

原 著

矯正力によって加えられたメカニカルストレスに対する  
ラット歯槽骨骨細胞の sclerostin 産生能の変化

藤 原 敦<sup>1)</sup> 青 木 啓 太<sup>1)</sup> 渡 邊 竜 太<sup>2)</sup> 佐 藤 和 彦<sup>2)</sup>  
矢 野 航<sup>2)</sup> 江 尻 貞 一<sup>2)</sup> 北 井 則 行<sup>1)</sup>

Changes in Sclerostin Production by Rat Alveolar Bone Osteocytes,  
Caused by Mechanical Stress from Orthodontic Force

FUJIWARA ATSUSHI<sup>1)</sup>, AOKI KEITA<sup>1)</sup>, WATANABE RYUUTA<sup>2)</sup>, SATO KAZUHIKO<sup>3)</sup>,  
YANO WATARU<sup>2)</sup>, EJIRI SADAKAZU<sup>2)</sup>, KITAI NORIYUKI<sup>1)</sup>

メカニカルストレスに対する骨細胞の応答機構を明らかにする目的で、ラット臼歯に矯正力を加えメカニカルストレスの方向を反転させることで、新たに生じる骨改造現象における骨細胞の sclerostin 産生能の変化を経時的に検索した。ラット上顎第一臼歯、第二臼歯間にゴムを挿入し、挿入直後、3時間、6時間、12時間、18時間、24時間後および1日、3日、5日、7日後に固定した。固定後、上顎骨を摘出し $\mu$ CT装置にて撮影した。脱灰パラフィン切片を作製しTRAP染色、SOSTmRNA *in situ* Hybridizationおよび sclerostin 免疫染色を行った。上顎第一臼歯近心口蓋根 (MP) と遠心口蓋根 (DP) 間の根間中隔歯槽骨を近心部、中央部、遠心部、頬側部、口蓋側部に分けて観察した。ゴム挿入後、1日で根間中隔遠心面とDP間の間隙が消失した。3日目に根間中隔遠心面にTRAP陽性破骨細胞が発現し、5日目以降に根間中隔遠心面とDP間に再び間隙が形成された。また、挿入後6時間で根間中隔中央部と遠心部の骨細胞におけるSOSTmRNA発現が消失したが、抗 sclerostin 抗体陽性反応は認められた。同部位の抗体陽性反応が消失したのは12時間後であった。根間中隔頬側部と口蓋側部の骨細胞では、12時間後でSOSTmRNA発現が消失し、抗体陽性反応は18時間後に消失した。5日目には抗体陽性反応が頬側部で再び認められた。

したがって、矯正力が加わると、骨細胞が6時間から12時間で sclerostin 産生を停止し、その6時間後に sclerostin が骨基質中から消失することが示された。また、DPによって直接圧迫される根間中隔中央部・遠心部に比べ、頬側部では矯正力によるメカニカルストレスが弱くなる可能性が考えられ、骨細胞が sclerostin 産生を停止・再開するまでの時間が、メカニカルストレスの強度に影響を受ける可能性も示唆された。

キーワード：SOSTmRNA、メカニカルストレス、骨細胞、スクレロstin、ラット歯槽骨、矯正力

*This study clarified the mechanism involved in alveolar bone osteocyte response to mechanical stress. We applied orthodontic force to rat molars and investigated the bone remodeling induced in response to the resulting stress, particularly with respect to changes over time in the rats' alveolar osteocytes' sclerostin production. Orthodontic elastics were inserted between the first and second molars of the rat maxillae, with the rats then sacrificed and their maxillae excised either immediately afterwards; at 3h, 6h, 12h, 18h, and 24h afterwards; or at 3, 5 or 7 days afterwards. After fixation, the maxillae were scanned with microCT; decalcified paraffin sections were made from them; and TRAP staining, SOSTmRNA *in situ* Hybridization, and sclerostin immunostaining performed. The alveolar bone interradicular septum (IRS), between the first-molar medial palatal root (MP) and distal palatal root (DP), was separated into medial, central, distal,*

<sup>1)</sup> 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座歯科矯正学分野

<sup>2)</sup> 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔解剖学分野  
〒501-0296 瑞穂市穂積1851

<sup>3)</sup> Department of Orthodontics, Division of Oral Structure, Function and Development

<sup>2)</sup> Department of Oral Anatomy, Division of Oral Structure, Function and Development, Asahi University School of Dentistry.

1851 Hozumi, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan.

(平成29年3月30日受理)

*buccal and palatal regions for analysis.*

*Results showed that 24 hours after insertion of the elastics, the previously-existing gap between the IRS distal surface and the DP had disappeared. At 3 days, TRAP revealed osteoclast expression on the IRS distal surface, and at 5 days and thereafter, a gap once again began to form between the IRS distal surface and the DP. Furthermore, only 6 hours after elastic insertion, in the central and distal regions, osteocyte SOSTmRNA expression had disappeared; conversely, these regions showed positive for anti-sclerostin antibodies, with these positive results having disappeared at 12 hours. In the buccal and palatal regions, on the other hand, it took 12 hours for the osteocyte SOSTmRNA expression to disappear, and positive results for anti-sclerostin antibodies had disappeared only after 18 hours. Finally, after 5 days, positive reactions for anti-sclerostin antibodies were again seen in the buccal region. In light of the above findings, it would seem that when orthodontic force is applied, directly-stressed osteocytes stop producing sclerostin from 6 hours to 12 hours. After cessation of sclerostin production by osteocytes, it takes 6 hours to disappear whole sclerostin in the bone. Also, compared with the central and distal regions of the IRS (regions which received direct pressure from the DP), the buccal region received less mechanical stress from the orthodontic force, and differences in sclerostin production between them seemed to indicate that the arresting of sclerostin production, as well as the delay required before it starts to be produced again, are both directly related to the strength of the mechanical stress the osteocytes receive.*

Key words: SOSTmRNA, mechanical stress, osteocyte, sclerostin, rat alveoli, orthodontic force

## 緒 言

骨はメカニカルストレスの変化に対して構造を常に変化させ、動的に適応していることが古くから知られている。骨がどのようにメカニカルストレスの変化を感知し反応しているかについては、これまでも研究されてきた<sup>1)</sup>。

ジフテリア毒素を用いて骨細胞を選択的に死滅させた骨組織ではメカニカルストレスによる骨改造現象が起こらなくなる。この結果からメカニカルストレスに対して骨基質中の骨細胞がセンサーとして機能し、骨表面に存在する骨芽細胞や破骨細胞に作用を及ぼすと考えられている<sup>2)</sup>。

メカニカルストレスを感知した骨細胞は骨芽細胞のWingless Type Protein (Wnt) / $\beta$ カテニンシグナル経路を介して骨形成を制御する<sup>3-5)</sup>。骨芽細胞のWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路はメカニカルストレスによって活性化することが示されており<sup>6,7)</sup>、Wntに対する共役受容体のLRP5を欠損させたマウスを用いた研究から、骨組織においてLRP5がメカニカルストレスを伝達するための経路の一部であることが示唆された<sup>8)</sup>。また、LRP5/6に高い親和性を有しWntに対する拮抗物質であるsclerostinを骨細胞は特異的に産生することが知られている<sup>3,5)</sup>。

sclerostinは、頭蓋骨などに病的な骨化を生じるsclerosteosis(硬化性骨症)の原因遺伝子として発見されたSOST遺伝子にコードされる分泌型糖タンパク質である<sup>9,10)</sup>。この分泌型糖タンパク質は骨芽細胞表面のLRP5/6に結合することでWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル経路を阻害し、骨形成に対して抑制的に作用する事が示されている<sup>8,11-15)</sup>。

マウスの尺骨に長軸方向のメカニカルストレスを加えた研究によって、メカニカルストレスが加わった尺骨骨膜側には骨形成が生じるが、その領域では骨細胞のsclerostinが消失していることが示された<sup>16)</sup>。すなわち、メカニカルストレスを感知した骨細胞は、sclerostin産生を停止し、その結果、骨芽細胞のWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル経路が活性化され骨形成を引き起こすと考えられている。

しかしながら、メカニカルストレスの変化に応じて新たに生じる骨改造現象における骨細胞のsclerostin産生の動態に関する生体内での詳細な研究はほとんど報告されていない。そこで、骨改造現象の過程を経時的に観察でき、かつ歯科矯正学的処置によりメカニカルストレスの方向を変えることが可能なラットの上顎臼歯部を実験材料として用いることとした<sup>17-21)</sup>。

本研究ではメカニカルストレスに対する骨細胞の応答機構を明らかにする目的で、ラット臼歯に矯正力を加えメカニカルストレスの方向を反転させることによって、新たに生じる骨改造現象における骨細胞のsclerostin産生能の変化を経時的に検索した。

## 材料と方法

### 1 実験動物

実験には4週齢の雄のWistar/STラット50匹(中部科学資材, 愛知)と8週齢の雄性Wistarラット70匹(中部科学資材, 愛知)を用いた。ラットは朝日大学歯学部実験動物飼育施設において飼育した。室温( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ )と湿度( $55 \pm 2\%$ )は一定に保ち、明暗周期は6時より18時まで点灯、18時より6時まで消灯

とした。ラットは固形飼料（オリエンタル酵母工業，MF，東京）と水道水を自由に摂取できる状態にした。なお，実験は朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認（承認番号：11-027）を得て行った。

## 2 実験的歯牙移動方法

ラットの腹腔内にペントバルビタール（ソムノペンチル<sup>®</sup>，共立製薬株式会社，東京）40.0mg/kg を投与した後，上顎左側第一臼歯，第二臼歯間に矯正用エラスティック（ズーパックエラスティック，Ormco Corporation, California, USA）を挿入し，第一臼歯の近心移動を行った<sup>20)</sup>。処置後，ラットは固形飼料と水道水を自由に摂取できる状態にした。

## 3 実験系

### (A) 7日間実験系

4週齢の雄性 Wistar/ST ラットを4群10匹ずつに分けエラスチック挿入後1日，3日，5日および7日目に，ペントバルビタール（ソムノペンチル<sup>®</sup>，共立製薬株式会社，東京）40.0mg/kg を腹腔内へ投与し，心臓より37℃の生理食塩水を50ml，続いて4℃の4%パラホルムアルデヒド固定液を灌流し固定した。なお，エラスチックを挿入していない動物10匹を対照群とし固定した。

### (B) 24時間実験系

8週齢の雄性 Wistar ラットを6群10匹ずつに分けエラスチック挿入直後，挿入後3時間，挿入後6時間，挿入後12時間，挿入後18時間，および挿入後24時間でペントバルビタール（ソムノペンチル<sup>®</sup>，共立製薬株式会社，東京）40.0mg/kg を腹腔投与し，4℃の4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流固定を行った。この実験系でも，エラスチックを挿入していない動物10匹を対照群とし固定した。

両実験系とも，灌流固定後に上顎骨を摘出し，24時間4%パラホルムアルデヒド（4℃）にて浸漬した後，0.1M PBS 中で保管した。次いで試料を $\mu$ CT装置（コムスキャンテクノ株式会社，横浜）にて撮影した。なお，撮影条件は管電圧を90kV，管電流を89 $\mu$ A，倍率を13倍とした。その後，EDTAもしくはモースの脱灰液を用いて脱灰を行った。脱灰後の試料をパラフィン包埋し滑走式ミクロトーム（リトラトーム<sup>®</sup>，REM-700，大和光機工業株式会社，埼玉）を用いて，咬合平面と平行な水平断で厚さ6 $\mu$ mの連続切片を作製した。

7日間実験系では，Hematoxylin Eosin 染色（HE染色），酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色（TRAP染色），および sclerostin に対する免疫組織化学染色を施した。

24時間実験系では，SOST に対する *in situ* Hybridization と sclerostin に対する免疫組織化学染色を施した。

## 4 組織化学的検索

### (1) TRAP 染色

キシレンによる脱パラフィンを行った後，エタノール系列にて水和し，流水洗浄した。その後，TRACP & ACP double stain kit (MK300, TAKARA,) を用いて30分間，37℃にてアゾ色素法による酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色を行った。切片は発色後，Mayer の Hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) にて対比染色を行った。

### (2) *in situ* Hybridization

胎生16.5日のラットから抽出した total RNA より逆転写にてcDNAを得て，これを鋳型に antisense RNA を作製した (rat SOST accession Number : NM\_030584.1 Sequence Position:9-405)。その後，ジゴキシゲニン（DIG）標識をDIGラベリングキット（Roche, Mannheim, Germany）にて行ったものをRNAプローブとして使用した（ジェノスタッフ，東京）。*in situ* Hybridization (ISH) はWilkinson and Nietoの方法<sup>22)</sup>にて行った。また，ネガティブコントロールにはセンスプローブを加えたものを使用した。

### (3) 免疫組織化学染色

脱パラフィン処理した切片を，0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による内因性ペルオキシダーゼ除去とウシ血清によるブロッキング処理し，400倍希釈したヤギ抗ラット sclerostin 抗体 (AF1589, R&D System, Minneapolis, USA) を4℃で一晩反応させた。その後，biotin 標識抗ヤギ IgG 抗体 (cell & tissue staining kit, R&D System, Minneapolis, USA) に30分間浸漬し，diamino benzidine staining kit (cell & tissue staining kit, R&D System, Minneapolis, USA) により発色を行った。対比染色には Mayer の Hematoxylin を用いた。ネガティブコントロールには正常ヤギ IgG または，PBS にて一次抗体反応を行ったものを使用した。

## 5 観察部位

観察部位は $\mu$ CT 画像から決定した（図1）。上顎第一臼歯（M1）の近心口蓋根（MP）と遠心口蓋根（DP）の間の根間中隔歯槽頂部直下の歯槽骨を咬合面に平行な水平断面で観察した。



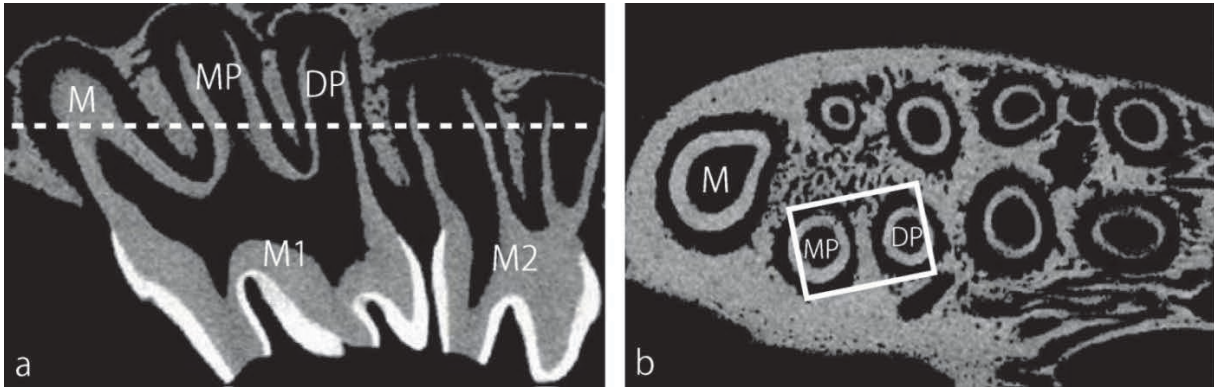


図1 上顎第一臼歯のμCT画像

a: 近心根 (M), 近心口蓋根 (MP), 遠心口蓋根 (DP) を通る矢状断面像. 点線は咬合平面と平行で MP と DP 間の根管中隔頂部の直下を通る線.

b: aにおける点線の高さのμCT水平断面像. 白枠で示す領域を光学顕微鏡観察部位とした.

M1: 第一臼歯 M2: 第二臼歯

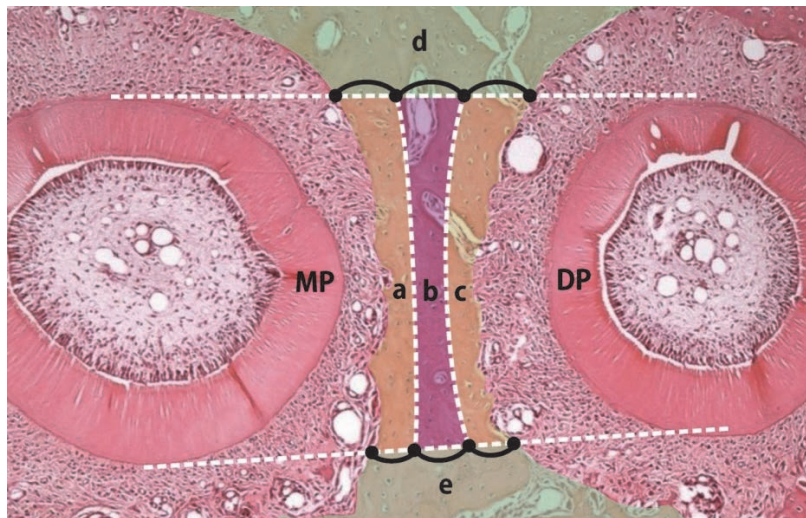


図2 観察部位の区分

MP と DP の頬側表面および口蓋側表面を結び、MP-DP 間根間中隔を横切る線分をそれぞれ3等分し、近心の点同士を結ぶ円弧と遠心の点同士を結ぶ円弧にて、上顎第一臼歯の根間中隔を近心部 (a), 中央部 (b), 遠心部 (c), 頬側部 (d), および口蓋側部 (e) に分けた.

MP 表面と DP 表面に接する線を頬側と口蓋側に設定した. それぞれの接線の根間中隔上にある線分に三等分点を設定した. 頬舌側それぞれの三等分点のうち、近心の二点を通る円弧と遠心の二点を通る円弧で観察部位を三分割した. 近心側に位置する円弧より近心の領域を近心部、遠心に位置する円弧より遠心の領域を遠心部、近心部と遠心部に挟まれる領域を中央部と定義した. 観察部位で根間中隔の接線より頬側に位置する領域を頬側部、口蓋側に位置する領域を口蓋側部と定義した. 組織像は光学顕微鏡 (BX51, OLYMPAS, 東京) を用いて観察し、μCT 像は三次元立体構築ソフトウェア (TriBON, ラトックシステムエンジニア

リング, 東京) を用いて立体構築像を作製し観察した (図2).

## 結果

### 1. μCT 所見

対照群では第一臼歯の生理的遠心移動によって MP が根間中隔近心面に近接していた (図3a1).

実験群では、挿入後1日目で DP が根間中隔遠心面に密接していた. また、挿入後3日目、5日目でも同様の所見が認められた (図3b1, c1, d1). 挿入後7日目では DP と根間中隔遠心面に空隙が認められた (図3e1).

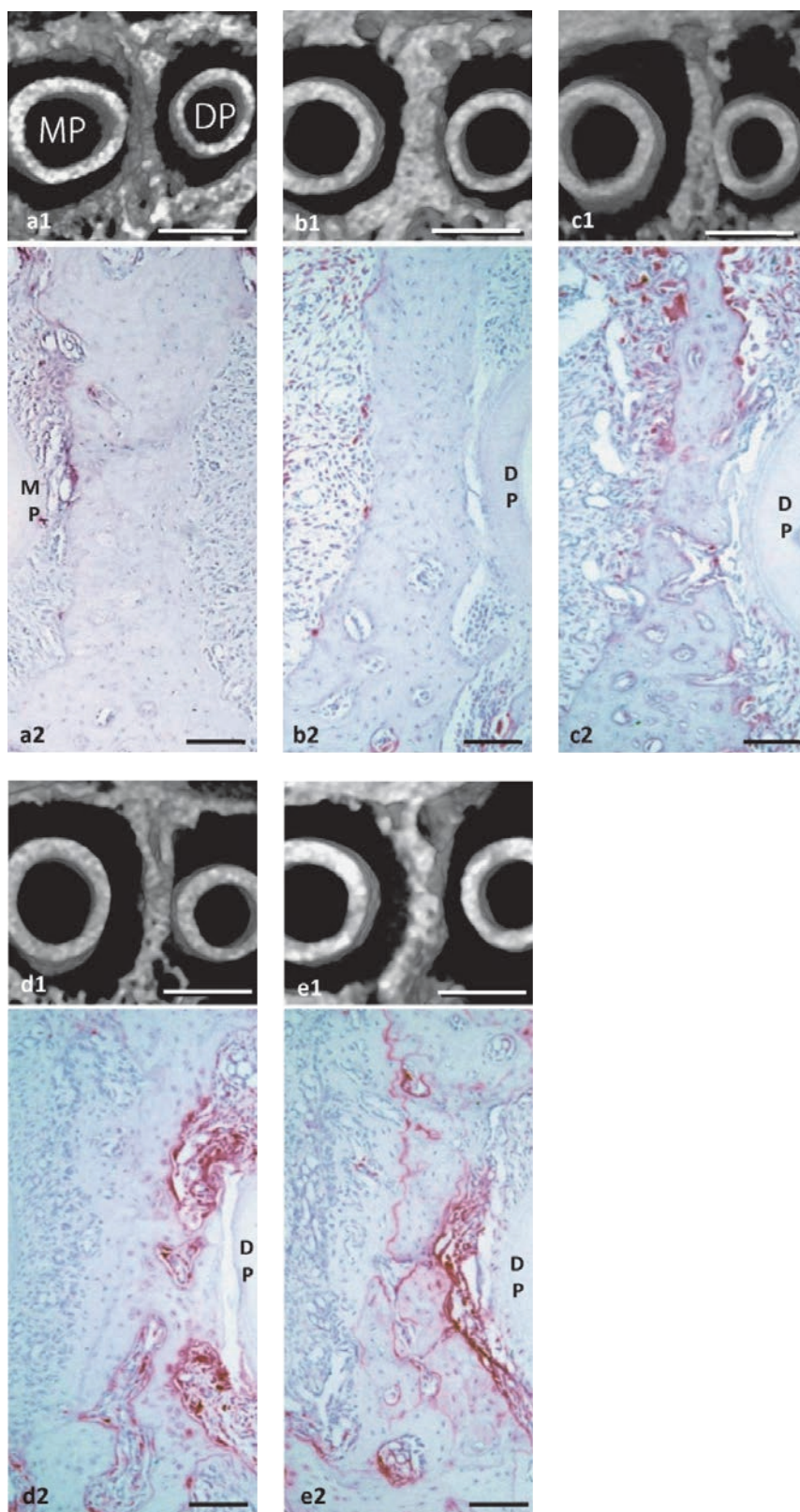


図3 μCT 立体構築像と TRAP 染色像

a : 対照群 b : エラスチック挿入後1日 c : 挿入後3日 d : 挿入後5日 e : 挿入後7日

a1 ~ e1 : μCT 立体構築像 (bar=500μm)

a2 ~ e2 : TRAP 染色像 (bar=100μm)



## 2. TRAP 染色像

対照群では、根管中隔近心面に TRAP 陽性破骨細胞が認められた (図 3 a 2)。

挿入後 1 日目では、対照側と同様に根管中隔近心面にのみ TRAP 陽性破骨細胞が認められた (図 3 b 2)。挿入後 3 日目では根管中隔近心面と遠心面の両側に TRAP 陽性破骨細胞が認められた (図 3 c 2)。また、根管中隔遠心面に認められた破骨細胞は DP と歯槽骨が接している領域には認められず、その領域を避けるようにしてその両脇に TRAP 陽性破骨細胞が出現していた (図 3 c 2)。挿入後 5 日目では、根管中隔遠心面にのみ TRAP 陽性破骨細胞が認められた (図 3 d 2)。DP と歯槽骨が接している領域には TRAP 陽性破骨細胞が認められず、穿下性骨吸収の生じている骨表面で TRAP 陽性破骨細胞が認められた (図 3 d 2)。実験 7 日目では根管中隔遠心面にのみ TRAP 陽性の破骨細胞が認められ、歯根膜腔が形成されていた (図 3 e 2)。

## 3. 対照群の *SOST*mRNA の発現分布と抗 sclerostin 免疫染色像

対照群の *SOST*mRNA の発現は、歯槽骨中央部、遠心部、頬側部および口蓋側部の骨細胞で認められた。一方、*SOST*mRNA の発現は、近心部の骨細胞と遠心部の骨表面から一層の骨細胞には認められなかった (図 4 a)。

また、抗 sclerostin 抗体陽性反応は、*SOST*mRNA の発現部位と同様に歯槽骨中央部、遠心部、頬側部および口蓋側部の骨細胞および骨細胞周囲で認められた。一方、抗体陽性反応は近心部の骨細胞と遠心部の骨表面から一層の骨細胞には認められなかった (図 4 b)。

## 4. 実験群の *SOST*mRNA の発現分布と抗 sclerostin 免疫染色像

エラスチック挿入直後、挿入後 3 時間の *SOST*mRNA の発現は、対照群と同じく歯槽骨中央部、遠心部、頬側部および口蓋側部の骨細胞で認められ、近心部の骨細胞

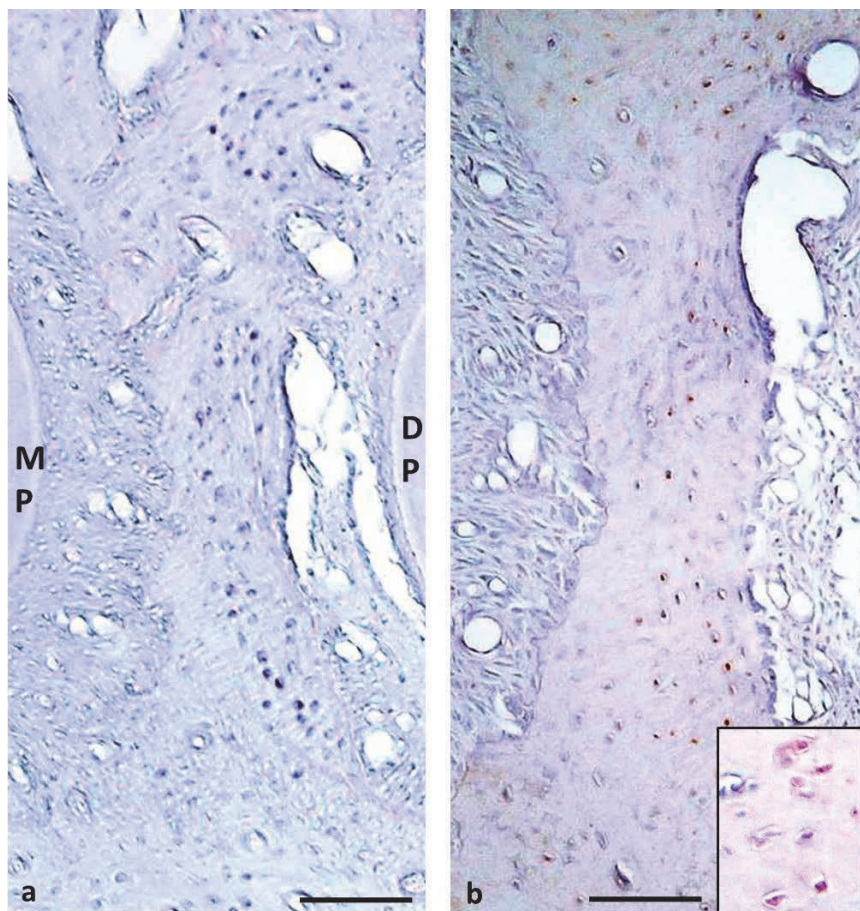


図 4 対照群の *SOST*mRNA の ISH 像 (a) と sclerostin 免疫染色像 (b)

a : *SOST*mRNA 発現を認める骨細胞は青紫色に発色している。 b : 赤茶色の抗 sclerostin 抗体陽性反応が、骨細胞および骨細胞周囲に認められる。黒枠内は、抗体陽性反応部位の拡大像 (bar=100 $\mu$ m)



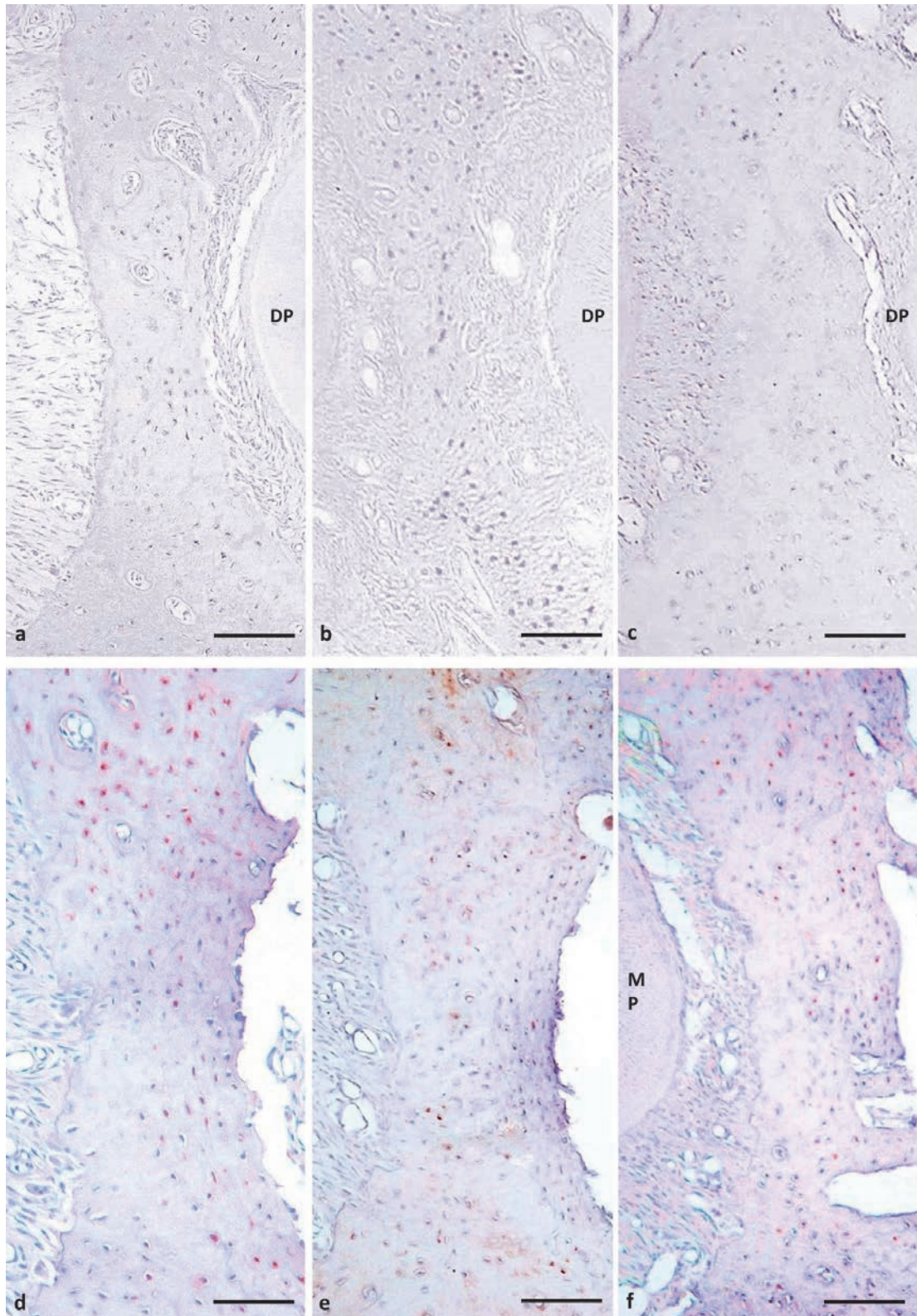


図5 24時間実験系の *SOST*mRNA の ISH 像と sclerostin 免疫染色像

a: エラスチック挿入直後の *SOST*mRNA の ISH 像. *SOST*mRNA を発現している細胞は青紫色に発色している. b: 3時間後の *SOST*mRNA の ISH 像. c: 6時間後 *SOST*mRNA の ISH 像. d: 挿入直後の sclerostin 免疫染色像. 赤茶色の抗 sclerostin 抗体陽性反応が認められる. e: 3時間後の sclerostin 免疫染色像. f: 6時間後の sclerostin 免疫染色像. (bar=100 $\mu$ m)



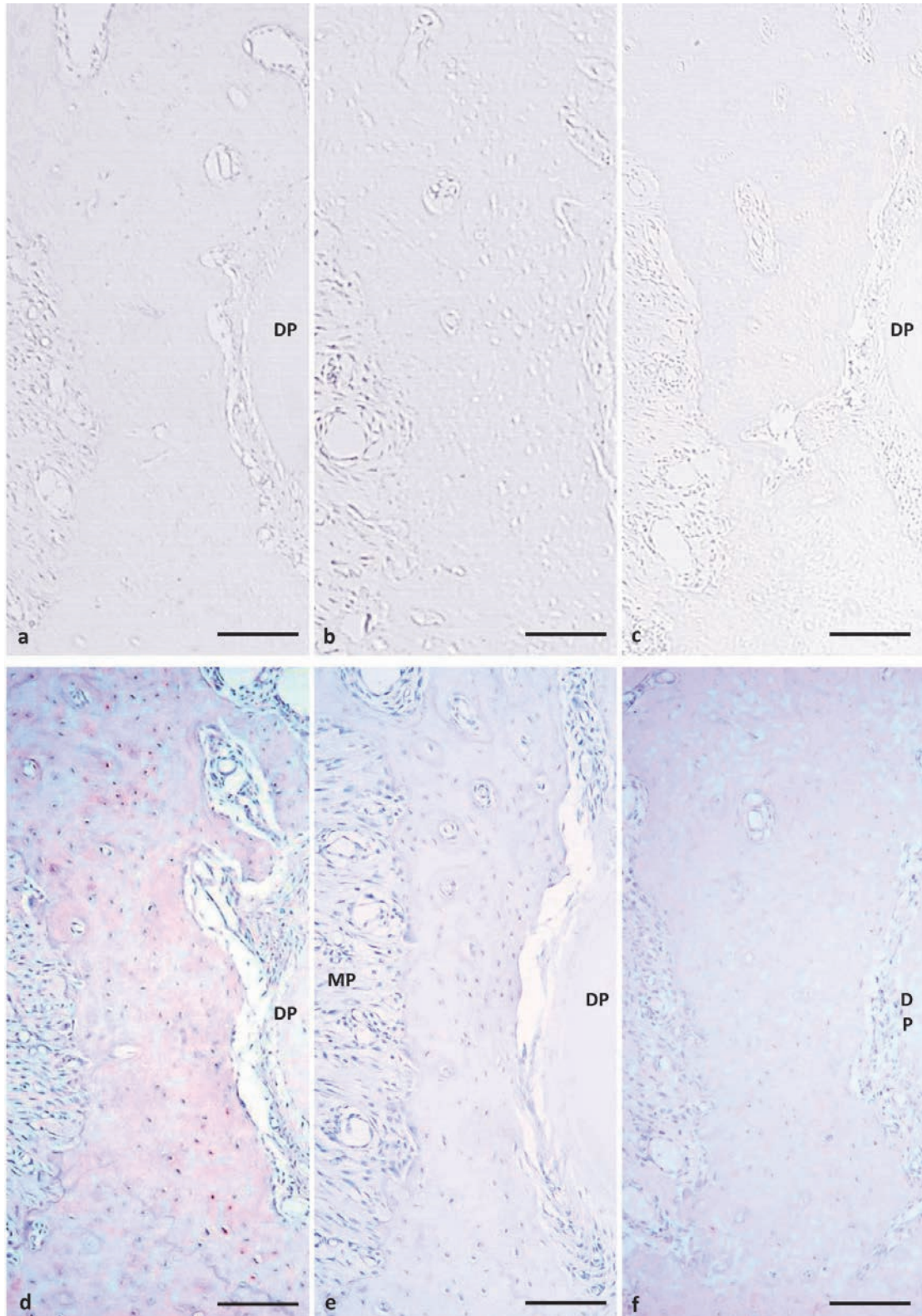


図6 24時間実験系の *SOST*mRNA の ISH 像と sclerostin 免疫染色像

a : 12時間後の *SOST*mRNA の ISH 像. *SOST*mRNA 発現は認められない. b : 18時間後の *SOST*mRNA の ISH 像. *SOST*mRNA 発現は認められない. c : 24時間後 *SOST*mRNA の ISH 像. *SOST*mRNA 発現は認められない. d : 12時間後の sclerostin 免疫染色像. 赤茶色の抗 sclerostin 抗体陽性反応が認められる. e : 18時間後の sclerostin 免疫染色像. 抗体陽性反応は認められない. f : 24時間後の sclerostin 免疫染色像. 抗体陽性反応は認められない. (bar=100 $\mu$ m)



と遠心部の骨表面から一層の骨細胞には認められなかった (図 5 a, b). エラスチック挿入直後, 挿入後 3 時間の抗 sclerostin 抗体陽性反応も同様に, 歯槽骨中央部, 遠心部, 頬側部および口蓋側部の骨細胞および骨細胞周囲で認められた. 一方, 近心部の骨細胞と遠心部の骨表面から一層の骨細胞には認められなかった (図 5 d, e).

挿入後 6 時間の *SOST*mRNA の発現は, 頬側部・口蓋側部の骨細胞には認められたが, 近心部・中央部・遠心部の骨細胞では認められなかった (図 5 c). 抗 sclerostin 抗体陽性反応は, エラスチック挿入直後, 挿入後 3 時間と同様に, 歯槽骨中央部, 遠心部, 頬側部および口蓋側部の骨細胞および骨細胞周囲で認められた. 一方, 近心部の骨細胞と遠心部の骨表面から一層の骨細胞には認められなかった (図 5 f).

挿入後 12 時間の *SOST*mRNA の発現は観察部位の全域の骨細胞で認められなかった (図 6 a). 一方で,

抗 sclerostin 抗体陽性反応は頬側部・口蓋側部の骨細胞および骨細胞周囲には認められたが, 近心部・中央部・遠心部の骨細胞では抗 sclerostin 抗体陽性反応が認められなかった (図 6 d).

挿入後 18 時間と挿入後 24 時間の *SOST*mRNA の発現は, 観察部位全域の骨細胞で認められなかった (図 6 b, c). 挿入後 18 時間と挿入後 24 時間の抗 sclerostin 抗体陽性反応は観察部位の全域で認められなかった. (図 6 e, f).

挿入後 3 日目では, 観察部位の全域で抗 sclerostin 抗体陽性反応が認められなかった (図 7 a). 挿入後 5 日目と挿入後 7 日目では, 抗 sclerostin 抗体陽性反応が頬側部の骨細胞および骨細胞周囲には認められたが, 口蓋側部・近心部・中央部・遠心部の骨細胞では抗 sclerostin 抗体陽性反応が認められなかった (図 7 b, c).

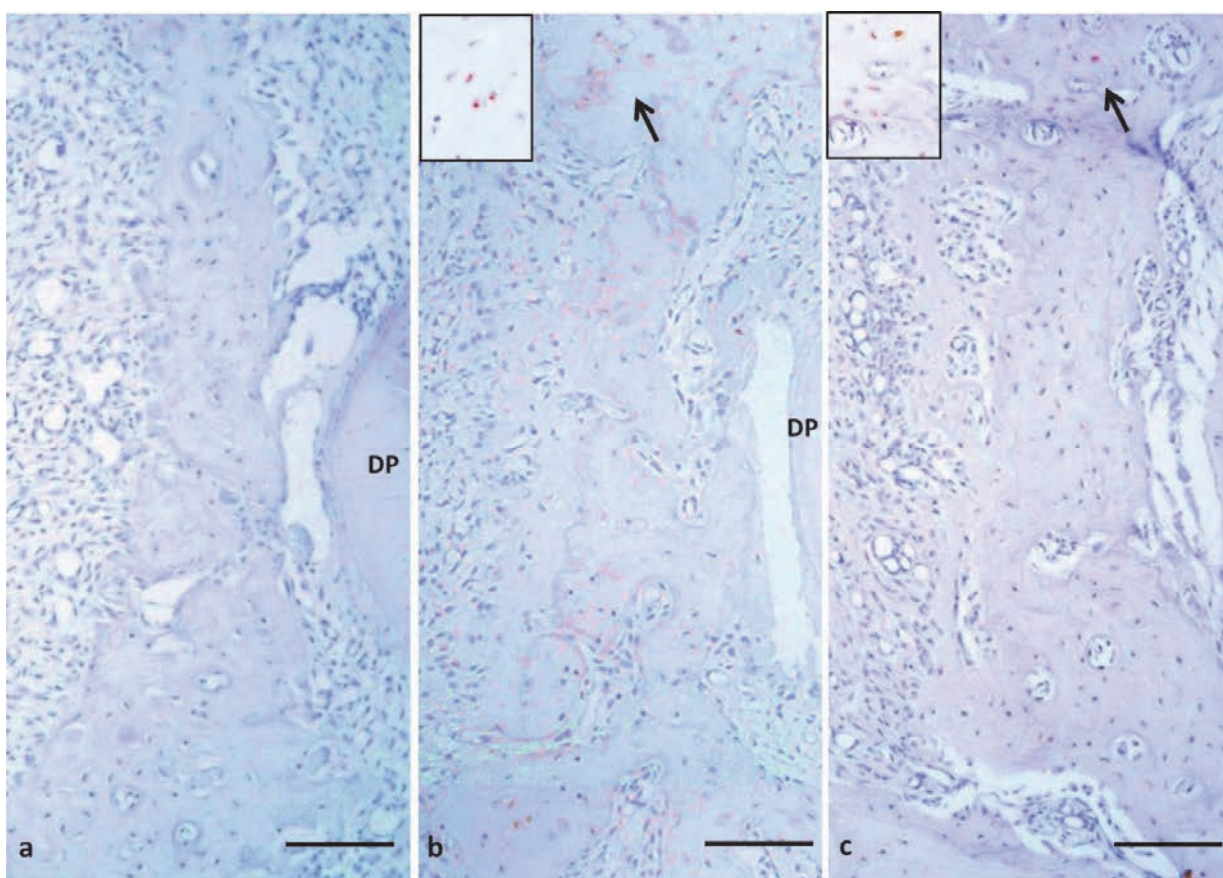


図 7 7日間実験系の sclerostin 免疫染色像

a : 3 日後の sclerostin 免疫染色像. 抗 sclerostin 抗体陽性反応は認められない. b : 5 日後の sclerostin 免疫染色像. 赤茶色の抗体陽性反応が矢印で示す部位に認められる. c : 7 日後の sclerostin 免疫染色像. 赤茶色の抗体陽性反応が矢印で示す部位に認められる.

黒枠内は, 図中の矢印の部位の拡大像 (bar=100 $\mu$ m)

## 考 察

本研究ではメカニカルストレスに対する骨細胞の応答機構を明らかにするために、ラット臼歯に矯正力を加えメカニカルストレスの方向を反転させ、新たに生じる骨改造現象における骨細胞の sclerostin 産生能の変化を経時的に検索した。

ラットの上顎臼歯は咬合力によるメカニカルストレスを受けており、歯根による圧迫側である根間中隔近心面では骨吸収が生じ、歯根膜線維の牽引力が生じる根間中隔遠心面では骨形成が生じて、ラット上顎臼歯の歯根は生理的に遠心方向に移動すると考えられている<sup>17)</sup>。本研究でも対照群の $\mu$ CT 所見から、MP が根間中隔近心面に近接し、根間中隔近心面に TRAP 陽性破骨細胞が認められることから、MP の遠心移動による骨吸収が根間中隔近心面に生じていることが示された。MP の生理的遠心移動によって圧迫される根間中隔近心部歯槽骨では SOSTmRNA の発現も sclerostin の免疫反応も認められなかった。これは歯根の圧迫によるメカニカルストレスが骨細胞の sclerostin 産生を抑制している可能性を示唆している。対照群の根間中隔中央部、遠心部、頬側部および口蓋側部の骨細胞は SOSTmRNA を発現しており sclerostin の免疫反応も陽性であることから、これらの部位の骨細胞は sclerostin を産生していることが明らかとなった。しかし、根間中隔の遠心表面から一層の骨細胞では SOSTmRNA の発現も sclerostin の免疫反応も認められなかった。これに関しては、根間中隔遠心面が、歯根の遠心移動に伴ってシャーピー線維による牽引力を受け活発な骨形成が生じる部位であるので、牽引力によるメカニカルストレスが表層の骨細胞の sclerostin 産生能を抑制している可能性と、活発な骨形成によって骨基質に埋め込まれたばかりの幼弱な骨細胞では sclerostin 産生能を発現するまで分化が進んでいない<sup>23)</sup> 可能性が考えられる。

SOSTmRNA の発現も sclerostin 分布も認められていた根間中隔中央部・遠心部において矯正力によるメカニカルストレスが加えられると、6時間後に SOSTmRNA の発現が認められなくなった。したがって、骨細胞はメカニカルストレスが加わると6時間以内に sclerostin 産生を抑制することが示された。さらに、12時間後に同部位の骨基質中の sclerostin 分布が消失した。すなわち、メカニカルストレスを感知した骨細胞が sclerostin 産生を停止から6時間後にその領域の sclerostin が消失することが明らかとなった。これは骨細胞が sclerostin 産生を停止しても、その周囲の骨基質には sclerostin が残存しており、6時間か

かって骨基質中から sclerostin が消失することを示している。骨基質に残存していた sclerostin が6時間で消失するメカニズムに関しては、骨小腔や骨細管の中を流れる組織液によって sclerostin が骨表面へと運ばれると考えられ、かなり速い速度で骨細胞周囲から骨表面の骨芽細胞へと sclerostin が運ばれている可能性が示された。しかしながら、sclerostin の消失が分解酵素によるものであるという可能性も否定できないので、sclerostin の消失現象に関しては今後の検討が必要と思われる。

一方、根間中隔頬側部・口蓋側部では、矯正力によるメカニカルストレスが加えられると、12時間後に SOSTmRNA の発現が認められなくなり、さらに18時間後には sclerostin が消失した。したがって、根間中隔頬側部・口蓋側部の骨細胞でも根間中隔中央部・遠心部と同様に、骨細胞による sclerostin 産生が抑制されると、その6時間後に sclerostin の分布が消失することが明らかになった。しかしながら、矯正力が加えられてから SOSTmRNA の発現・sclerostin 分布が消失するまでの時間に根間中隔中央部・遠心部と頬側部・口蓋側部で差があることが明らかになった。これについては、挿入後1日目の $\mu$ CT 所見で示されているように、エラスティックを挿入すると DP は根間中隔遠心面を直接圧迫するが、根間中隔頬側部・口蓋側部には DP は直接接していなかった。このことから、根間中隔遠心部では矯正力によって加えられたメカニカルストレスは強く、根間中隔頬側部・口蓋側部ではメカニカルストレスが比較的弱かった可能性が考えられる。したがってメカニカルストレスが強く加わっていた部位では、加えられたメカニカルストレスが弱い部位に比較して短時間で sclerostin が消失する可能性が示唆された。

矯正力によって歯根に加わるメカニカルストレスの方向を変化させると1日目から3日目まで根間中隔遠心面に DP が接触し、根間中隔近心面と MP の間に間隙が認められた。したがって、1日目から3日目までは DP によるメカニカルストレスが根間中隔遠心面に加わっていたと考えられる。5日目でも根間中隔遠心面と DP は接触していたが、穿下性骨吸収の生じている根間中隔遠心面の頬側の骨表面で TRAP 陽性破骨細胞が認められ DP との間に間隙が生じており、根間中隔遠心面の頬側は DP によって直接圧迫されていなかったと考えられる。DP によって根間中隔が圧迫されていた1日目・3日目では根間中隔全域から sclerostin 免疫反応は消失していたが、5日目では根間中隔頬側部で再び認められるようになった。これは歯根を介した矯正力によるメカニカルストレスが根間中隔頬側部



では減弱したため、骨細胞が sclerostin 産生を再開したと考えられる。根間中隔遠心部では矯正力によるメカニカルストレスが強く加わり、根間中隔頰側部では加えられたメカニカルストレスが比較的弱かった可能性を考慮すると、加えられたメカニカルストレスが弱い部位では、強いメカニカルストレスが加えられた部位に比較して sclerostin 産生の消失に時間がかかるのみならず、逆に sclerostin 産生の再開はメカニカルストレス減弱後、短時間で生じることが示唆された。

本研究において、矯正力によるメカニカルストレスを歯槽骨に加えると、骨細胞が6時間から12時間で sclerostin 産生を抑制し、その6時間後に sclerostin が骨基質中から消失することが示された。また、DP によって直接圧迫される根間中隔中央部・遠心部に比べ、頰側部では矯正力によるメカニカルストレスが弱くなる可能性が考えられ、骨細胞が sclerostin 産生を停止・再開するまでの時間が、メカニカルストレスの強度に影響を受ける可能性も示唆された。

#### 引用文献

- 1) Pead MJ, Skerry TM and Lanyon LE. Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of bone loading. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1988 ; 3 : 647-656.
- 2) Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S and Ikeda K. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell metabolism*. 2007 ; 5 : 464-475.
- 3) Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE and Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2005 ; 280 : 19883-19887.
- 4) Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, Li J, Maye P, Rowe DW, Duncan RL, Warman ML and Turner CH. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *The Journal of biological chemistry*. 2006 ; 281 : 23698-23711.
- 5) Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME and Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO journal*. 2003 ; 22 : 6267-6276.
- 6) Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC and Wysolmerski JJ. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005 ; 20 : 1103-1113.
- 7) Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, Hill AA, Akhter MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS and Bex FJ. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *The Journal of biological chemistry*. 2006 ; 281 : 31720-31728.
- 8) Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ and Paszty C. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2008 ; 23 : 860-869.
- 9) Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D and Van Hul W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Human molecular genetics*. 2001 ; 10 : 537-543.
- 10) Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P and Mulligan J. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *American journal of human genetics*. 2001 ; 68 : 577-589.
- 11) Krishnan V, Bryant HU and Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2006 ; 116 : 1202-1209.
- 12) Semenov M, Tamai K and He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry*. 2005 ; 280 : 26770-26775.
- 13) Semenov MV and He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *The Journal of biological*

- chemistry*. 2006 : 281 : 38276-38284.
- 14) van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P and Lowik CW. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine*. 2004 : 199 : 805-814.
  - 15) Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, Skonier JE, Yu C and Latham JA. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2005 : 280 : 2498-2502.
  - 16) Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE and Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of *SOST/sclerostin*. *The Journal of biological chemistry*. 2008 : 283 : 5866-5875.
  - 17) Sicher H and Weinmann JP. Bone growth and physiologic tooth movement. *American journal of orthodontics and oral surgery*. 1944 : 30 : C109-C132.
  - 18) Azuma M. Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*. 1970 : 17 : 149-178.
  - 19) Kabasawa M, Ejiri S, Hanada K and Ozawa H. Effect of age on physiologic and mechanically stressed rat alveolar bone: a cytologic and histochemical study. *The International journal of adult orthodontics and orthognathic surgery*. 1996 : 11 : 313-327.
  - 20) Waldo CM and Rothblatt JM. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. *Journal of dental research*. 1954 : 33 : 481-486.
  - 21) Macapanpan LG, Weinmann JP and Brodie AG. Early tissue changes following tooth movement in rats. *The Angle Orthodontist*. 1954 : 24 : 79-95.
  - 22) Wilkinson DG and Nieto MA. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods in enzymology*. 1993 : 225 : 361-373.
  - 23) Irie K, Ejiri S, Sakakura Y, Shibui T and Yajima T. Matrix mineralization as a trigger for osteocyte maturation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2008 : 56 : 561-567.
-