

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 林 香里
論文題目 α_{1B} アドレナリン受容体を介した歯の移動について	

目 次

I. 緒 言	1
II. 対象および方法	1
1. 動物	1
2. 実験的歯の移動 (experimental tooth movement : ETM)	1
3. 薬物投与	2
4. 骨組織解析	2
5. マイクロ CT 解析	2
6. 統計処理	2
III. 結 果	3
1. ETM に及ぼす α_{1B} アドレナリン受容体欠損の影響	3
2. ETM 誘導性の破骨細胞活性に及ぼす α_{1B} アドレナリン受容体欠損の影響	3
3. ETM に及ぼす α_1 アドレナリン受容体遮断薬および作動薬の影響	5
4. ETM 誘導性の破骨細胞活性に及ぼす α_1 アドレナリン受容体遮断薬および作動薬の影響	5
5. ETM 誘発性の骨芽細胞活性に及ぼす α_{1B} アドレナリン受容体欠損、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬 および作動薬の影響	5
6. ETM 誘発性の歯槽骨の骨量変動に及ぼす α_{1B} アドレナリン受容体欠損、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬 および作動薬の影響	6
IV. 考 察	8
V. 結 論	10
謝 辞	10
文 献	10

I. 緒 言

矯正歯科治療は、不正な咬合状態から適正な咬合状態を構築することを目的とするが、歯の移動速度には限度があるため、治療期間が長期に及ぶことが多い。治療期間が長期にわたると通院が大変になるだけでなく、カリエスリスクも増大する。また、上顎前突の患者で抜歯スペースを上顎前歯の舌側移動に使用するため、上顎臼歯の近心移動防止の目的でスクリューを植立することもあり、その侵襲性は大きい。そのため、歯の移動が薬物投与により制御可能になることは、矯正歯科治療にとって極めて有益であると考えられる。

歯科矯正力による歯の移動ではメカニカルストレスが歯に付与されると、圧迫側歯槽骨の骨は吸収され、牽引側歯槽骨には骨添加が起きる¹⁾。実験的歯の移動(experimental tooth movement : ETM)の研究から、歯の移動により局所での骨代謝の活性化に伴い、歯根膜における交感神経を含む神経線維の分布が変化することが報告されている²⁻⁷⁾。交感神経が骨組織に広く分布していることは古くから知られていたが、骨代謝への影響については長らく不明であった⁴⁻⁷⁾。しかし、交感神経系による骨代謝の制御機構についてこの10年ほどで急速に解明が進んでいる。交感神経活動が低下した動物では、 β_2 アドレナリン受容体欠損($\beta_2^{-/-}$)マウスと同様に、骨形成の増加および骨吸収の減少により骨量の増加を示す^{8,9)}。一方、交感神経系の亢進した動物は、 β アドレナリン受容体作動薬を投与した動物と同様に、骨形成の減少および骨吸収の増加による骨量の低下を示す¹⁰⁻¹²⁾。また、in vivo および in vitro の実験において、 β_2 アドレナリン受容体シグナル伝達は、RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)を介した破骨細胞形成を促進する^{11,13)}。RANKLは、破骨細胞前駆体に発現しているRANKに結合することにより作用し、破骨細胞前駆体から破骨細胞への分化を促進する¹⁴⁾。これらの知見は、交感神経系が、 β_2 アドレナリン受容体シグナル伝達を介した骨リモデリング(骨形成の増加および骨吸収の減少)を調節することを示している。

Satoら³⁾は、これまでに非選択的 β および選択的 β_2 アドレナリン受容体遮断薬が、破骨細胞活性を抑制し歯の移動を抑制することを報告した⁴⁾。またCaoら¹⁵⁾は、 β_2 アドレナリン受容体の欠損が、破骨細胞分化および歯の移動量を減少させることを報告した。これらの結果は、 β アドレナリン受容体シグナル伝達が、破骨細胞の活性化を介して歯科矯正力による歯の移動を促進することを示している。

アドレナリン受容体は、神経伝達物質およびホルモンとして放出されるカテコールアミンによって刺激され、骨を含む末梢組織の様々な生理学的機能を調節するのに重要な役割を果たすことが知られている^{11,13,16-18)}。アドレナリン受容体は9つの異なるサブタイプ(α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D} 、 α_{2A} 、 α_{2B} 、 α_{2C} 、 β_1 、 β_2 、 β_3)に分類されており¹⁹⁻²³⁾、骨芽細胞は α_{1B} 、 α_{1D} および β_2 アドレナリン受容体のmRNAを発現し、破骨細胞は α_{1A} 、 α_{2B} および β_2 アドレナリン受容体のmRNAを発現していることが報告されている^{17,24,25)}。

また、 α_1 アドレナリン受容体シグナル伝達が骨代謝に及ぼす影響についても報告されている。神経-骨芽細胞/破骨細胞の伝達は α_1 アドレナリン受容体を介して起こり、 α_1 アドレナリン受容体シグナル伝達はin vitroで骨芽細胞増殖を増加させることが報告されている^{24,26-28)}。Tanakaら¹⁷⁾は、 α_{1B} アドレナリン受容体欠損($\alpha_{1B}^{-/-}$)マウスの骨量が骨形成の低下により減少すること、および α_1 遮断薬であるプラゾシン(prazosin : PRA)の全身投与が、骨形成を低下させることを報告している。in vitroの研究では、 α_1 作動薬のシラゾリンが骨芽細胞におけるRANKLのmRNA発現を増加させることが報告されている²⁹⁾。しかし、歯科矯正力による歯の移動における α_{1B} アドレナリン受容体の関わりについては未だ解明されていない。したがって、本研究では、歯科矯正力による歯の移動における α_{1B} アドレナリン受容体シグナル伝達の影響を検討した。

II. 対象および方法

1. 動物

実験1では9週齢雄性の $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスおよび野生型(Wild Type : WT) C57BL/6Jマウスを使用した。実験2では9週齢の雄性野生型 C57BL/6Jマウス(Japan SLC Inc, Hamamatsu, Japan)を使用した。動物実験は、愛知学院大学歯学部動物実験ガイドラインに従って実施した。マウスを体重別に無作為に抽出し、群に割り当て、1週間飼育環境に順応させた後実験に使用した。室温 $23\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ の下、標準飼料と飲料水を自由に摂取できる環境で飼育した。実験期間中、1日毎に体重を計測し、グラム単位で記録した。体重はSartorius BJ 600(Sartorius Corporation, Edgewood, NY, USA)を用いて記録した。

2. 実験的歯の移動(ETM)

ペントバルビタールナトリウム(32.4mg/kg, i.p.)に

てマウスに全身麻酔を行い、Waldo 法^{2,30)}に則り上顎第一大臼歯および第二大臼歯 (M1 および M2) の間に矯正用エラストティック (Gary 1/4 インチ、3M Unitek、Saint Paul、USA) を挿入した (図1A)。

3. 薬物投与

実験 2 ではマウスに矯正用エラストティックを挿入した日から、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬であるプラゾシン (prazosin : PRA) (0.03mg / kg)、 α_1 アドレナリン受容体作動薬であるフェニレフリン (phenylephrine : PHE) (0.1mg / kg)、0.9% 生理食塩水 (vehicle : VHE) を5日間、毎日腹腔内注射した。PRA の投与濃度は先行研究¹⁶⁾を参考とし同じ濃度を用いることとした。PHE の投与濃度については、マウスに5種類の異なる濃度の PHE (10, 3, 1, 0.3 および 0.1mg / kg) を3日間投与したところ、最低用量を投与した群以外では、実験期間中に数匹のマウスが死亡したため、最低用量の PHE (0.1mg / kg) を用いることとした。

4. 骨組織解析

マウスから摘出した上顎骨を、4%パラホルムアルデヒドで固定した。次いで20%のエチレンジアミン四酢酸で2週間脱灰した後、5 μ m の厚さの矢状断脱灰切片を作製した。切片は根分岐部から50 μ m~125 μ m のものを使用した (図1)。破骨細胞は酒石酸抵抗性酸性フォ

スファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase : TRAP) で赤色に染色し、歯根周囲歯槽骨の破骨細胞数 (osteoclast number/bone surface : Oc.N / BS) および歯根周囲歯槽骨の破骨細胞面 (osteoclast surface/bone surface : Oc.S / BS) を計測した。また、骨芽細胞は、ヘマトキシリン・エオジンにて染色し、歯根周囲歯槽骨の骨芽細胞数 (osteoblast number/bone surface : Oc.N / BS) を計測した。

5. マイクロ CT 解析

マイクロ CT (動物実験用三次元マイクロ X 線 CT R-mCT、RIGAKU、Tokyo、Japan) および TRI / 3D-BON (Ratoc、Tokyo、Japan) ソフトウェアを用いて、歯の移動の評価を行った。上顎骨は、90keV、88 μ A の X 線エネルギー、および20 μ m 等方性ボクセルサイズを用いてスキャンした。咬合面観の画像を用いて M1 と M2 の最狭窄部を歯の移動量として計測した (図2A)。海綿骨の骨形態計測では、3 根の接線に囲まれた領域において、根分岐部から根尖を3等分し、その中央を占める領域の歯槽骨の骨量 / 組織量 (alveolar bone volume : A.BV/TV) を計測した (図1B)。

6. 統計処理

得られた実験結果は、GraphPad Prism バージョン 6.0 for Windows (GraphPad Software、San Diego、CA)



図1 ワルド法による歯の移動と骨組織および骨量計測部位

(A) 矯正用エラストティックが上顎右側第一臼歯 (M1) と第二臼歯 (M2) の間に挿入された図を表す。骨組織解析に使用した切片は、根分岐部から50 μ m~125 μ m の間のものを使用した (灰色の部分)。CTRL : ETM 開始前、ETM : ETM 開始後。
(B) 歯槽骨の骨量 / 組織量 (alveolar bone volume : A.BV/TV) は3 根の接線に囲まれた領域において、根分岐部から根尖を3等分し、その中央を占める領域の歯槽骨を計測した。M : 近心根、DB : 遠心頬側根、DP : 遠心口蓋根。

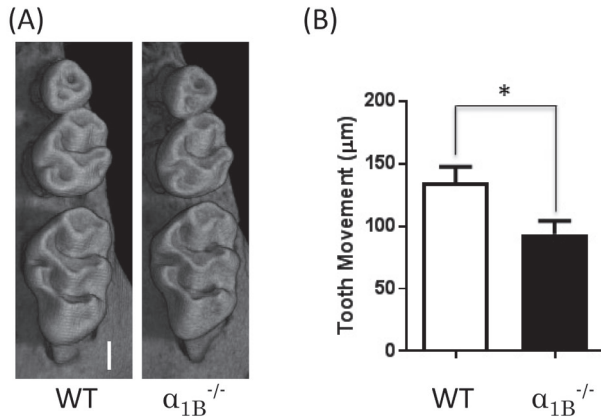


図2 歯の移動距離に対する α_{1B} アドレナリン受容体欠損の影響
(A) ETM5日目のWTマウスおよび $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスにおける上顎右側大白歯の代表的な画像。矯正用エラストイックを上顎第一臼歯と第二臼歯の間に5日間挿入した後、マイクロCTにて撮影した。スケールバー=500 μ m。WT:野生型マウス。
(B) マイクロCTによる歯の移動量の分析。 $\alpha_{1B}^{-/-}$: α_{1B} アドレナリン受容体欠損マウス。グラフ内のバーは平均 \pm 標準誤差を表す。n=10, 13 (WT, $\alpha_{1B}^{-/-}$)。有意差を*p<0.05 (WTと $\alpha_{1B}^{-/-}$ との有意差)で示した。

を用いて、t-test 或いは analysis of variance (ANOVA) により統計解析した。すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示し、p<0.05を統計的に有意差であると判定した。

Ⅲ. 結 果

実験期間中に、いずれの群においても有意な体重変化は認められなかった(表1)。すなわち、 α_1 アドレナリン受容体欠損、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬であるPRAの投与、または α_1 アドレナリン受容体作動薬であるPHEの投与が、マウスの発育に影響を及ぼしていないことを示している。

表1 α_1 アドレナリン受容体欠損、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬および作動薬の体重 (b.w: body weight) に及ぼす影響
実験1

	WT		$\alpha_{1B}^{-/-}$	
	day 0 (n=10)	day 5 (n=10)	day 0 (n=13)	day 5 (n=13)
b.w. (g)	24.2 \pm 2.1	23.3 \pm 2.4	23.4 \pm 0.9	22.0 \pm 1.3

実験2

	VEH		PRA		PHE	
	day 0 (n=11)	day 5 (n=11)	day 0 (n=9)	day 5 (n=9)	day 0 (n=10)	day 5 (n=10)
b.w. (g)	24.1 \pm 1.6	23.1 \pm 2.1	24.1 \pm 1.8	22.7 \pm 1.9	24.1 \pm 1.5	22.9 \pm 1.7

体重 (b.w.: body weight) 野生型マウス (WT)、 α_{1B} アドレナリン受容体欠損マウス ($\alpha_{1B}^{-/-}$) 0.9%生理食塩水 (VEH) プラゾシン (PRA) フェニレフリン (PHE)

1. ETM に及ぼす α_{1B} アドレナリン受容体欠損の影響

ETM に対する α_{1B} アドレナリン受容体の役割を調べるため、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスおよびWTの上顎骨をETM5日目に摘出し、マイクロCTを用いてM1とM2の間の歯の移動量を計測したところ $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスでは、WTマウスと比較して歯の移動距離が30.6%少なかった(図2B)。この結果は、 α_{1B} アドレナリン受容体が歯科矯正力による歯の移動に関与していることを示している。

2. ETM 誘導性の破骨細胞活性に及ぼす α_{1B} アドレナリン受容体欠損の影響

ETM 中の破骨細胞誘導における α_{1B} アドレナリン受容体の役割を確認するために、破骨細胞パラメーター (Oc.S / BS, Oc.N / BS) を評価した。ETM 開始前の歯槽骨表面には、WTマウスおよび $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスのどちらの群においてもTRAP陽性の破骨細胞はほとんど見られず、両群の間に有意差は認められなかった(図3AB)。ETM5日目では、両群において破骨細胞は著しく増加し、遠心頬側根のOc.S / BSにおいて、ETM 開始前と比較して、WTマウスでは16.3倍、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスでは9.7倍増加した(図3B)。さらに、別の破骨細胞パラメーターであるOc.N / BSにおいて、ETM 開始前と比較して、WTマウスでは15.8倍、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスでは8.9倍に増加した(図2B)。このように α_{1B} アドレナリン受容体欠損ではETMによる破骨細胞の増加は抑制され、その抑制率はOc.S / BSでは48.1%、Oc.N / BSでは52.3%であった。同様の結果が、近心根および遠心口蓋根についても得られた(表2)。これらの知見は、 α_{1B} アドレナリン受容体シグナル伝達が、ETM中の破骨細胞誘導に影響を及ぼすことを示している。

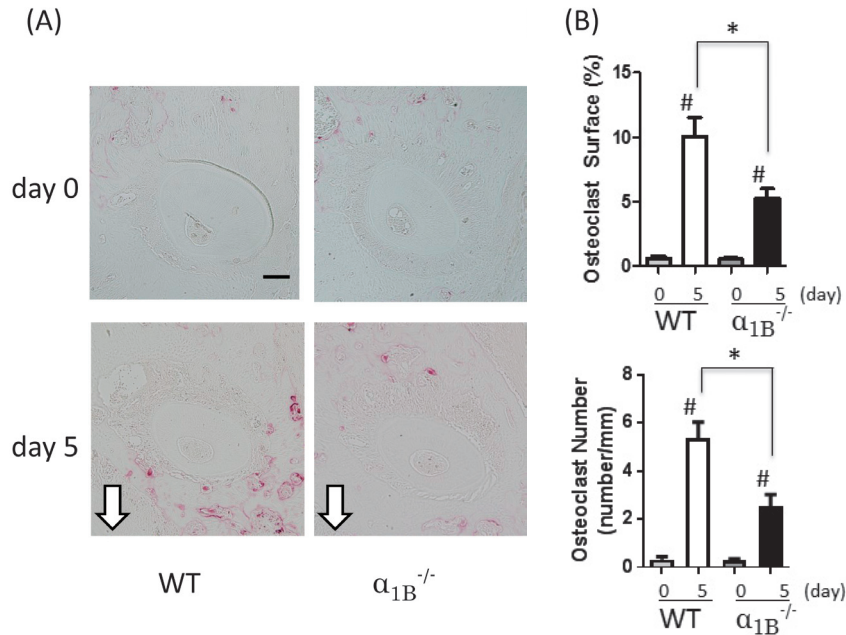


図3 ETM誘導性の破骨細胞活性に対する α_{1B} アドレナリン受容体欠損の影響

(A) 上顎右側第一臼歯 (M1) の遠心頰側根の酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase : TRAP) 染色の代表的な画像。WT マウスと $\alpha_{1B}^{-/-}$ の両群で、0 日目 (ETM 開始前) において破骨細胞はほとんど観察されなかった。白い矢印は矯正力の方向を示す。スケールバー = 100 μ m。WT : 野生型マウス。 $\alpha_{1B}^{-/-}$: α_{1B} アドレナリン受容体欠損マウス。
 (B) 歯根周囲歯槽骨の破骨細胞数 (osteoclast number/bone surface : Oc.N / BS) および歯根周囲歯槽骨の破骨細胞面 (osteoclast surface/bone surface : Oc.S / BS)。グラフ内のバーは平均 \pm 標準誤差を表す。n = 8, 8, 8, 12 (ETM 開始前の WT、ETM5 日目の WT、ETM 開始前の $\alpha_{1B}^{-/-}$ 、ETM5 日目の $\alpha_{1B}^{-/-}$)。有意差を *p < 0.05 (WT と $\alpha_{1B}^{-/-}$ との有意差) および #p < 0.05 (ETM 開始前と ETM5 日目との有意差) で示した。

表2 α_1 アドレナリン受容体欠損、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬および作動薬の破骨細胞活性 (Oc.S/BS : osteoclast surface/bone surface, Oc.N/BS : osteoclast number/bone surface) に及ぼす影響

実験 1

		WT		$\alpha_{1B}^{(-)}$	
		day 0 (n=8)	day 5 (n=8)	day 0 (n=8)	day 5 (n=8)
Oc.S/BS (%)	M	0.76 \pm 0.31	9.01 \pm 1.19 #	1.11 \pm 0.21	3.86 \pm 0.64 #*
	DP	0.64 \pm 0.21	3.42 \pm 1.20 #	0.60 \pm 0.21	4.43 \pm 1.03 #*
Oc.N/BS (mm)	M	0.37 \pm 0.16	3.96 \pm 0.56 #	0.52 \pm 0.10	1.96 \pm 0.46 #
	DP	0.36 \pm 0.13	6.21 \pm 0.78 #	0.30 \pm 0.15	2.66 \pm 0.59 #*

実験 2

		VEH				PRA		PHE	
		day 0 (n=8)	day 5 (n=11)		day 5 (n=9)		day 5 (n=10)		
Oc.S/BS (%)	M	0.55 \pm 0.18	8.23 \pm 1.13 †		3.81 \pm 0.35 *		10.3 \pm 1.47 †		
	DP	0.40 \pm 0.19	9.35 \pm 1.37 †		3.60 \pm 0.80 *		15.3 \pm 1.37 †*		
Oc.N/BS (mm)	M	0.28 \pm 0.10	3.74 \pm 0.45 †		2.04 \pm 0.12 †*		5.14 \pm 0.60 †*		
	DP	0.22 \pm 0.07	4.46 \pm 1.34 †		2.32 \pm 0.58 †*		6.73 \pm 0.65 †*		

野生型マウス (WT)、 α_{1B} アドレナリン受容体欠損マウス ($\alpha_{1B}^{-/-}$) 0.9%生理食塩水 (VEH) プラゾシン (PRA) フェニレフリン (PHE) 近心根 (M) 遠心口蓋根 (DP 根)

3. ETM に及ぼす α_1 アドレナリン受容体遮断薬および作動薬の影響

α_{1B} アドレナリン受容体が ETM に影響を及ぼすことが明らかとなったため、 α_1 アドレナリン受容体の遮断薬 (PRA) や作動薬 (PHE) により、ETM を制御できるかどうかを検討した。ETM 開始後 5 日間毎日、PRA または PHE を投与し、対照群には生理食塩水の投与を行った。PRA 投与群では生理食塩水投与群と比較して、移動距離は 22.4% 少なくなった (図 4AB)。一方、PHE 投与群では生理食塩水投与群と比較して、移動距離は 16.9% 多くなった。この結果は、 α_1 アドレナリン受容体の遮断薬や作動薬により、歯の移動を制御できる可能性を示している。

4. ETM 誘導性の破骨細胞活性に及ぼす α_1 アドレナリン受容体遮断薬および作動薬の影響

α_1 アドレナリン受容体の遮断薬および作動薬の ETM 誘導性の破骨細胞活性に及ぼす影響を検討するため、破骨細胞パラメーター (Oc.N/BS, Oc.S/BS) を調べた。ETM 開始前の状態では、生理食塩水投与群、PRA 投与群、PHE 投与群の全ての群において、破骨細胞はほとんど観察されなかった (図 5AB)。ETM 5 日目では、全ての群において Oc.S/BS、Oc.N/BS は増加した。PRA 投与群では、VHE 投与群と比べて Oc.S/BS の ETM による増加は 54.9% 少なかった。PHE 投与群では、VHE

投与群と比べて Oc.S/BS の ETM による増加は 51.7% 多かった。別の破骨細胞パラメーターである Oc.N/BS においても Oc.S/BS と同様の結果を示した。PRA 投与群では、VHE 投与群と比べて Oc.N/BS の ETM による増加は 51.1% 少なくなり、PHE 投与群では、VHE 投与群と比べて 25.7% 多かった。これらの結果は遠心頰側根で見られたが、近心根、遠心口蓋根についても同様の結果が得られた (表 2)。これらの結果は、 α_1 アドレナリン受容体の遮断薬や作動薬により ETM による破骨細胞誘導を制御できる可能性を示している。

5. ETM 誘導性の骨芽細胞活性に及ぼす α_1 アドレナリン受容体欠損、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬および作動薬の影響

α_1 アドレナリン受容体の骨芽細胞に対する影響を調べるため、骨形成パラメーター (Ob.N/BS) について検討を行った。 α_1 アドレナリン受容体遮断薬、作動薬の投与実験において、ETM 開始前と比較した際に、PRA 投与群のみ ETM 5 日目の Ob.N/BS が 54.3% 少なかった。また ETM 5 日目の Ob.N/BS を VHE 投与群、PRA 投与群、PHE 投与群間で比較した際に、PHE 投与群と PRA 投与群との間にのみ有意差があり、PHE 投与群では PRA 投与群に比べ Ob.N/BS が 89.9% 多かった (図 6AB)。一方、WT マウスと $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスとの間には、有意差は認められなかった。

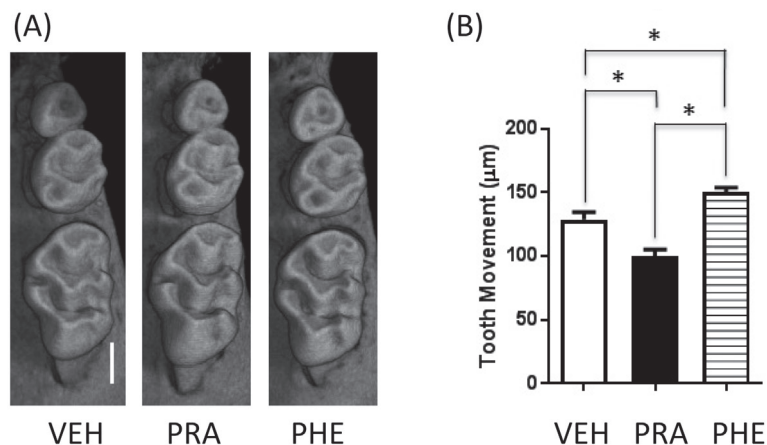


図 4 歯の移動距離に対する α_1 アドレナリン受容体遮断薬 (プラゾシン)、 α_1 アドレナリン受容体作動薬 (フェニレフリン) の影響 (A) 矯正用エラストックを上顎第一臼歯と第二臼歯の間に挿入した後、薬物 (VEH: 0.9% 生理食塩水、PRA: プラゾシン (0.03mg/kg)、PHE: フェニレフリン (0.1mg/kg)) を毎日 5 日間腹腔内投与した。上顎右側大臼歯のマイクロ CT 撮影画像。スケールバー = 500 μm。 (B) マイクロ CT による歯の移動量の分析。グラフ内のバーは平均 ± 標準誤差を表す。n = 11, 9, 10 (VEH, PRA, PHE)。有意差を *p < 0.05 (VEH と PRA または PHE との有意差) で示した。

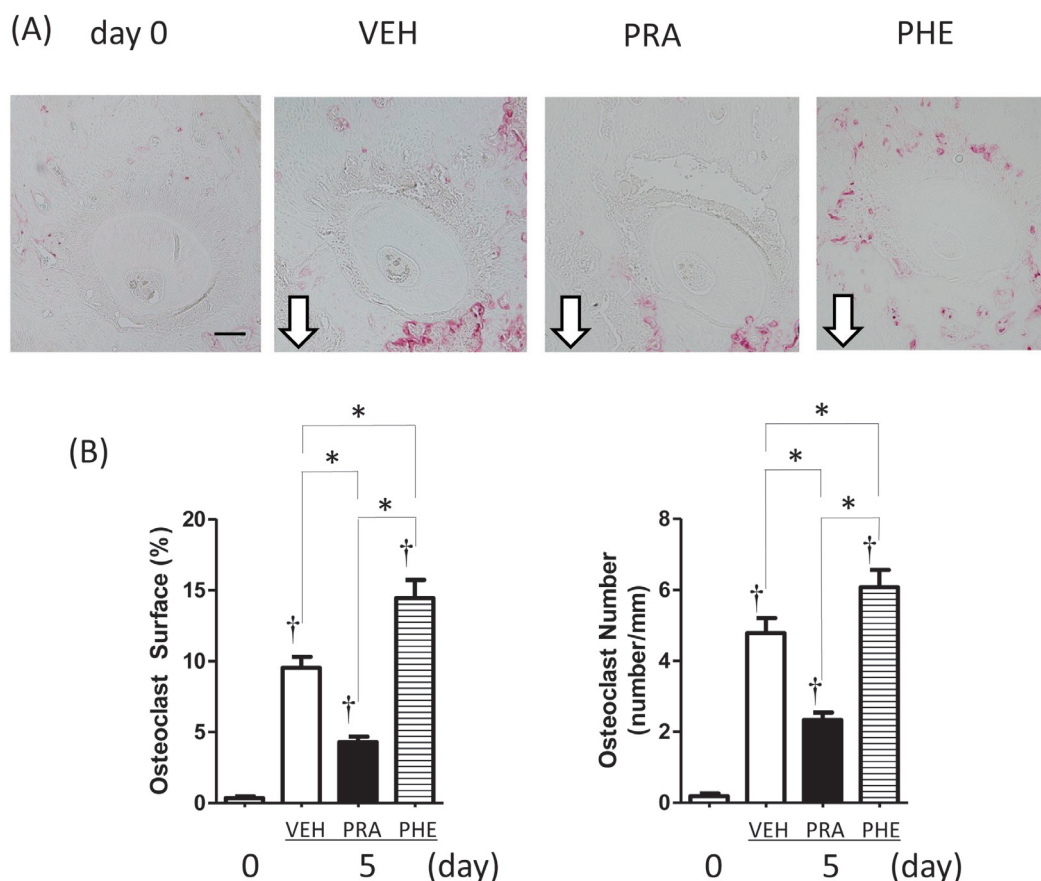


図5 ETM誘導性の破骨細胞活性に対する α_1 アドレナリン受容体遮断薬(プラゾシン)、 α_1 アドレナリン受容体作動薬(フェニレフリン)の影響
 (A) 上顎右側第一臼歯(M1)の遠心頰側根の0日目(ETM開始前)、ETM後5日間のVEH、PRA、PHE投与によるTRAP染色の代表的な画像。0日目にほとんど破骨細胞が観察されなかったが、ETMはすべての群において破骨細胞の増加が認められた。白い矢印は矯正力の方向を示す。スケールバー=100 μ m。
 (B) 歯根周囲歯槽骨の破骨細胞数(osteoclast number/bone surface: Oc.N / BS)および歯根周囲歯槽骨の破骨細胞面(osteoclast surface/bone surface: Oc.S / BS)。PRA投与群はVEH投与群と比べOc.S / BSとOc.N / BSが少なくなり、PHE投与はVEH投与群と比べOc.S / BSとOc.N / BSが多くなった。グラフ内のバーは平均 \pm 標準誤差を表す。n = 8、11、9、10(0日目、VEH、PRA、PHE)。有意差を*p < 0.05 (VEHとPRAまたはPHEとの有意差) および† p < 0.05 (ETM開始前とETM5日目との有意差)で示した。

6. ETM誘導性の歯槽骨の骨量変動に及ぼす α_1 受容体欠損、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬および作動薬の影響

歯槽骨骨量が歯の移動に影響を与えることが報告されている^{2,3)}。そこで、 α_1 アドレナリン受容体が歯槽骨骨量へ与える影響について、 α_{1B} マウスを用いて解析した。図1Bに示すように、根分岐部から根尖を三等分し、その中央を占める領域の歯槽骨のA.BV/TVを計測した。

WTマウスでは対側と比べ、A.BV/TVが19.9%減少したが、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスでは対側と比べ、11.6%しか減少しなかった。この結果は $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスにてETMによる骨量の減少が抑制されることを示している(図7A)。また、生理食塩水、PPA投与群、PHE投与群の各群で骨量を計測したところ、PRA投与群はPHE投与群に比べ、A.BV/TVが33.6%少なかったが、その他についての有意差は認められなかった(図7B)。

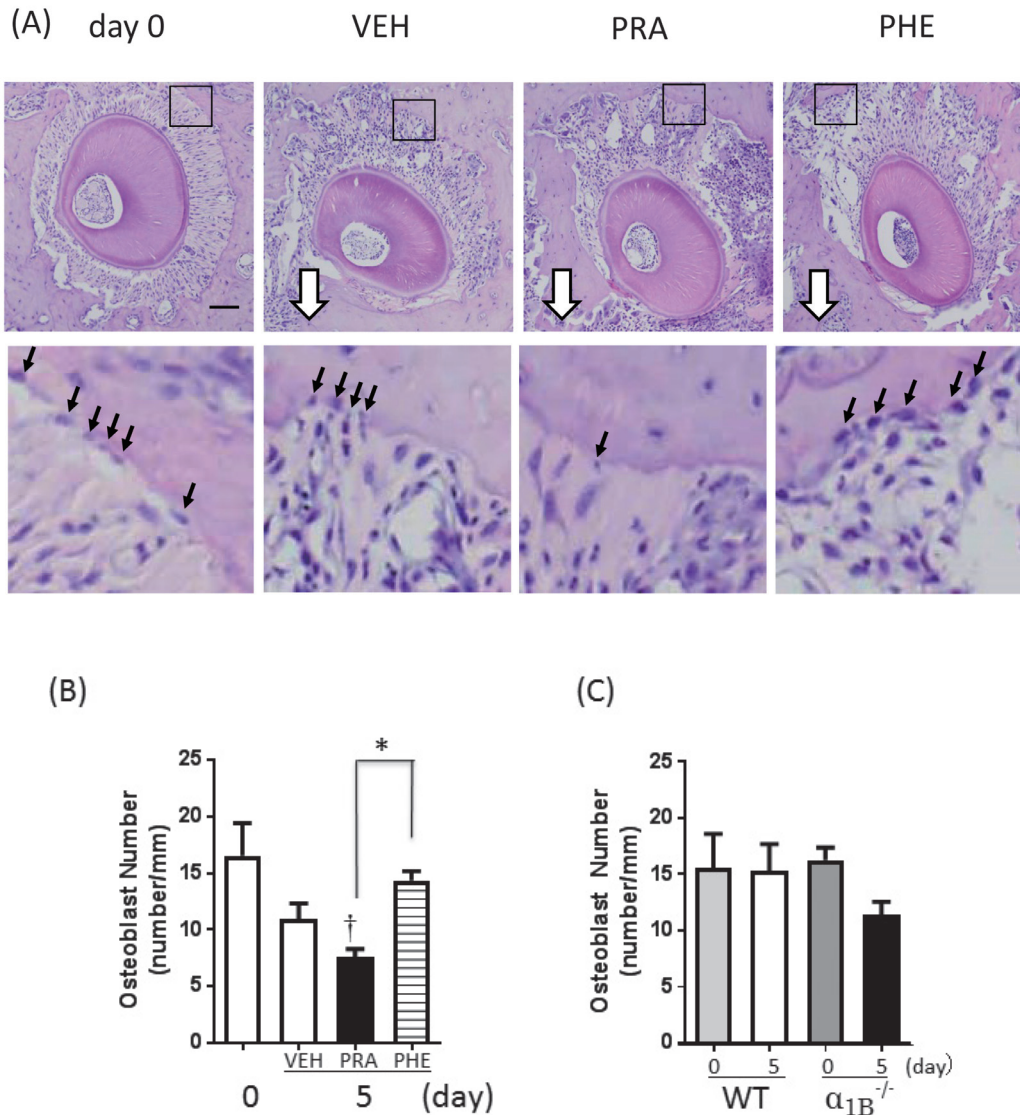


図6 ETM誘導性の骨芽細胞活性に及ぼす α_1 アドレナリン受容体遮断薬（プラゾシン）、 α_1 アドレナリン受容体作動薬（フェニレフリン）、 α_{1B} アドレナリン受容体欠損の影響

α_1 アドレナリン受容体を薬理的に制御したマウス（A、B）及び $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウス（C）において解析した。

(A) 上顎右側第一臼歯（M1）の遠心頬側根の0日目（ETM開始前）、ETM後5日間のVEH、PRA、PHE投与によるヘマトキシリン・エオジン染色の代表的な画像。下の写真は、上の写真の四角で囲まれた領域を高倍率にしたものを表す。白い矢印は矯正力の方向を示す。黒い矢印は骨芽細胞を示す。スケールバー=100 μ m。

(B) 実験2における歯根周囲歯槽骨の骨芽細胞数（osteoblast number/bone surface : Ob.N / BS）の分析。PRA投与群ではOb.N / BSが少なかった。グラフ内のバーは平均 \pm 標準誤差を表す。n=7、7、7、8（ETM開始前、VEH、PRA、PHE）。有意差を* $p < 0.05$ （PRAとPHEの有意差）および† $p < 0.05$ （ETM開始前とETM5日目との有意差）で示した。

(C) 実験1におけるOb.N / BSの分析。有意差はない。グラフ内のバーは平均 \pm 標準誤差を表す。n=8、8、8、8（ETM開始前のWT、ETM5日目WT、ETM開始前の $\alpha_{1B}^{-/-}$ 、ETM5日目 $\alpha_{1B}^{-/-}$ ）。

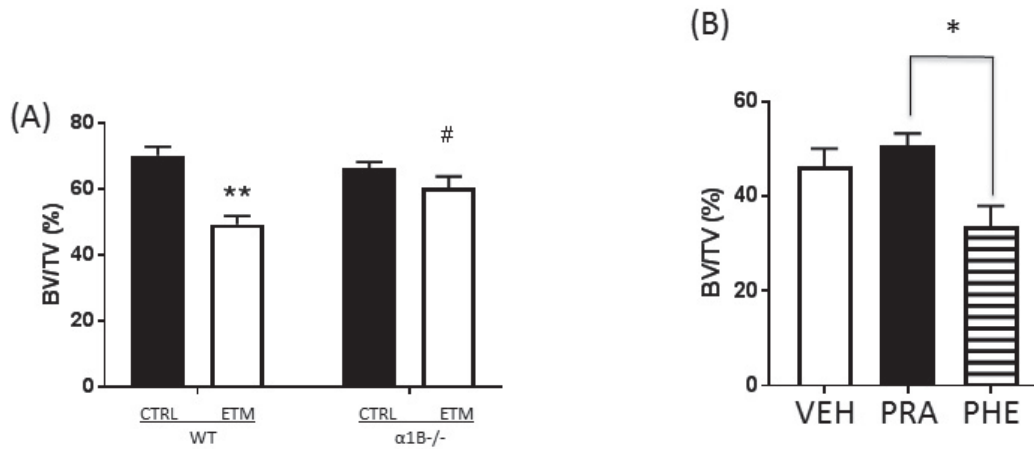


図7 ETMによる歯槽骨骨量への影響

(A) 実験1 (WT および $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスを用いた実験) における歯槽骨の骨量/組織量 (alveolar bone volume : A.BV/TV) の分析。グラフ内のバーは平均±標準誤差を表す。n=10, 10, 13, 13 (ETM開始前のWT、ETM5日目のWT、ETM開始前の $\alpha_{1B}^{-/-}$ 、ETM5日目の $\alpha_{1B}^{-/-}$)。CTRL: 対側、ETM: 実験的歯の移動5日目。有意差を * $p < 0.05$ (対側とWTまたは $\alpha_{1B}^{-/-}$ との有意差) で示した。

(B) 実験2 (WT マウスに薬物投与を行った実験) における A.BV/TV の分析。グラフ内のバーは平均±標準誤差を表す。n=11, 9, 10 (ETM5日目のVHE、ETM5日目のPRA、ETM5日目のPHE)。有意差を * $p < 0.05$ (PRA または PHE との有意差) で示した。

IV. 考 察

交感神経系が歯科矯正力による歯の移動に関与するという研究がいくつか報告されている^{2,3,15}。例えば、交感神経の外科的切除や薬物による化学的交感神経切除術により、ETMによって誘発された破骨細胞の増加が抑制するという報告がある^{2,15,31}。また、 β アドレナリン受容体の遮断薬により歯の移動が抑制され、作動薬により歯の移動が促進するという報告や、 β_2 アドレナリン受容体欠損動物において歯の移動が抑制されるという報告等がある^{2,3,15}。最近、Tanakaら¹⁷は、 α_{1B} アドレナリン受容体シグナル伝達が骨代謝に関与することを示しているが、ETMにおける α_{1B} アドレナリン受容体の関与については未だ不明である。

そこで本研究では、まず、ETMに対する α_{1B} アドレナリン受容体の効果を調べるために、エラストックをWTおよび $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスの上顎第1および第2臼歯の間に挿入し、両者を比較した。 α_{1B} アドレナリン受容体の欠損は、 β_2 アドレナリン受容体遮断薬および交感神経切除術と同様に^{2,3}、ETM中の破骨細胞誘導と歯の移動を抑制した。この結果は、 $\beta_2^{-/-}$ マウスの結果¹⁵と同じであった。以上の結果から、実験的歯の移動における α_{1B} アドレナリン受容体シグナル伝達が、 β_2 アドレナリン受容体シグナル伝達と同様に、破骨細胞活性および歯の移動を促進することを認めた。

ETMにおける α_{1B} アドレナリン受容体シグナル伝達の関与は、薬理学的実験によってさらに支持された。 α_1 アドレナリン受容体遮断薬であるPRA、 α_1 アドレナリン受容体作動薬であるPHEをETM中に毎日投与し、これらの群の結果をVEH投与群の結果と比較した。その結果、PRAは歯の移動およびETM誘導性の破骨細胞パラメーターの増加を減少させ、PHEは歯の移動およびETM誘導性の破骨細胞パラメーターの増加および歯の移動量の増加が見出された。これは、歯の移動を薬物により制御できる可能性を示唆している。

歯科矯正力による歯の移動は、局所的な骨のリモデリングを刺激する。骨リモデリングにおいて、破骨細胞による骨吸収は、骨芽細胞による骨形成に先行する。対照群 (ETM開始前) の歯槽骨の表面に破骨細胞はほとんど認められなかったが、ETMは歯槽骨の破骨細胞パラメーターを著しく増加させた。 α_{1B} アドレナリン受容体を欠失させるとETM誘導性の破骨細胞の増加が少なくなり、その結果、歯の移動が少なくなったと考えられる。破骨細胞は、生存、増殖、分化および活性化のためにマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) およびRANKLが必須である。RANKLは歯の移動にとって、必須の因子であることが報告されている³²。 α_{1B} アドレナリン受容体は破骨細胞において発現されないため、 α_{1B} アドレナリン受容体を介した交感神経シグナリングは、

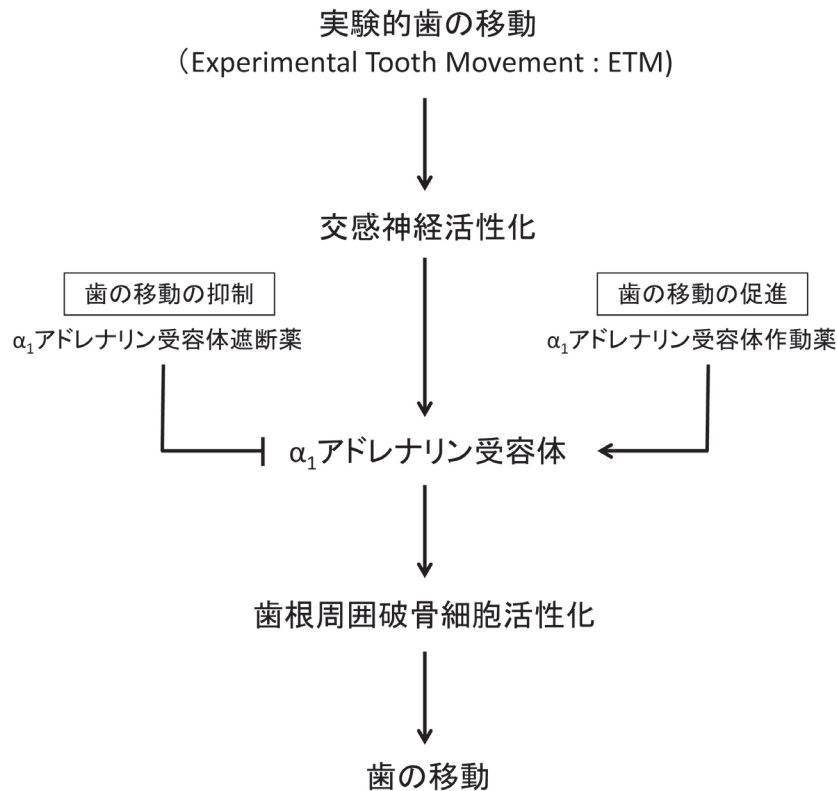


図8 本研究結果から得られた実験的歯の移動 (experimental tooth movement : ETM) と α_1 アドレナリン受容体の関与
本研究より ETM による歯の移動時の骨吸収において、 β_2 アドレナリン受容体と α_1 アドレナリン受容体の作用は同様であることが示唆された。

骨細胞、骨芽細胞、および歯根膜に存在する RANKL 産生細胞による破骨細胞分化を促進する可能性が考えられる。実際に、 α_1 アドレナリン受容体刺激は MC3T3-E1 骨芽細胞における RANKL 発現を誘導することが報告されている³³⁾。

Tanaka ら¹⁷⁾の報告では通常の骨リモデリング時には、 α_{1B} マウスは、骨形成の減少により骨量が低下するが、骨吸収に変化は見られていない。逆に、 $\beta_2^{-/-}$ マウスは、骨形成の増加および骨吸収の減少のために、骨量の増加を示している^{11, 18)}。したがって、 α_{1B} アドレナリン受容体および β_2 アドレナリン受容体シグナル伝達は、通常の骨リモデリングに対して反対の効果を有し、 α_{1B} アドレナリン受容体シグナルは骨量の増加を、 β_2 アドレナリン受容体シグナルは骨量の低下を引き起こす。一方、ETM により活性化された骨リモデリング時には、 α_{1B} アドレナリン受容体および β_2 アドレナリン受容体シグナル伝達は、どちらも骨吸収を促進させるという同じ作用を示した。すなわち、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスや α_1 アドレナリン受容体遮断薬は、ETM 誘導性の破骨細胞

パラメーターを抑制し、 α_1 アドレナリン受容体作動薬は ETM 誘導性の破骨細胞パラメーターを増加した。これらの結果は、交感神経活動が ETM によって刺激されている時、 α_{1B} アドレナリン受容体シグナル伝達は β_2 受容体シグナル伝達と同様に、骨吸収を促進させるということを示唆している。

また、今回の研究において、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬は ETM 中に骨芽細胞パラメーターを減少させたが、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスでは、骨芽細胞パラメーターを減少させる傾向があったものの有意差は認められなかった。この点に関してはさらなる研究が必要である。Kondo ら²⁾は β_2 アドレナリン受容体シグナル伝達経路は ETM 中に骨芽細胞パラメーターに影響を与えないことを報告しており、これらの知見は、 α_1 アドレナリン受容体および β_2 アドレナリン受容体シグナル伝達が、ETM 中の骨形成に対して異なる効果を有する可能性を示唆している。

骨量に関しては、ETM 開始前は $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスと WT マウスで骨量に有意差は認められなかったが、ETM5日

目では $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスの方が骨量は多かった。これは、 α_{1B} アドレナリン受容体シグナル伝達が骨量減少に関与することを示唆している。さらに、薬物投与の実験においては生食投与群との間に有意差はなかったが、PRA と PHE を比べた時に PHE の方が有意に骨量が低下した。この結果からも α_1 アドレナリン受容体シグナル伝達が骨量に関与することが考えられる。

本研究から α_1 アドレナリン受容体作動薬は歯の移動を促進する可能性が示された。今回は薬物を全身投与したため、血圧上昇などの全身性の副作用などの問題から実用化に向けての諸問題は多いが、今後局所に限局して作用できる製剤が開発されれば、治療期間を短縮させる画期的な治療法となる可能性がある。また、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬はスクリューに代わり、外科的な侵襲を伴わずして歯の移動を抑制する可能が示された。今回の研究が発展することにより、今後、歯の移動を制御する薬剤の開発につながり、矯正歯科治療が大いに発展することが期待される。

V. 結 論

本研究は矯正力による歯の移動に α_{1B} アドレナリン受容体が関与するか否かを検討するため、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスおよび WT マウスに ETM を 5 日間行った。さらに、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬、作動薬により矯正力による歯の移動を制御できるか検討を行うため、WT マウスに α_1 アドレナリン受容体遮断薬や α_1 アドレナリン受容体作動薬を投与した状態で ETM を 5 日間行った。歯の移動量、破骨細胞パラメーター、骨形成パラメーター、歯槽骨骨量について調べ、以下のような結果を得た。

1. α_{1B} アドレナリン受容体欠損は歯の移動を抑制し、ETM 誘発性の破骨細胞を減少させた。
2. α_1 アドレナリン受容体遮断薬は歯の移動を抑制し、 α_1 アドレナリン受容体作動薬は歯の移動を促進した。また、 α_1 アドレナリン受容体遮断薬は ETM 誘発性の破骨細胞を減少し、 α_1 アドレナリン受容体作動薬は ETM 誘発性の破骨細胞を増加させた。

これらの結果より、 α_{1B} アドレナリン受容体シグナル伝達は歯科矯正力による歯の移動に関与することが示された。また、ETM により交感神経活動が亢進している場合、 α_1 アドレナリン受容体シグナル伝達は、 β_2 アドレナリン受容体シグナル伝達と同様に歯の移動を促進することが明らかとなった。 α_1 アドレナリン受容体をターゲッ

トとした薬物が歯科矯正力による歯の移動を制御する治療薬となり得る可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました歯科矯正学講座、恩師後藤滋巳教授ならびに宮澤健特殊診療科教授に深く感謝の意を示すと共に、日頃から格別な御指導と御校閲を賜りました本学薬理学講座、恩師戸苅彰史教授に深謝いたします。また、本研究に際し御指導、御協力を頂きました本学薬理学講座、近藤久貴講師に謹んで感謝の意を表します。加えて、本研究にあたり御協力頂きました、本学薬理学講座の皆様、ならびに歯科矯正学講座の皆様にご挨拶を申し上げます。

文 献

- 1) 溝口 到：歯科矯正治療に伴う生体反応。相馬邦道，飯田順一郎，山本照子，葛西一貴，後藤滋巳編，歯科矯正学第 5 版。医歯薬出版（東京），107-118，2009。
- 2) Kondo M, Kondo H, Miyazawa K, Goto S, Togari A. Experimental tooth movement-induced osteoclast activation is regulated by sympathetic signaling. *Bone*, **52**: 39-47, 2013.
- 3) Sato T, Miyazawa K, Suzuki Y, Mizutani Y, Uchibori S, Asaoka R, Arai M, Togari A, Goto S: Selective beta2-adrenergic Antagonist Butoxamine Reduces Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res*, **93**: 807-812, 2014.
- 4) Kato J, Wakisaka S, Kurisu K. Immunohistochemical changes in the distribution of nerve fibers in the periodontal ligament during an experimental tooth movement of the rat molar. *Acta Anatomica*, **157**: 53-62, 1996.
- 5) Norevall LI, Forsgren S, Matsson L. Expression of neuropeptides (CGRP, substance P) during and after orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod*, **17**: 311-325, 1995.
- 6) Saito I, Ishii K, Hanada K, Sato O, Maeda T. Responses of calcitonin gene-related peptide-immunopositive nerve fibres in the periodontal ligament of rat molars to experimental tooth movement. *Arch Oral Biol*, **36**: 689-692, 1991.
- 7) Vandevska-Radunovic V, Kvinnsland S, Kvinnsland IH. Effect of experimental tooth

- movement on nerve fibres immunoreactive to calcitonin gene-related peptide, protein gene product 9.5, and blood vessel density and distribution in rats. *Eur J Orthod*, **19**: 517-529, 1997.
- 8) Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, **111**: 305-317
 - 9) Bray GA, York DA. The MONA LISA hypothesis in the time of leptin. *Recent Prog Horm Res*, **53**: 95-117, 1998.
 - 10) Sato T, Arai M, Goto S, Togari A. Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **334**: 99-105, 2010.
 - 11) Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G: Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, **434**: 514-520, 2005.
 - 12) Kondo H, Nifuji A, Takeda S, Ezura Y, Rittling SR, Denhardt DT, Nakashima K, Karsenty G, Noda M: Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *J Biol Chem*, **280**: 30192-30200, 2005.
 - 13) Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M, Togari A. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochem Pharmacol*, **61**: 579-586, 2001.
 - 14) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, **397**: 315-323, 1999.
 - 15) Cao H, Kou X, Yang R, Liu D, Wang X, Song Y, Feng L, He D, Gan Y, Zhou Y: Force-induced *Adrb2* in periodontal ligament cells promotes tooth movement. *J Dent Res*, **93**: 1163-1169, 2014.
 - 16) Pierroz DD, Bonnet N, Bianchi EN, Bouxsein ML, Baldock PA, Rizzoli R, Ferrari SL: Deletion of beta-adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation. *J Bone Miner*, **27**: 1252-1262, 2012.
 - 17) Tanaka K, Hirai T, Kodama D, Kondo H, Hamamura K, Togari A. $\alpha 1B$ -Adrenoceptor signalling regulates bone formation through the up-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein delta expression in osteoblasts. *Br J Pharmacol*, **173**: 1058-1069, 2016.
 - 18) Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, **111**: 305-317, 2002.
 - 19) Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U: International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, **46**: 121-136, 1994.
 - 20) Foglar R, Shibata K, Horie K, Hirasawa A, Tsujimoto G. Use of recombinant alpha 1-adrenoceptors to characterize subtype selectivity of drugs for the treatment of prostatic hypertrophy. *Eur J Pharmacol*, **288**: 201-207, 1995.
 - 21) Guarino RD, Perez DM, Piascik MT. Recent advances in the molecular pharmacology of the alpha 1-adrenergic receptors. *Cell Signal*, **8**: 323-333, 1996.
 - 22) Han C, Abel PW, Minneman KP. Alpha 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature*, **329**: 333-335, 1987.
 - 23) McGrath JC. Evidence for more than one type of post-junctional alpha-adrenoceptor. *Biochem Pharmacol*, **31**: 467-484, 1982.
 - 24) Suga S, Goto S, Togari A. Demonstration of direct neurite-osteoclastic cell communication in vitro via the adrenergic receptor. *J Pharmacol Sci*, **112**: 184-191, 2010.
 - 25) Kondo H, Takeuchi S, Togari A. β -Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via

- reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **304**: E507-515, 2013.
- 26) Obata K, Furuno T, Nakanishi M, Togari A. Direct neurite-osteoblastic cell communication, as demonstrated by use of an in vitro co-culture system. *FEBS letters*, **581**: 5917-5922, 2007.
- 27) Kodama D, Togari A. Modulation of potassium channels via the alpha (1B) -adrenergic receptor in human osteoblasts. *Neurosci Lett*, **485**: 102-106, 2010.
- 28) Suzuki A, Palmer G, Bonjour JP, Caverzasio J. Catecholamines stimulate the proliferation and alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Bone*, **23**: 197-203, 1998.
- 29) Huang HH, Brennan TC, Muir MM, Mason RS. Functional alpha1- and beta2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *J Cell Physiol*, **220**: 267-275, 2009.
- 30) Waldo CM, Rothblatt JM. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. *Journal of Dental Research*, **33**: 481-486, 1954.
- 31) Yamashiro T, Fujiyama K, Fujiyoshi Y, Inaguma N, Takano-Yamamoto T. Inferior alveolar nerve transection inhibits increase in osteoclast appearance during experimental tooth movement. *Bone*, **26**: 663-669, 2000.
- 32) Shoji-Matsunaga A, Ono T, Hayashi M, Takayanagi H, Moriyama K, Nakashima T. Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via RANKL expression. *Sci Rep*, **7**: 8753, 2017.
- 33) Nishiura T, Abe K. Alpha1-adrenergic receptor stimulation induces the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand gene via protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase pathways in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Arch Oral Biol*, **52**: 778-785, 2007.