

〔原著〕

実験的歯の移動時のラット歯周組織圧迫側におけるMMP-13の局在

水上 和博¹⁾, 浜谷 明里¹⁾, 坂倉 康則²⁾, 矢嶋 俊彦²⁾, 溝口 到¹⁾

1) 北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座

2) 北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座

Localization of MMP-13 on the pressure side of rat periodontal tissues during orthodontic tooth movement

Kazuhiro MIZUKAMI¹⁾, Meiri HAMAYA¹⁾, Yasunori SAKAKURA²⁾, Toshihiko YAJIMA²⁾ and Itaru MIZOGUCHI¹⁾¹⁾Department of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido²⁾First Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Orthodontic tooth movement is a multistep biological process characterized by sequential reactions of periodontal tissues against biomechanical stimuli. The purpose of this study was to examine the localization of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), which is thought to be intimately associated with bone resorption and remodeling, during experimental tooth movement using immunohistochemical technique. In 8-week-old Wistar rat, the left maxillary first molar was forced to move mesially with an average load of 10 g by a nickel-titanium superelastic wire. After 12 hours, positive reaction against antibody for MMP-13 appeared in bone lining cells on the pressure side. At 1 day, the reaction in these cells became more intense, and superficial layer of the alveolar bone and some osteocytes showed positive reaction. At 2 days, some osteoclasts appeared adjacent to the superficial layer of the alveolar bone, which showed positive reaction to MMP-13, and the number of osteoblasts increased at 4 days. These results suggest that MMP-13 play an important role in the process of remodeling of the alveolar bone during orthodontic tooth movement.

キーワード：歯の移動, MMP-13, 歯周組織, 歯槽骨, 骨細胞

緒 言

矯正学的歯の移動では、メカニカルストレスによって惹起される局所的な骨形成と骨吸収に伴う歯槽骨の骨改造を生じる (Roberts, 1994)。矯正力を歯に加えると、歯周組織には圧迫力と牽引力の負荷領域が生じる。圧迫側においては、歯根膜の圧迫による血流の阻害、硝子様変性組織の出現、マクロファージ系の細胞による硝子様変性組織の吸収、そして破骨細胞による歯槽骨の吸収が起こる。一方、牽引側では、歯根膜が牽引されることにより血流が活性化され、骨芽細胞、線維芽細胞が増殖し、骨形成が行われる。このような矯正力による歯の移動に伴う歯周組織の変化は、歯周組織に生じる生体力学

的な力に対する一連の生物学的過程と位置づけることができる (Hamaya et al., 2002)。

矯正力による歯の移動に伴う歯周組織の変化に関しては、従来より、多くの研究がなされている。1902年、Sandstedtは、イヌを用いた実験から、圧迫側歯根膜に均質無構造の硝子様変性組織が出現し、それに隣接する歯槽骨で穿下性骨吸収が行われることを初めて報告した (Persson, 2000)。その後、組織学的研究を基に、破骨細胞や骨芽細胞の出現、硝子様変性組織の出現と修復、あるいは骨の吸収や添加の進行について報告がなされてきた (Reitan, 1960)。しかし、従来の歯の移動に伴う歯周組織の反応に関する研究では、破骨細胞、骨芽細胞、あるいは線維芽細胞などを含む歯根膜組織を対象にしたも

受付：平成18年3月31日

のがほとんどであり、骨細胞の反応、あるいは骨細胞とその周囲細胞との関連性に関する研究はほとんど行われていない (Su et al., 1997; Hamaya et al., 2002).

歯槽骨の骨改造において中心的な働きをするのが、歯根膜あるいは歯槽骨骨膜に存在する骨芽細胞、骨細胞および破骨細胞である。骨形成系細胞のひとつである未分化間葉系細胞は、前骨芽細胞、そして骨芽系細胞へと分化していき、最終的には骨細胞やflattening bone cellへの分化という運命をたどる (Karsdal et al., 2004)。骨細胞は、骨芽細胞が自ら分泌した骨基質中に埋め込まれた状態で骨小腔内に存在する。従来、骨細胞は、代謝活性の低い、静的な細胞と考えられてきた。しかし、形態学的にみると骨組織内には1mm²あたり25,000個にもものぼる骨細胞が存在し、その数は骨表面の骨芽細胞のほぼ10倍に相当する (Parfitt, 1977)。また、骨細胞は、骨細胞同士あるいは骨表面の細胞とのギャップジャンクションを介して連絡し合い、基質中で細胞間ネットワークを形成し、骨細管を通した栄養、酸素の供給あるいは代謝産物の排出を行っている (Jones et al., 1993)。また、最近の研究では、骨細胞は、骨細管に存在する体液を介して外力などの外界の環境変化を察知する能力を有することが示唆されている (Aarden et al., 1994; Mullender and Huijskes, 1997; Knothe et al., 1998; Bonewald, 1999)。従って、骨細胞は歯の移動に伴う骨改造現象においても何らかの重要な働きを担っているものと考えられる。

Matrix metalloproteinases (MMPs) は、細胞外マトリックスを基質とするタンパク分解酵素群であり、組織の吸収、改造に大きく関与している (Woessner and Nagase, 2000)。なかでもコラーゲンを基質とし、コラゲナーゼ群と呼ばれるMMP-1, MMP-8, MMP-13は骨中の有機成分の分解に重要な役割を果たしている (Reponen et al., 1994; Tezuka et al., 1994)。一方、破骨細胞におけるコラゲナーゼの産生に関しては、いまだはっきりとした報告はないが、破骨細胞の骨吸収部位への誘導や破骨細胞性骨吸収の前段階の役割を果たすことが示唆されている (Nakamura et al., 2004)。

そこで、本研究では、骨組織の吸収と改造に重要な役割を担っていると考えられるMMP-13の矯正学的歯の移動における骨改造への関与を解明することを目的とし、実験的歯の移動に伴うラット歯周組織の圧迫側におけるMMP-13の局在の変化を免疫組織化学的に検討した。

材料および方法

1. 実験動物

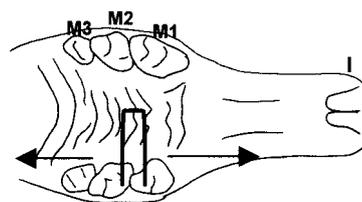


図1 本研究で用いた歯の移動装置の模式図
I; 切歯, M1; 第一臼歯, M2; 第二臼歯, M3; 第三臼歯.
矢印; 歯の移動方向。

実験動物には、生後8週齢のWistar系雄性ラットを用いた。すべての実験動物は、本学動物実験センターにて飼育し、通常のラット用固形飼料 (オリエンタル酵母工業, 東京) と水道水を十分に与え、自由摂食させた。なお、すべての実験動物の取り扱い、北海道医療大学動物実験の指針に基づいて行った。

2. 実験的歯の移動方法

実験的歯の移動は、Waritaら、Hamayaらの方法に準じ加工硬化型ニッケルチタン合金ワイヤー (直径0.152mm, 長さ12mm, Rocky Mountain Morita, 東京) を用いて行った。まず、上顎左側第一臼歯と第二臼歯の咬合面に歯科用ディスクを用い、エアースプレーによる冷却下において、頬舌的な溝を溝間の間隔が3.0mmになるように形成した。歯を乾燥後、削合部位を65%リン酸にてエッチングを施し、レジ系接着剤 (スーパーボンド, Sun Medical, 東京) にて、第一臼歯の溝にワイヤーの一端を接着し、硬化した後、第二臼歯の溝にワイヤーのもう一端を接着した。すべての実験群において上顎左側第一臼歯の近心移動を初期荷重約10gで行った (図1)。

3. 実験期間

実験群には、装置装着後、3, 6, 12時間、1, 2, 4日を各3匹、対照群として装置未装着の8週齢および9週齢のラットをそれぞれ3匹ずつ用いた。

4. 組織試料の作製

各実験期間終了後、実験動物をエーテル麻酔下にて4% paraformaldehyde と0.5% glutaraldehyde (0.1M phosphate buffer; PB, pH7.4) の混合液を用い、上行大動脈より灌流固定を行った。上顎骨を摘出後、同固定液を用いて4℃下で12時間、浸漬固定を施した。固定終了後、10% EDTA溶液 (0.01M phosphate buffer saline; PBS, pH7.4) を用い、4℃下で約1か月間脱灰後、通法に従いアルコール系列で脱水し、透徹後、パラフィンに包埋した。臼歯部咬合面に平行に、厚さ6μmの連続横断切片を根分岐部より根尖部まで作製した。一部の切片には、

Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を施した。

5. 免疫染色

通法に従い脱パラフィン, 2% H₂O₂による内因性ペルオキシダーゼの除去, 0.05U/mL chondroitinase ABCによる糖鎖の除去を行った後, 2% goat serum (0.01M PBS) によるブロッキングを施した。次に, マウス抗ラット MMP-13モノクローナル抗体 (Chemicon; PBSによる500倍希釈) による24時間, 4℃下での1次反応を行った。0.01M PBSによる水洗後, 抗体に対する二次抗体 (Vectastain ABCキット, フナコシ) を室温, 1時間で反応させ, 水洗後DAB反応を行った。なお, 対照 (ネガティブコントロール) として一次抗体の代わりにマウスIgGを反応させた。

6. TRAP染色

免疫染色を終了後一部の切片を, Naphthol AS-MX phosphate, N,N-Dimethyl formamide, 100mM L (+)-tartrate, 0.1M acetate buffer (pH5.0), Fast red violet LBを用い30分間, 37℃下で反応させた。水洗後, カウンターステインとしてヘマトキシリン染色を行った。

7. 観察部位

観察部位は, 歯の移動群において硝子様変性組織が出現する上顎第一臼歯遠心頬側根の近心側歯周組織 (歯槽

骨, 歯槽骨に隣接する歯根膜) とした (図2)。

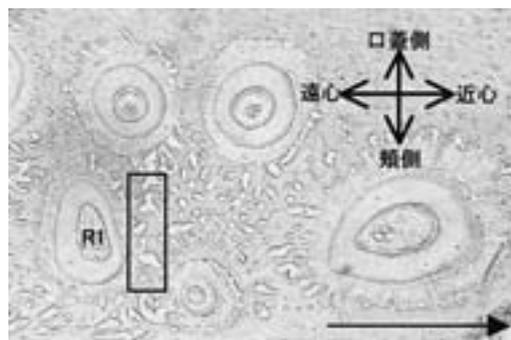


図2 ラット第一臼歯遠心頬側根の近遠心側歯槽骨部 (H-E染色像) 近心根, 近心舌側根, 近心頬側根, 遠心舌側根, 遠心頬側の5根が認められる。黒枠は, 本研究の観察部位である第一臼歯遠心頬側根の近心側歯槽骨部を示す。矢印は実験的歯の移動の方向を示す。

結 果

1. 光学顕微鏡 (H-E染色) 所見

歯の移動を行っていない対照群のH-E染色像では, 歯根膜は, ほぼ一定の幅を示していた (図3 a)。歯に矯正力負荷後3時間では, 圧迫側近心歯根膜の一部に幅の減少が認められ, 6時間では同部にエオジン好性の硝子様変性組織が出現していた (図3 b)。1と2日では硝子様変性組織の領域が広がり (図3 c), 4日においてもまだ硝子様変性組織は観察された (図3 d)。それ以降, 硝子様変性組織周囲に存在するマクロファージ系の細胞による吸収がみられた。

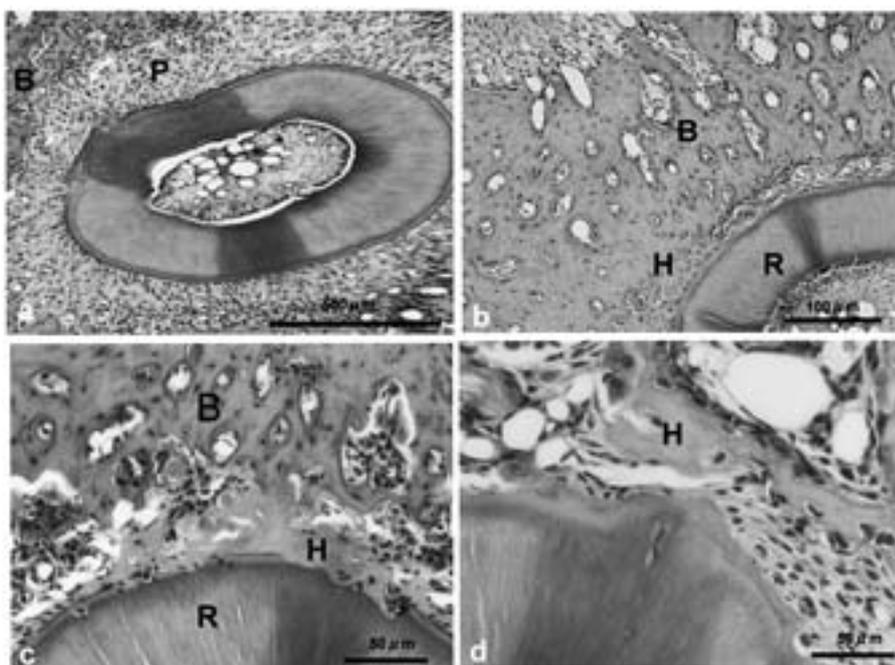


図3 光学顕微鏡 (H-E染色) 写真 (H-E染色像) a; 対照群 (8週齢)。歯根膜はほぼ一定の幅を示す。b; 矯正力負荷後6時間。圧迫側近心歯根膜の一部にエオジン好性の硝子様変性組織が出現している。c; 負荷後1日。硝子様変性組織の領域が広がる。d; 負荷後4日。1日から引き続き4日においても硝子様変性が存在している。P; 歯根膜, B; 歯槽骨。R; 歯根。H; 硝子様変性組織。

2. 免疫染色およびTRAP所見 (弱拡大)

対照群 (8週齢) では, 生理的遠心移動の際の圧迫側に相当する遠心側歯槽骨部表層の細胞に抗MMP-13抗体に対する中等度の反応およびTRAP陽性反応がみられた (図4 a). 矯正力負荷後6時間では, 圧迫側に大きな変化は認められなかったが (図4 b), 12時間, 1日では, 遠心側歯槽骨部に認められたMMP-13抗体に対する反応性は弱まり, 圧迫側に相当する近心歯槽骨表層にMMP-13抗体に対する強い反応が認められた (図4 c). 2日になるとそれらの反応に加えてMMP-13反応陽性部位に隣接する破骨細胞の出現が認められた. 4日になると, 前述した所見に加えて, MMP反応陽性部位に隣接する破骨細胞が多く認められた (図4 d).

3. 免疫染色所見 (強拡大)

矯正力負荷後1日の圧迫側歯槽骨では, bone lining cell, 骨基質表面, 歯槽骨骨細胞にMMP-13陽性反応が

認められた (図5 a). 矯正力負荷後4日の圧迫側歯槽骨では歯槽骨骨細胞の反応に加えて, 破骨細胞が隣接する骨吸収窩表面にMMP-13の陽性反応がみられた (図5 b). マウスIgGを用いたネガティブコントロールでは, 非特異な反応は認められなかった (図5 c). 矯正力負荷後4日の圧迫側歯槽骨ではTRAP陽性でMMP陽性反応は示していない破骨細胞や, MMP陽性反応を示している破骨細胞が混在している像が多く認められた (図6 a). また, 破骨細胞に近接してMMP-13陽性反応を示す骨細胞が多く認められた (図6 b,c).

考 察

1. 実験的歯の移動方法について

実験的歯の移動において, Waldo (1953) がラットの上顎臼歯間にゴム片を挿入して歯を移動させる方法を考案して以来, Waldo法, またはその変法を用いた実験的研究が数多く行われてきた. これらの方法は装置の装着



図4 歯の移動に伴う第一臼歯遠心頬側根の近遠心側歯槽骨部の経時的変化 (免疫染色とTRAPの二重染色)
 a; 対照群. 生理的遠心移動の際の圧迫側に相当する遠心側歯槽骨部にMMP-13の発現およびTRAP陽性反応が見られる. (矢頭). b; 矯正力負荷後6時間. 圧迫側に大きな変化は認められない. c; 矯正力負荷後1日. 遠心側歯槽骨部に認められたMMP-13の発現は弱まり, 実験的歯の移動の際の圧迫側に相当する近心側歯槽骨部にMMP-13の強い発現が認められる. d; 矯正力負荷後4日. MMP反応陽性部位に隣接する破骨細胞が多く認められる.

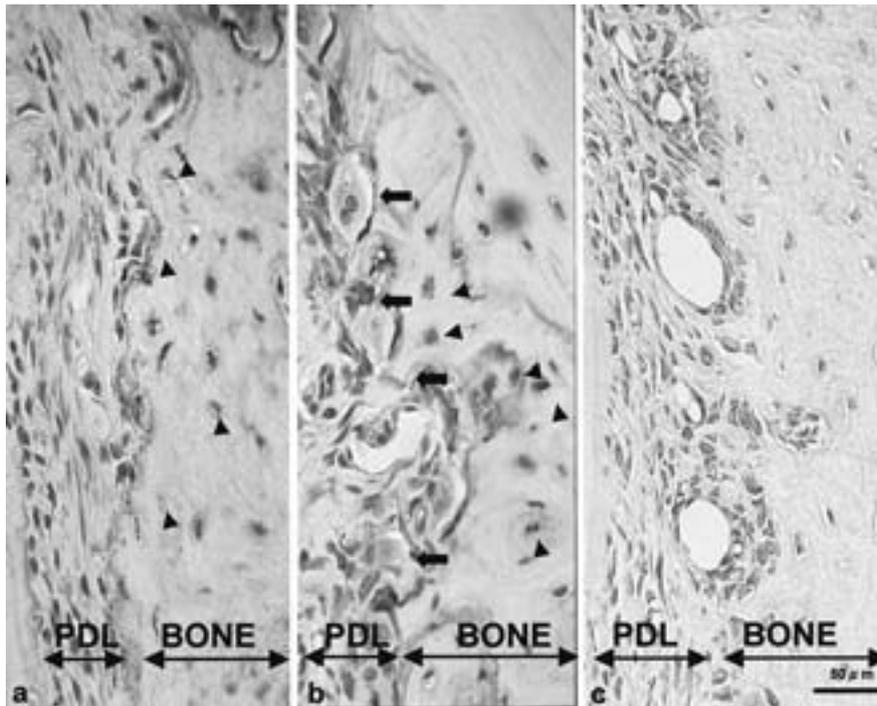


図5 圧迫側歯周組織のMMP-13に対する像(強拡大)

a: 1日. 矯正力負荷後1日の圧迫側歯槽骨.1日では, bone lining cell, 骨基質表面, 歯槽骨骨細胞(矢頭)にMMP-13陽性反応を認める.

b: 4日. 矯正力負荷後4日の圧迫側歯槽骨. 歯槽骨骨細胞の反応に加えて, 破骨細胞が隣接する骨吸収窩表面(矢印)にMMP-13の陽性反応が見られる. c: 対照.

が簡便であるという利点を有するが, 生理的範囲を超えた過剰な矯正力が発現すること, 矯正力の大きさの調整が困難なこと, ゴム片の挿入によって炎症を誘発する可能性が大きいことなどの欠点が指摘されている. また, Rygh (1972) は, ラット上顎切歯を固定源としてスプリングにより上顎第一臼歯を移動させる方法を用いているが, 常生歯である切歯に矯正装置を装着するため, 装置の脱落, 矯正力の変動, 体重の減少などの問題がある. 本実験に用いた歯の移動方法は, Waritaら (1996) の方法に準じて行った. この方法では, 加工硬化型ニッケルチタン合金ワイヤーの超弾性の特性を利用しているため, 初期荷重約10gという持続的な弱い矯正力を歯に負荷することを可能にしている. また, この方法では, 比較的歯体移動に近い状態で歯が移動するため, 硝子様変性の出現する領域が比較的広範囲に及び, その出現期間が長いため, 変性組織の出現に関わる歯周組織の経時的観察には適しているものと考えられた.

2. 矯正学的歯の移動に対する骨芽細胞の反応

MMP (matrix metalloproteinase) は, タンパク分解酵素の一種であり, コラーゲン, ゼラチン, プロテオグリカンなどの様々な細胞外マトリックスを分解する (Woessner and Nagase, 2000). 酵素の基質特異性を基準にすると, MMP-13 (collagenase 3) は, MMP-1

(collagenase 1), MMP-8 (collagenase 2), MMP-18 (collagenase 4) とともに線維性コラーゲンを主要な基質とするコラゲナーゼに属する (Woessner and Nagase, 2000).

MMP-13は, 免疫組織化学とin situ hybridizationによる研究から, 骨芽細胞, 肥大軟骨細胞 (Blavier and Delaisse, 1995; Fuller and Chambers, 1995; Gack et al., 1995; Johansson et al., 1997; Stahle-Backdahl et al., 1997; Yamagiwa et al., 1999; Zhao et al., 1999; Haeusler et al., 2005) において発現が認められている. MMP-13以外では, 株化骨芽細胞様細胞 (MC 3 T 3 - E 1) とマウス骨髄由来の一次培養骨芽細胞がMMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MMP-14など多くのMMPを発現していることが明らかにされている (Uchida et al., 2000).

本研究の免疫染色の結果をみると, 矯正力未負荷の状態では, 生理的骨吸収を示す遠心側歯槽骨表層に存在する骨芽細胞に局限してMMP抗体に対する反応が認められたのに対し, 活発な骨形成を示す近心側歯槽骨の骨芽細胞には陽性反応が認められなかった. 一方, 矯正力負荷6時間後では歯槽骨を取り巻く力学的環境が逆転し, 遠心側が牽引側に, 近心側が圧迫側になる. その結果, 遠心側のMMP-13陽性反応が消失し, 近心側の骨芽細胞が陽性反応を示した. 成長期ラットの臼歯は, 生理的

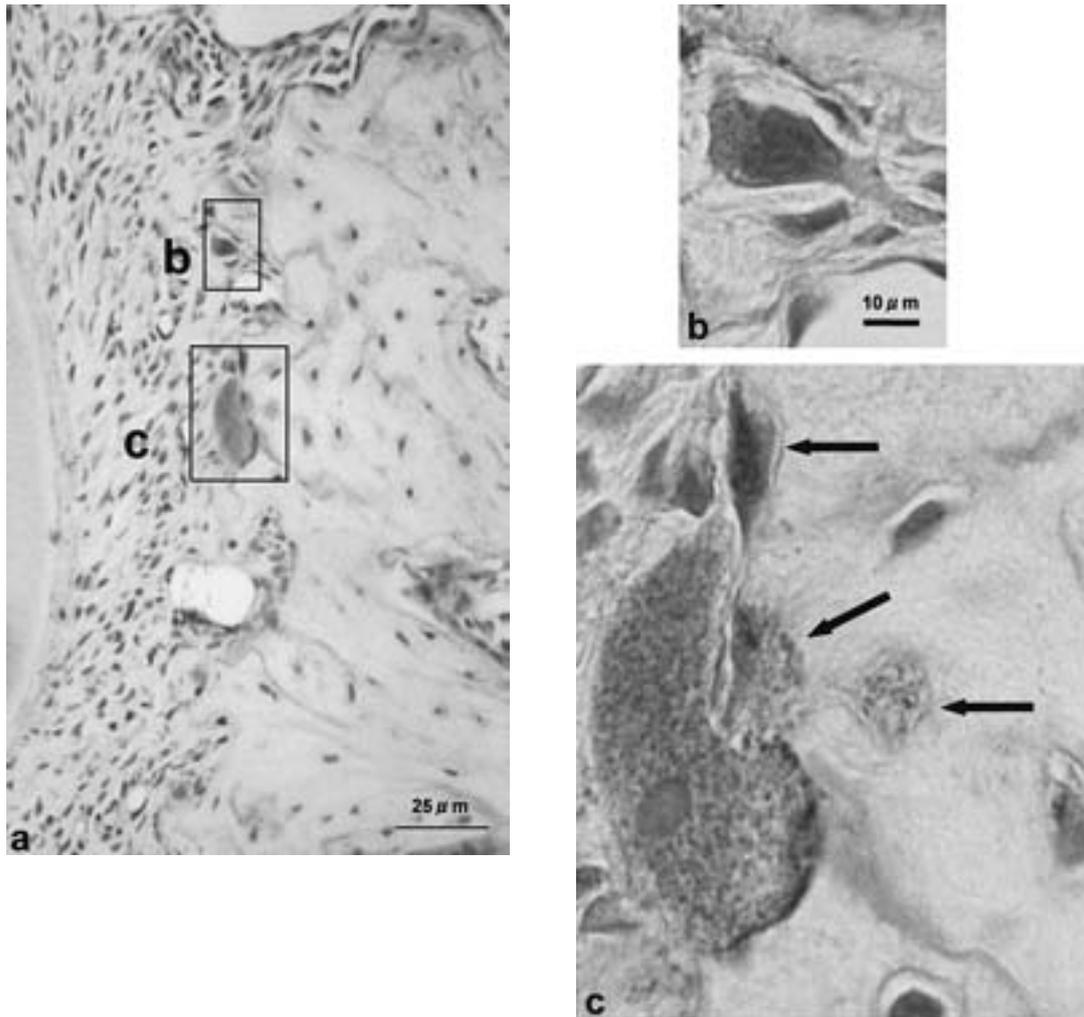


図6a 歯の移動4日目の第一臼歯遠心頬側根の圧迫側歯槽骨の脱灰横断切片（免疫染色およびTRAP染色）
TRAP陽性でMMP陽性反応は示していない破骨細胞に隣接しMMP陽性反応を示している破骨細胞が多く認められる。

図6b,c 破骨細胞に近接してMMP-13陽性反応を示す骨細胞が多く認められる（矢印）。

遠心移動により，遠心側歯槽骨は圧迫側作用部位，近心側歯槽骨は牽引力作用部位となっている。従って，矯正力，特に圧迫力が骨芽細胞のMMP-13の発現と密接な関連性を有することを示唆している。In situ hybridizationを用いて成長期ラット長管骨におけるMMP-13の発現を詳細に検討した研究では，前骨芽細胞と活発な骨基質形成を行っている骨芽細胞ではMMP-13 mRNAの発現が無いのに対し，骨形成活性の低い，扁平な骨芽細胞（flat osteoblast, bone lining cell）と骨細胞においてmRNAの発現が認められた（Sasano et al., 2002）。このことは，本研究において生理的な骨吸収を示す，あるいは人為的な矯正力が引金となって骨形成から骨吸収に移行する領域に存在する扁平な骨芽細胞にMMP-13の発現がみられたこととも整合していると考えられる。また，最近のMC3T3-E1細胞によるin vitroの実験系では，骨芽細胞に圧縮力を負荷すると短時間でMMP-13の発現が亢進することが報告されており（Mitsui et

al., 2006），圧縮力がMMP-13の発現の引金となることが示唆されている。本研究においても矯正力負荷後12時間で圧迫側の骨芽細胞のMMP-13の局在が認められた。

MMP-13の発現はメカニカルストレスだけでなく，副甲状腺ホルモン，活性型ビタミンD3，プロスタグランジンE2，インターロイキン-1β（IL-1β），腫瘍壊死因子-α（TNF-α）などの骨吸収促進因子によっても亢進されることは報告されており（Uchida et al., 2000），矯正学的歯の移動時におけるMMP-13の発現と骨吸収因子との関わりについても今後検討する必要があるものと考えられる。

3. 矯正学的歯の移動に対する破骨細胞の反応

圧迫側に出現した破骨細胞についてみると，MMP-13抗体に対して陽性反応を示す細胞と，陰性反応を示す細胞が認められた。過去の研究において，破骨細胞が合

成するMMPとして確定しているのは、MMP-9, MMP-12, およびMMP-14 (Hou et al., 2004) であり、MMP-13を含めた他のMMPの破骨細胞における発現については、現時点でも統一された見解が得られていない (Andersen et al., 2004). MMP-13に関しては、タンパク質レベルでその局在を破骨細胞に認める報告 (Delaisse et al., 1988; Dew et al., 2000) と否定する報告 (Gack et al., 1995), 遺伝子レベルでその発現を認めるもの (Witty et al., 1996) とそうでないもの (Fuller and Chambers, 1995; Gack et al., 1995; Johansson et al., 1997; Stahle-Backdahl et al., 1997; Yamagiwa et al., 1999; Zhao et al., 1999) に分かれている。従って、本研究で認められた破骨細胞におけるMMP-13の局在には、(1) 一部の特殊な破骨細胞がMMP-13を産生している可能性と、(2) MMP-13を含む骨基質を吸収過程で細胞内に取り込んでいる可能性の2つが考えられるが、MMP-13の骨吸収における役割に関しては、MMP-13は、破骨細胞から産生されるMMP-9, MMP-1, cathepsin Kと協調して破骨細胞による骨吸収に関与し、分解された骨の変性コラーゲン断片をゼラチナーゼとして除去する役割を担っていることが示唆されている (Reponen et al., 1994; Tezuka et al., 1994).

4. 矯正学的歯の移動に対する骨細胞の反応

骨細胞は、カルシウムなどのイオンの輸送、外力に対するメカノレセプター、様々な成長因子を介した骨芽細胞や破骨細胞の活性の調整、骨溶解、骨形成・吸収の制御などの様々な生物学的機能を有していることが指摘されている (Pead et al., 1988). また、in situ hybridizationを用いた研究により、様々な細胞外マトリックス (Zhu et al., 2001), 骨細胞が骨改造に関わるインシュリン様成長因子 (IGF), 骨形成因子 (BMP), 骨吸収抑制因子を発現していることが報告されている (Tanaka et al., 1995; Maejima-Ikeda et al., 1997; Kawata and Mikuni-Takagaki, 1998; Mikuni-Takagaki, 1999; Skerry, 1999).

矯正学的歯の移動に対する骨細胞の反応を考える上では、(1) 矯正力によって惹起される歯槽骨内の内部応力と (2) 血流の阻害に伴う貧血と硝子様変性組織の出現による歯槽骨への代謝活性の変化の2つを考慮する必要がある。骨細胞は、メカニカルストレスに対して即時的反応を示し、in vitroの条件ではプロスタグランジン、コネクシン43, c-fos, IGF-IなどのmRNA発現を亢進させることが明らかにされている (Ajubi et al., 1999; Yellowley et al., 2000) が、メカニカルストレスが直接の要

因となって骨細胞のMMP-13の発現を生じているかに関しては明らかではない。また、矯正力負荷による血流障害によって硝子様変性組織に隣接する骨細胞が細胞死を生じることも報告 (Hamaya et al., 2002) されているが、骨細胞のMMP-13の発現と細胞死の関係についても、今後検討していく必要があるものと考えられる。本研究においてMMP-13の反応を示した骨細胞に隣接する歯槽骨表層には、破骨細胞がみつめられた。この領域は、最終的には変性組織直下からの穿下性吸収あるいはその周囲の直接性吸収によって骨吸収を示す運命にある。従って、矯正学的な歯の移動過程における骨細胞の反応は、単なる骨細胞のMMP-13の発現という現象ではなく、それに引き続き起こる骨改造に対しても重要な生物学的意義をもつものと考えられる。

結 論

MMP-13の矯正学的歯の移動における骨改造への関与を解明することを目的としてMMP-13の局在の変化を免疫組織化学的に検討し、以下の結果が得られた。

- 1) 矯正力負荷後6時間までは圧迫側歯槽骨において、ほとんどMMP-13陽性反応は認められなかった。
- 2) 12時間では圧迫側のbone lining cellや骨基質に陽性反応が認められた。
- 3) 1日では、強い陽性反応がbone lining cells, 骨基質の他、歯槽骨骨細胞にも認められた。
- 4) 2日では、それらの反応に加えてMMP-13反応陽性部位に隣接する破骨細胞の出現が認められた。
- 5) 4日以降、非常に多くのTRAP陽性の破骨細胞による骨吸収像が観察された。
- 6) 一部の破骨細胞にMMP-13陽性反応を示す所見が認められた。

以上の結果から、実験的歯の移動において、主に骨吸収を生じる圧迫側歯槽骨骨芽細胞、骨細胞および骨基質表層にMMP-13の局在が認められ、それらは破骨細胞による骨の吸収と密接な関わりがあることが示唆された。

文 献

- Aarden EM, Burger EH and Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55: 287-299, 1994.
- Ajubi NE, Klein-Nulend J, Alblas MJ, Burger EH and Nijweide RJ. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE 2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol* 276: E171-178, 1999.
- Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT and Delaisse JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in os-

- teoclasts : evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone* 35 : 1107–1119, 2004.
- Blavier L, Delaisse JM. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J Cell Sci* 108 : 3649–3659, 1995.
- Bonewald LF. Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Metab* 17 : 61–65, 1999.
- Delaisse JM, Eeckhout Y and Vaes G. Bone-resorbing agents affect the production and distribution of procollagenase as well as the activity of collagenase in bone tissue. *Endocrinology* 123 : 264–276, 1988.
- Dew G, Murphy G, Stanton H, Vallon R, Angel P, Reynolds JJ and Hembry RM. Localisation of matrix metalloproteinases and TIMP-2 in resorbing mouse bone. *Cell Tissue Res* 299 : 385–394, 2000.
- Fuller K and Chambers TJ. Localisation of mRNA for collagenase in osteocytic, bone surface and chondrocytic cells but not osteoclasts. *Cell Sci* 108 : 2221–2230, 1995.
- Gack S, Vallon R, Schmidt J, Grigoriadis A, Tuckermann J, Schenkel J, Weiher H, Wagner EF and Angel P. Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differ* 6 : 759–767, 1995.
- Haesler G, Walter I, Helmreich M and Egerbacher M. Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation. *Calcif Tissue Int* 76 : 326–335, 2005.
- Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T and Abiko Y. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int* 70 : 117–126, 2002.
- Hou P, Troen T, Ovejero MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I, Ferreras M, Sato T, Shapiro SD, Foged NT and Delaisse JM. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts : new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone* 34 : 37–47, 2004.
- Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J and Kahari VM. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 208 : 387–397, 1997.
- Jones SJ, Gray C, Sakamaki H, Arora M, Boyde A, Gourdie R and Green C. The incidence and size of gap junctions between the cells in rat calvaria. *Anat Embryol* 187 : 343–352, 1993.
- Karsdal MA, Andersen TA, Bonewald L and Christiansen C. Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes : MT1-MMP maintains osteocyte viability. *DNA Cell Biol* 23 : 155–165, 2004.
- Kawata A and Mikuni-Takagaki Y. Mechanotransduction in stretched osteocytes—temporal expression of immediate early and other genes. *Biochem Biophys Res Commun* 246 : 404–408, 1998.
- Knothe MLT, Niederer P and Knothe U. In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat in an environment devoid of mechanical loading. *Bone* 22 : 107–117, 1998.
- Lean JM, Mackay AG, Chow JW and Chambers TJ. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I : an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *Am J Physiol* 270 : E 937–945.
- Maejima-Ikeda A, Aoki M, Tsuritani K, Kamioka K, Hiura K, Miyoshi T, Hara H, Takano-Yamamoto T and Kumegawa M. Chick osteocyte-derived protein inhibits osteoclastic bone resorption. *Biochem J* 322 : 245–250, 1997.
- Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab* 17 : 57–60, 1999.
- Mitsui M, Suzuki N, Koyama Y, Yanagisawa M, Otsuka K, Shimizu N and Maeno M. Effect of compressive force on the expression of MMPs, PAs, and their inhibitors in osteoblastic Saos-2 cells. *Life Sci*, Epub ahead of print, 2006.
- Mullender MG and Huiskes R. Osteocytes and bone lining cells : which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone. *Bone* 20 : 527–532, 1997.
- Nakamura H, Sato G, Hirata A and Yamamoto T. Immunolocalization of matrix metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia. *Bone* 34 : 48–56, 2004.
- Parfitt AM. The cellular basis of bone turnover and bone loss : a rebuttal of the osteocytic resorption-bone flow theory. *Clin Orthop* 127 : 236–247, 1977.
- Pead MJ, Suswillo R, Skerry TM, Vedi S and Lanyon LE. Increased 3 H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo. *Calcif Tissue Int* 43 : 92–96, 1988.
- Persson M. A 100th anniversary : Sandstedt's experiments on tissue changes during tooth movement. *J Orthod* 32 : 27–28, 2000.
- Reitan K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 46 : 881–900, 1960.
- Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I and Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol* 124 : 1091–1102, 1994.
- Roberts WE. Bone physiology, metabolism, and biomechanics in orthodontic practice. In : Graber TM, editor. *Orthodontics—Current Principles and Techniques*. Philadelphia : Mosby, 1994, pp193–234.
- Rygh P. Ultrastructural cellular reactions in pressure zone of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odontol Scand* 30 : 575–593, 1972.
- Sasano Y, Zhu J-X, Tsubota M, Takahashi I, Onodera K, Mizoguchi I and Kagayama M. Gene expression of MMP8 and MMP 13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *J Histochem Cytochem* 50 : 325–332, 2002.
- Skerry TM. Identification of novel signaling pathways during functional adaptation of the skeleton to mechanical loading : the role of glutamate as a paracrine signaling agent in the skeleton. *J Bone Miner Metab* 17 : 66–70, 1999.
- Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA and Lopez-Otin C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 76 : 717–728, 1997.
- Su M, Borke JL, Donahue HJ, Li Z, Warshawsky NM, Russell CM and Lewis JE. Expression of connexin43 in rat mandibular bone and periodontal ligament (PDL) cells during experimental tooth movement. *J Dent Res* 76 : 1357–1366, 1997.
- Tanaka K, Yamaguchi Y and Hakeda Y. Isolated chick osteocytes stimulate formation and bone-resorbing activity of osteoclast-like cells. *J Bone Miner Metab* 13 : 61–70, 1995.
- Tezuka K, Nemoto K, Tezuka Y, Sato T, Ikeda Y, Kobori M, Kawashima H, Eguchi H, Hakeda Y and Kumegawa M. Identifica-

- tion of matrix metalloproteinase9in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem* 269 : 15006–15009, 1994.
- Uchida M, Shima M, Shimoaka T, Fujieda A, Obara K, Suzuki H, Nagai Y, Ikeda T, Yamato H and Kawaguchi H. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 85 : 207–214, 2000.
- Waldo CM. Method for the study of tissue response to tooth movement. *J Dent Res* 32 : 690–691, 1953.
- Warita H, Iida J, Yamaguchi S, Matsumoto Y, Fujita Y, Domon S, Tsuchiya T, Otsubo K and Soma K. A study on experimental tooth movement with Ti–Ni alloy orthodontic wires : comparison between light continuous force and light dissipating force. *J Jpn Orthod Soc* 55 : 515–527, 1996.
- Witty JP, Foster SA, Stricklin GP, Matrisian LM and Stern PH. Parathyroid hormone–induced resorption in fetal rat limb bones is associated with production of the metalloproteinases collagenase and gelatinase B. *J Bone Miner Res* 11 : 72–78, 1996.
- Woessner JF and Nagase H. *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press, NewYork, 2000.
- Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N and Takahashi HE. Expression of metalloproteinase–13 (Collagenase–3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25 : 197–203, 1999.
- Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR and Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 15 : 209–217, 2000.
- Zhao W, Byrne MH, Boyce BF and Krane SM. Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase–resistant mutant mice. *J Clin Invest* 103 : 517–524, 1999.
- Zhu JX, Sasano Y, Takahashi I, Mizoguchi I and Kagayama M. Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem J* 33 : 25–35, 2001.