を阻害する²¹⁾。しかし、破骨細胞の延命を促進する生体内因子である M-CSF, RANKL, CT は破骨細胞の anoikis を阻害できない。一方、細胞接着分子であるインテグリンとサイトカインシグナルのクロストークも指摘されている。これらの知見は、破骨細胞が基質に接着し、細胞骨格などが組織化することにより、破骨細胞が発現するサイトカイン受容体およびシグナル伝達が機能することを示唆している。

おわりに

菌の移動における菌槽骨の改造における破骨細胞の分化と細胞死について、最近の知見を含め概説した。歯科矯正学において、菌の移動は基本的な治療手段の 1 つである。しかし、矯正力を負荷

することによって、どのような機構で歯が移動するかに関する我々の知識はまだ十分ではない。近年の破骨細胞および骨芽細胞における bone cell biology の著しい進歩にともない、歯の移動における歯槽骨改造機構についても徐々に解明されつつある。今後、歯槽骨改造機構がさらに解明され、歯科矯正学における治療指針の確立に大いに貢献することを期待する。

文 献

- 1) Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ and Suda T (1988) Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123** : 2600-2.
- 2) Suda T, Takahashi N and Martin TJ (1992) Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev* **13** : 66-80.
- 3) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclast-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 3597-602.
- 4) Reitan K and Rygh P (1994) Biomechanical principles and reactions. In *Orthodontics current principle and techniques*. Graber T. M. and Vanarsdall R. L. Ed. 2 nd ed. 96-192. Mosby, St. Louis.
- 5) Yamasaki K, Miura F and Suda T (1980) Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J Dent Res* **59** : 1635-42.
- 6) Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y and Mitani H (2002) Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* **17** : 210-20.
- 7) Wani MR, Fuller K, Kim NS, Choi Y and Chambers T (1999) Prostaglandin E2 cooperates with TRANCE in osteoclast induction from hemopoietic precursors : synergistic activation of differentiation, cell spreading, and fusion. *Endocrinology* **140** : 1927-35.
- 8) 武 郁子, 小林泰浩, 上松節子, 栗原三郎, 宇田川信之, 高橋直之 (2002) RANKL 誘導性破骨細胞形成に及ぼす PGE2 の効果. 歯科基礎医学会雑誌 44巻5号 (抄録号) p 121.
- 9) Hashimoto F, Kobayashi Y, Miyazaki Y, Kamiya T, Mataka S, Kobayashi K, Kato Y and Sakai H (1997) Antigenecity of pro-osteocalcin in hard tissue : the authenticity to visualize osteocalcin-producing cells. *J Bone Miner Metab* **15** : 122-31.
- 10) Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, Kanaoka K, Miyazaki Y, Nakashima T, Shibata M, Kobayashi K, Kato Y and Sakai H (2000) Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res* **15** : 1924-34.
- 11) Murakami T, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K and Akatsu T (1998) Transforming growth factor- β 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* **252** : 747-52.
- 12) Itoh K, Udagawa N, Katagiri N, Iemura S, Ueno N, Yasuda H, Higashio K, Quinnn JMW, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T, Takahashi N (2001) Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor- κ B. *Endocrinology* **142** : 3656-62.
- 13) Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y and Sasaki T (2002) Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. *Anat Rec* **266** : 218-25.
- 14) Jimi E, Nakamura I, Ikebe T, Akiyama S, Takahashi N, Suda T (1998) Activation of NF- κ B is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem* **273** : 8799-805.
- 15) Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N and Suda T (1999) Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* **163** : 434-42.
- 16) Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R and Chambers TJ (1993) Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med* **178** : 1733-44.
- 17) Salender KS, Harkonen PL, Valve E,

- Monkkonen J, Hannuniemi R and Vaananen K (1996) Calcitonin promotes osteoclast survival in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **122** : 119-29.
- 18) Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sakaki A, Yoneda T, Roodman GD and Mundy GR (1996) Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* **10** : 1478-87.
- 19) Kanaoka K, Kobayashi Y, Hashimoto F, Nakashima T, Shibata M, Kobayashi K, Kato Y and Sakai H (2000) A common downstream signaling activity of osteoclast survival factors that prevent nitric oxide-promoted osteoclast apoptosis. *Endocrinology* **141** : 2995-3005.
- 20) Frisch SM and Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interaction induced apoptosis. *J Cell Biol* **124** : 619-26.
- 21) Sakai H, Kobayashi Y, Sakai E, Shibata M and Kato Y (2000) Cell adhesion is a prerequisite for osteoclast survival. *Biochem Biophys Res Commun* **270** : 550-6.