

論 文 要 旨

矯正学的歯の移動時における  
Gli1 陽性細胞の分化能

令和 4 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

関 有里

## 【緒論】

歯科矯正治療時における歯槽骨の再構築は、矯正学的歯の移動に重要である。歯に矯正力を負荷すると圧迫側では破骨細胞が出現し、歯槽骨が吸収される。一方、牽引側では間葉系幹細胞から骨芽細胞が分化し、新たな歯槽骨が既存の骨に添加される。この様に、歯の周囲の歯槽骨と歯根膜にリモデリングが生じることで、結果的に、歯は力の作用方向へ移動する。これまで、ヒト歯根膜には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在し、歯槽骨形成に関与することが報告されている。しかし、歯根膜における間葉系幹細胞の正確な局在や、矯正治療中の歯の移動における骨芽細胞の起源については、未だ不明である。Gli1 はヘッジホッグシグナル伝達における重要な転写因子であり、歯胚形成時の幹細胞で発現が認められることが明らかとされている。本研究では、矯正学的歯の移動時における牽引側での骨芽細胞の供給源を明らかにする目的で、歯の移動時における Gli1 陽性細胞の分化過程をタモキシフェン誘導性 Cre-loxp システムを用いた細胞系譜解析法により検討した。細胞分化の評価は骨芽細胞分化マーカーである Alkaline phosphatase (ALP), Osterix ならびに I 型コラーゲンの局在を免疫組織化学的手法を用いて解析した。さらに Gli1 陽性細胞の骨細胞への分化を検討するため新生骨をカルセインでラベルし、新生骨中における Gli1 陽性細胞の子孫細胞の局在を検討した。

## 【材料および方法】

タモキシフェンを 2 日間投与した 8 週齢 Gli1-Cre<sup>ERT2</sup>/ROSA26-loxP-stop-loxP-tdTomato (iGli1/Tomato) マウスの上顎切歯と第一臼歯間にクローズドコイルスプリングを装着した。装置装着前及び装着 2, 5, 10 日後に上顎骨を取り出し、4%パラホルムアルデヒドにて化学固定を行った。上顎左側第一臼歯遠心頬側根を観察領域とし、歯の移動量をマイクロ CT にて評価した。一部のサンプルは 10%エチレンジアミン四酢酸で 14 日間脱灰した。脱水後、パラフィンに包埋し、4 $\mu$ m の厚さで切片を作製した。その他の試料は、5%カルボキシメチルセルロースゲルに包埋し、脱灰せずに-80 $^{\circ}$ C で保存した。各凍結試料は 5 $\mu$ m の厚さで切片化した。第一臼歯歯根膜における Gli1/Tomato, PCNA, Endomucin, Smad4,  $\beta$ -catenin, I 型コラーゲン, Osterix の局在を免疫化学的手法を用いて検討した。また、一部の iGli1/Tomato マウスに対しては、観察期間中にカルセインを隔日で投与し、新生骨をラベルした。

## 【結果】

矯正未処置歯では、遠心側の歯槽骨表面に Cathepsin K 陽性の破骨細胞が認められ、近心側

の歯槽骨表面に ALP 活性が観察されたことから、マウス臼歯は遠心へ移動していた。また、ごく少数の Gli1/Tomato 陽性細胞がエンドムチン陽性の血管周囲に局在していた。

歯の移動開始後 2 日目、マイクロ CT 観察により上顎第一臼歯が近心へ移動していることが明らかとなった。牽引側に相当する遠心側の歯根膜では、PCNA 陽性の増殖細胞が多数認められ、Gli1/Tomato 陽性細胞の数が増加していた。一部の Gli1/Tomato 陽性細胞は骨芽細胞マーカーである Osterix の陽性反応を示したことから、Gli1 陽性細胞は骨芽細胞前駆細胞へ分化したと考えられた。歯の移動開始後 5 日目では、多数の Smad4 ならびに  $\beta$ -catenin 陽性細胞が認められた。歯の移動開始後 10 日目になると、遠心側の歯槽骨表面に強い ALP 反応が認められた。また、Osterix の免疫反応を示す Gli1/Tomato 陽性の骨芽細胞が歯槽骨表面に配列していた。

一方、歯の移動開始後 2 日目から、近心側の歯根膜中においても Gli1/Tomato 陽性細胞の数が増加し、ほとんどの細胞が I 型コラーゲン陽性を示したことから、線維芽細胞へ分化したと考えられた。さらに、矯正移動期間中にカルセインを隔日で投与したマウスにおいては遠心歯槽骨表面にカルセイン陽性の新生骨が認められ、この新生骨中に Gli1/Tomato 陽性の骨細胞が認められた。

#### 【考察】

矯正未処置歯の近心側の歯根膜では ALP 活性が、遠心側の歯根膜では Cathepsin K 陽性の破骨細胞が認められた。一方、歯の移動開始後の近遠心側の歯根膜においては矯正未処置歯と逆の反応が認められた。これらの結果より、第一臼歯歯根周囲の歯槽骨における骨代謝回転が矯正移動開始前後で逆転したと考えられる。

本研究では、歯の移動開始後の牽引側の歯根膜において ALP 活性が亢進し、その結果、骨形成が行われた。この過程で、歯の移動開始後 2 日目から遠心側の歯根膜において Gli1 陽性細胞が増殖し、その子孫細胞が歯根膜中にて増加した。歯の移動開始後 5 日目では Smad4 並びに  $\beta$ -catenin 陽性細胞が多数認められ、BMP ならびに Wnt シグナルが活性化することが示された。また、これらのシグナル伝達経路の活性化は Gli1/Tomato 陽性細胞の増殖と一致しており、分化を促進する可能性が示唆された。歯の移動開始後 10 日目では、Gli1 陽性細胞の子孫細胞は Osterix を発現し、歯槽骨の表面に分布したことから、Gli1 陽性細胞はメカニカルストレスに応答して骨芽細胞へ分化することが明らかとなった。

一方、歯の移動開始後の近心側では、Cathepsin K 陽性の破骨細胞による歯槽骨の吸収が起

こっていた。破骨細胞は造血幹細胞由来であるため、Gli1/Tomato 陽性細胞は圧迫側の歯槽骨表面には分布していなかった。また、歯の移動開始後 2 日目の歯根膜中では、I 型コラーゲン陽性の Gli1/Tomato 陽性細胞が出現し、歯の移動開始後 10 日目ではこれらが多数認められた。したがって、これらの子孫細胞は線維芽細胞へ分化し、歯根膜線維の再構築に関与する可能性が示唆された。

#### 【結論】

矯正学的歯の移動時において、牽引側における Gli1 陽性細胞はメカニカルストレスにより増殖し、骨芽細胞ならびに骨細胞へ分化することが明らかとなった。また、圧迫側の Gli1/Tomato 陽性細胞は線維芽細胞へ分化すると考えられた。従って、Gli1 陽性細胞は矯正学的歯の移動時における骨改造現象ならびに歯根膜線維形成に寄与することが明らかとなった。また、分化には BMP ならびに Wnt シグナル伝達経路が関与することが示唆された。