HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞を用いた最適矯正力に関する検討
Author(s)	羽二生, 芽里; 金, 壮律; 佐藤, 嘉明 他
Citation	北海道歯学雑誌, 34(2), 97-105
Issue Date	2014-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55161
Type	journal article
File Information	34-02_06_haniu.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　34：97-105，2014.

原　著

三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞を用いた最適矯正力に関する検討

羽二生　芽里　　金　壮律　　佐藤　嘉明　　飯田　順一郎

抄　録：矯正力による歯の移動機構で圧迫側における破骨細胞分化は，歯根膜線維芽細胞が分泌するサイトカインにより制御されると考えられており，今までの実験では，直接細胞に機械的刺激を加えた報告が多かった．そこで，本研究ではin vivoに近い歯根膜を想定し，三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞を作製して機械的圧縮を加え，産生される破骨細胞分化関連サイトカイン遺伝子発現量の変化と圧縮量の関係を明らかにすることを目的とした．

矯正治療時便宜抜去された歯からヒト歯根膜線維芽細胞を培養し，５継代目の培養細胞をφ５×３mmのコラーゲンスポンジに充填し１週間培養後，コラーゲンスポンジを1/3，1/4圧縮した．０（コントロール），１，３，６，12，24時間後にサイトカイン遺伝子発現量の変化をReal time PCRにて検索した．1/3，1/4圧縮時の細胞の充填状態は，コントロールと比べ同程度であった．破骨細胞分化関連サイトカインであるTNF-α，FGF2，IL-1β，VEGFのmRNA発現は，1/3，1/4圧縮すべての時点でコントロールより有意に増加し，OPGのmRNA発現量は，1/3圧縮24時間後の条件以外有意に減少していた．1/3圧縮24時間後のOPGのmRNA発現量は，コントロールと同程度であった．また，総じて，mRNA発現の相対量は1/3圧縮時と1/4圧縮時の間で発現傾向は類似していたが，1/4圧縮時の方が多い傾向であった．これらの結果から*in vivo*に近い実験系でヒト歯根膜線維芽細胞に機械的圧縮を加えたところ，細胞がサイトカインを産生し，骨リモデリングの一端を担っている可能性が示唆された．また，矯正治療において歯根膜幅の1/4の移動を行って歯を移動させることが効率的であると考えられる．

キーワード：三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞，メカニカルストレス，サイトカイン

緒　　言

矯正歯科治療は，最適な位置に歯を移動し顎成長と調和のとれた機能的に適した咬合を確立することを目的としている．矯正学的な歯の移動は，矯正装置を用いて歯に負荷される矯正力が歯槽骨のリモデリングを誘導することによって起こると考えられている[1,2]．また歯に矯正力を負荷すると圧迫側歯根膜では,歯根膜線維芽細胞が分泌するサイトカインにより破骨細胞分化を制御していると考えられている．

歯の移動機構解明のために，歯根膜構成細胞の一つである歯根膜線維芽細胞に力学的負荷（メカニカルストレス）を付与し，その影響について検討する様々な研究がなされてきた．それらの研究ではメカニカルストレスとして圧縮力[3,4]，遠心力[5]，伸展刺激[6,7]，また，気圧による加圧[8]や静水圧[9]などの圧力を加える方法等である．圧縮力に関する実験方法としては，ガラス製のシリンダープレート等を用いて直接細胞へ圧縮力を作用させる方法等が用いられてきた[3]．歯根膜線維芽細胞に直接圧縮力を作用させた場合，RANKLのmRNA発現量は増加するがosteoprotegerin（OPG）のmRNA発現量は変化せず，破骨細胞形成が促進されることを金井[10]，Kanzaki[11]，Yamaguchi[12]らは報告している．遠心力としては，培養フラスコに水平ローターで遠心をかけたもの[5]，伸展刺激には真空ポンプで断続的に培養プレート底部を吸引することによるもの，また，培養プレート底部を持ち上げてメカニカルストレスを負荷させるものなどが挙げられる[13]．Kimらは，マウスの歯根膜線維芽細胞に気圧を上昇させる加圧器を用いメカニカルストレスを負荷したことでRANKLの発現量が上昇したと報告している[8]．しかし，これらの方法ではメカニカルストレスを付与された歯根膜線維芽細胞の圧迫側で起こる圧平された形態変化が観察できないと考えられる．そこで，*in vitro*の実験下でより*in vivo*に近い状態，すなわち歯根膜により近い構造を再現し，歯根膜線維芽細胞にメカニカルストレスを付与する方法として，コラーゲンスポンジにヒト歯根膜線維芽細胞を播種した三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞を作製することを考えた．本研究では，作製した三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞に圧縮力を負荷

〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科　口腔機能学講座　歯科矯正学教室（主任：飯田順一郎 教授）

し，産生される破骨細胞分化関連サイトカイン遺伝子発現量の変化と圧縮力の関係を明らかにすることを目的とした．

材 料 と 方 法

1．細胞採取方法

本研究は北海道大学大学院歯学研究科 臨床・疫学研究倫理審査委員会により承認されている．北海道大学歯科診療センターに来院し，実験趣旨に同意を得た24歳女性の患者から矯正治療を目的として便宜抜去された健全な第一小臼歯より歯根膜を採取した．その後Somermanら[14]のout growth法に従いヒト歯根膜線維芽細胞を培養した．すなわち，抜去歯を滅菌PBSにて２度洗浄後，滅菌ディスポーザルメスを用いて歯根中央部から健全な歯根膜組織を剥離し，35 mmカルチャーディッシュ（CELLSTAR®, greiner bio-one, Frickenhausen, Germany）内に入れて初代培養を行った．培養は，10%ウシ胎児血清（FBS, GIBCO, Carlsbad, CA），１％ ペニシリン-ストレプトマイシン（Pn-St, 50 U/mlペニシリン G，50 μg/ml ストレプトマイシン，GIBCO-BRL Life Tecnologies, Grand Island） L-アスコルビン酸２-リン酸（Sigma-Aldrich, MO），L-アラニル-L-グルタミン(Sigma-Aldrich, MO)含有minimum essential medium eagle培　地（Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany）を用いて37℃，５％ CO_2-95 %気相下にて行った．培養細胞がコンフルエントに達した時点で継代を行い，実験には５継代目の細胞を使用した．

2．三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞の作製方法

培養細胞を培養時と同様の培地を用いて直径５mm，高さは３mmの円柱状のコラーゲンスポンジ（AteloCell® Atelocollagen spoge MIGHTY, KOKEN, Tokyo）（図１－１）１個あたりに，1×10^7 個の細胞含有培地50 μlをピペットにてゆっくり滴下して細胞充填を行った．35 mmカルチャーディッシュで培養液を２日毎に交換し１週間培養を行った．なお，コラーゲンスポンジはフリーズドライしたコラーゲンゲル（Atelocollagen® gel, KOKEN, Tokyo）をホルムアルデヒドとγ線（10 kGy）によって架橋，殺菌することで作られた多孔性のコラーゲンスポンジであり，孔の大きさは30-200 μmで，孔は相互に繋がっている（図１－２）．

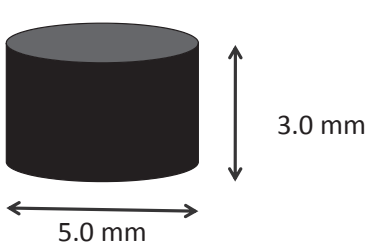


図１－１
直径５mm高さ３mmの円柱状のコラーゲンスポンジ

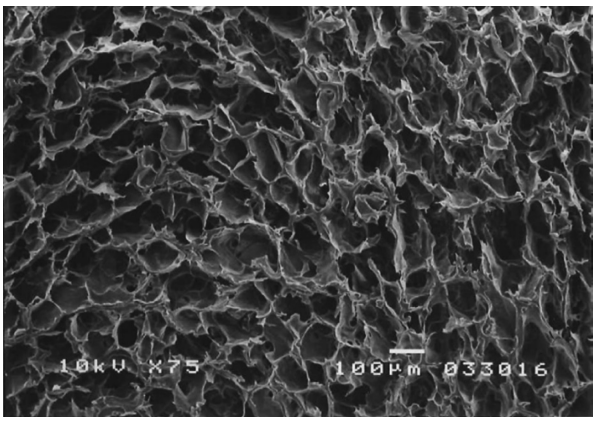


図１－２
コラーゲンスポンジの断面を走査型電子顕微鏡でみた像．黒い部分が孔．孔の大きさ：30 μm-200 μm.

3．メカニカルストレスの負荷

コラーゲンスポンジに細胞充填し１週間後にメカニカルストレスを負荷した．メカニカルストレスとして円柱状のコラーゲンスポンジを軸方向に圧縮する方法を用いた．３mmの高さを1/3，1/4圧縮するため2.00 mm，2.25 mmの耐熱ガラス（テンパックス®，関谷理化株式会社，東京）を特注（NITTO社，長野）した．100 mmシャーレー内に1/3圧縮時には２mm，1/4圧縮時には2.25 mmの耐熱ガラス２枚の間に高さ３mmのコラーゲンスポンジを置き，その上に耐熱ガラスと重り（200g）を載せて圧縮力を負荷させた．作用時間は０（圧縮前），１，３，６，12，24時間とし，持続的に作用させた（図２）．尚，０（圧縮前）をコントロールとした．

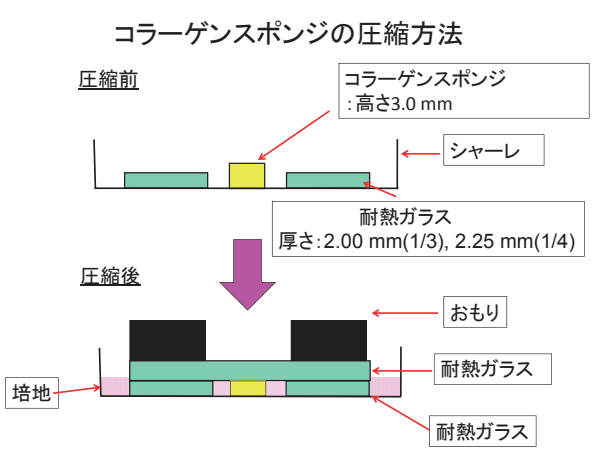


図２　コラーゲンスポンジの圧縮方法

4．核染色

細胞充填後１週間培養したコラーゲンスポンジの圧縮前，1/3，1/4圧縮24時間後それぞれの条件に３つのコラーゲンスポンジを用いた．コラーゲンスポンジに充填された細胞の量と分布を確認するために，組織学的検討を圧縮前

および圧縮24時間後に行った．ヒト歯根膜線維芽細胞を充填したコラーゲンスポジをPBSで５分×３回洗浄した後10％ホルムアルデヒド（10％中性緩衝ホルマリン，関東化学株式会社，東京）にて60分間固定をおこない，再度５分×３回PBSにて洗浄を行った．洗浄後，コンパウンド（Tissue-Tek®, Sakura Finetechnical Co. Ltd, Tokyo）中にスポンジを入れて，コンパウンドをスポンジ内部に充填させるため30分間真空状態にした．コンパウンド充填後，液体窒素にて凍結し，クリオスタット（CM1850, Leica, Germany）にて水平に５μmの連続凍結切片を作製した．作製した凍結切片は，DAPI（prolong® Gold antifade reagene with DAPI, life technologies™, Oregon）にて核染色を行い，細胞がコラーゲンスポンジ内に充填されているかを蛍光顕微鏡（DP71, OLYMPUS, JAPAN）にて確認した．

５．Realtime-PCR

コラーゲンスポンジのホモジナイズは，ホモジナイザー（バイオマッシャーⅡ, nippi, Tokyo）と23Gの注射針で行った．ホモジナイズしたコラーゲンスポンジからRNeasy® Mini Kit（50）（QIAGEN, TOKYO）を用いてRNA抽出を行った．さらにHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit（AB Applied Biosystems, CA）を用いて逆転写反応を行い，cDNAを合成した．Realtime-PCRはStep One Plus™（AB Applied Biosystems, CA）を用いて増幅産物を定量した．mRNAの発現量は，β-actinのmRNAの発現量を用いて標準化した．プライマーは以下のTaq-man® gene expression assay（AB Applied Biosystems, CA）を使用した．すなわち，tumor necrosis factor-α（TNF-α）（Hs01113624_g1），interleukin-1β（Il-1β）（Hs01555410_m1），osteoprotegerin（OPG）（Hs00900358_m1），vascular endothelial growth factor（VEGF）(Hs00900055_m1），fibroblast growth factor-2（FGF-2）（Hs00960934_m1），β-actin（Hs99999903_m1）である．

６．統計学的分析

コントロールと圧縮力を作用させた群の２群間における統計処理にStudent-testを用い，有意水準をP＜0.01とした．グラフはmean ±S.D.で示した．

結　　果

１．核染色

圧縮前の細胞の充填状態はコントロール，1/3および1/4圧縮の間に違いは認められなかった．1/4，1/3圧縮においては歯根膜細胞の充填状態は，コントロールと比べ同程度であった（図３－１，２，３）．

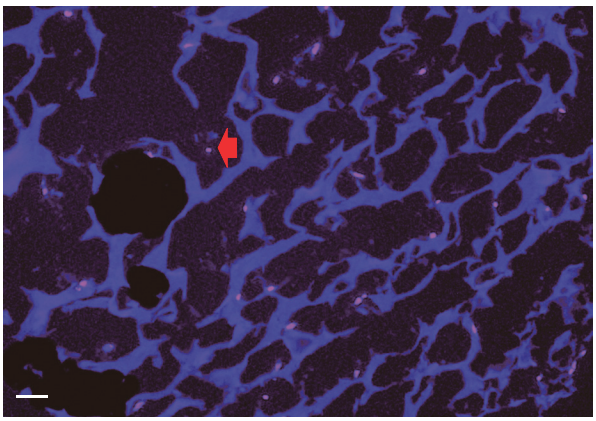


図３－１
コントロール（圧縮前）の細胞の充填状態．矢印で示したものが細胞の核．細胞は均等に充填されている．スケールバー＝50μm

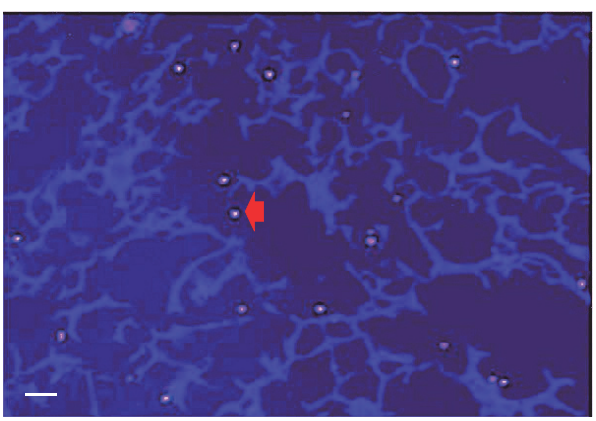


図３－２
1/3圧縮24ｈ．後の細胞の充填状態．矢印で示したものが細胞の核．コントロールと同様に細胞は均等に充填されている．スケールバー＝50μm

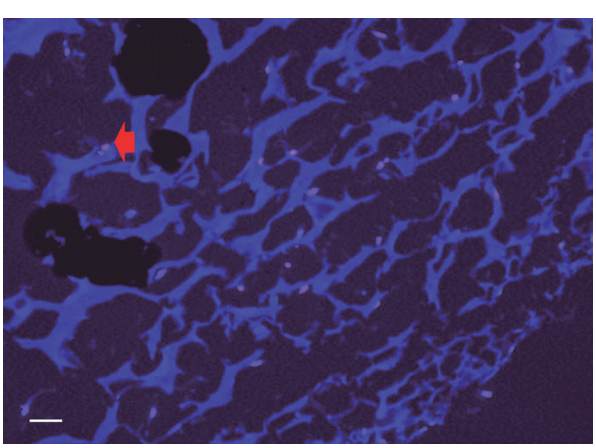


図３－３
1/4圧縮24ｈ．後の細胞の充填状態．矢印で示したものが細胞の核．コントロールと同様に細胞は均等に充填されている．スケールバー＝50μm

2．Realtime-PCR mRNAの発現量

⑴　TNF-α

圧縮1，3，6，12および24時間後の1/3圧縮時のTNF-α mRNA発現量の変化は，すべての時間においてコントロールに対し有意に増加が認められ，圧縮6から12時間後にピークを迎えた．1/4圧縮時においても同様にTNF-α mRNAは増加するが，ピークは圧縮3時間後であった．1/3圧縮と1/4圧縮のmRNA発現量の比較では，1/4圧縮の発現量が，圧縮1および3時間後で有意に多く，圧縮6時間後では有意な差が認められなかった．圧縮12時間後においては，1/3圧縮の発現量が有意に多く，圧縮24時間後になるとどちらも減少し，有意な差は認められなくなった（図4）．

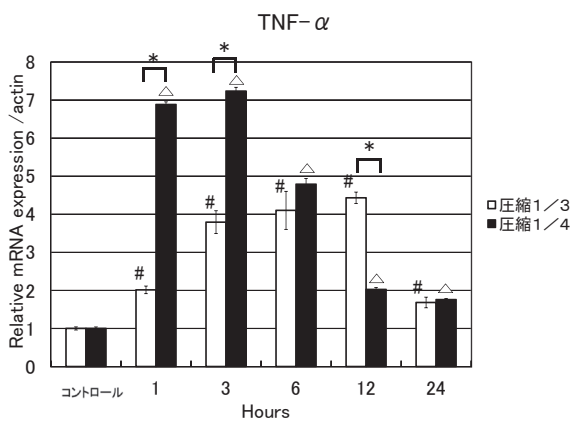


図4

三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞に圧縮を0，1，3，6，12，24時間作用させた場合のTNF-αのmRNAの発現量の変化．mean±SD，n=3，P<0.01

＃：1/3圧縮時，0分をコントロール（圧縮前）とした．

△：1/4圧縮時，0分をコントロール（圧縮前）とした．

＊：1/3圧縮時と1/4圧縮時の比較

⑵　FGF-2

圧縮1，3，6，12および24時間後の1/3圧縮時のFGF-2 mRNA発現量の変化は，すべての時間においてコントロールに対し有意な増加が認められ，圧縮24時間後には，約3.3倍増加し．1/4圧縮時においても同様の所見が認められ，圧縮24時間後には，約4.6倍増加した．1/3圧縮と1/4圧縮のmRNA発現量の比較では，圧縮6時間，12時間後を除いて，1/4圧縮時のmRNA発現量が多かった（図5）．

⑶　IL-1β

圧縮1，3，6，12および24時間後の1/3圧縮時のIL-1β mRNA発現量の変化は，すべての時間においてコントロールに対し有意な増加が認められ，圧縮1時間後にピークを迎えた．1/4圧縮時においても同様に増加する所見が認められたが，ピークは，圧縮3から6時間後であった．1/3圧縮と1/4圧縮のmRNA発現量の比較では，圧縮1時間後以外の全ての時間で1/4圧縮時のmRNA発現量が多かった

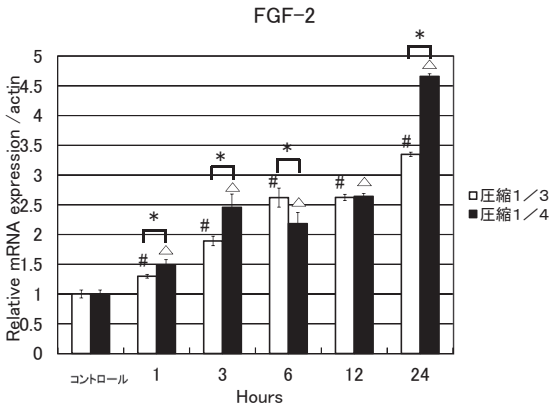


図5

三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞に圧縮を0，1，3，6，12，24時間作用させた場合のFGF-2のmRNAの発現量の変化．mean±SD，n=3，P<0.01

＃：1/3圧縮時，0分をコントロール（圧縮前）とした．

△：1/4圧縮時，0分をコントロール（圧縮前）とした．

＊：1/3圧縮時と1/4圧縮時の比較

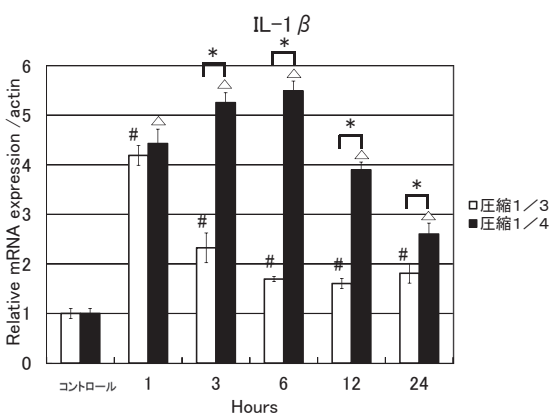


図6

三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞に圧縮を0，1，3，6，12，24時間作用させた場合のIL-1β のmRNAの発現量の変化．mean±SD，n=3，P<0.01

＃：1/3圧縮時，0分をコントロール（圧縮前）とした．

△：1/4圧縮時，0分をコントロール（圧縮前）とした．

＊：1/3圧縮時と1/4圧縮時の比較

（図6）．

⑷　VEGF

圧縮1，3，6，12および24時間後の1/3圧縮時のVEGF mRNA発現量の変化は，すべての時間においてコントロールに対し有意な増加が認められ，圧縮24時間後には，約5.5倍増加した．1/4圧縮時においても同様の所見が認められ，圧縮24時間後には，約8.5倍増加した．1/3圧縮と1/4圧縮のmRNA発現量の比較では，圧縮24時間後においてのみ1/4圧縮が有意に増加していた（図7）．

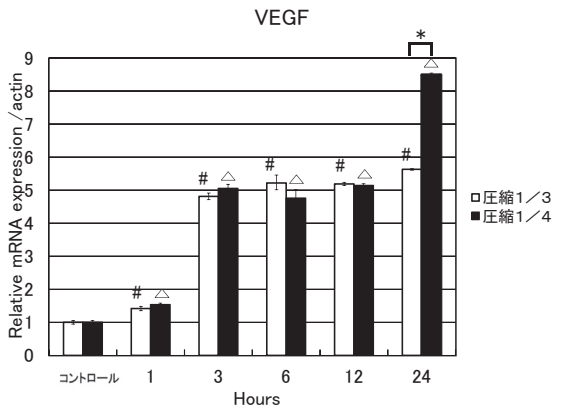


図７

三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞に圧縮を０，１，３，６，12，24時間作用させた場合のVEGFのmRNAの発現量の変化. mean±SD，n＝3，P＜0.01

＃：1/3圧縮時，０分をコントロール（圧縮前）とした.

△：1/4圧縮時，０分をコントロール（圧縮前）とした.

＊：1/3圧縮時と1/4圧縮時の比較

(5) OPG

圧縮１，３，６，12および24時間後の1/3圧縮時のOPG mRNA 発現量の変化は，圧縮１時間から12時間後でコントロールに対して有意に減少し，圧縮６時間後で最も減少していた．また，圧縮24時間後には，有意な差は認められなかった．1/4圧縮時においては，すべての時間においてコントロールに対して有意に減少していた.

1/3圧縮と1/4圧縮のmRNA発現量の比較では，どちらも減少傾向にあるが圧縮６時間後までは，1/4圧縮が有意に多く，圧縮12時間後に有意な差が認められなくなり，24時間後には1/3圧縮が有意に多くなってコントロールと有意な差が認められなくなった（図８）.

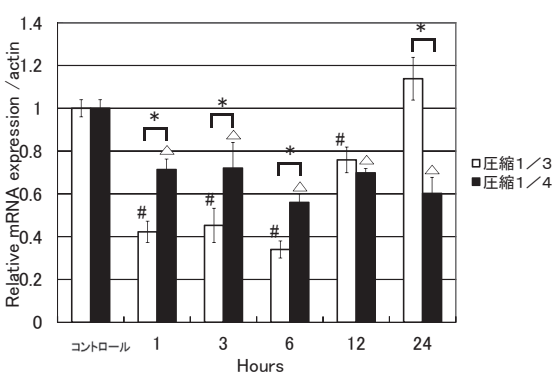


図８

三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞に圧縮を０，１，３，６，12，24時間作用させた場合のOPGのmRNAの発現量の変化. mean±SD，n＝3，P＜0.01

＃：1/3圧縮時，０分をコントロール（圧縮前）とした.

△：1/4圧縮時，０分をコントロール（圧縮前）とした.

＊：1/3圧縮時と1/4圧縮時の比較

３．1/3圧縮時と1/4圧縮時の比較

TNF-α，FGF-2，IL-1β，VEGF，OPGそれぞれのmRNA発現量の変化は，1/3圧縮時と1/4圧縮時の間で発現傾向は類似していたが，TNF-αの12時間，FGF-2の６時間，OPGの24時間を除いて総じて1/4圧縮時の方が多い傾向があった.

考　　察

１．細胞充填状態

1/4，1/3圧縮後のヒト歯根膜線維芽細胞の充填状態は，コントロールと比べ同程度であった．予備実験において1/2圧縮時における同様の観察を行ったが，24時間後には，細胞が観察されなかった．また，シャーレを観察すると1/2圧縮では，シャーレ内に多数の細胞が認められたため，おそらく圧縮力が強すぎたことによりスポンジ内の細胞がシャーレ内へ排出されたか死滅したためと考えられる．従って，本研究においては，1/3，1/4の圧縮による破骨細胞分化関連サイトカイン遺伝子発現を計測することとした.

２．三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞を使用した実験方法について

矯正力を再現するためにメカニカルストレスを付与する*in vitro*の実験として，圧縮力[3,4]，遠心力[5]，伸展刺激[6,7]，また，気圧による加圧[8]や静水圧[9]などの圧力を加える方法等が試みられている．なかでも矯正力を受けた圧迫側歯根膜における歯根膜線維芽細胞に，より近い状態を再現しているのは直接細胞に圧迫刺激を加える方法ではないかと考えられるが，その方法では，圧縮負荷中，細胞に栄養が行き渡らない可能性が考えられる．そこで本研究では，歯根膜を想定して作製した三次元立体培養ヒト歯根膜細胞に圧縮負荷を加える方法を開発したが，この方法では，圧縮負荷中も細胞に栄養を行き渡らせることができ，弱い矯正力負荷時の圧迫側で歯根膜線維芽細胞が圧迫された時の状態に，より近い現象を再現できたと考えられる．すなわち*in vitro*の実験下で，より*in vivo*に近い歯根膜を再現した実験系であると考えられる．また，圧縮負荷を加えることで歯根膜線維芽細胞が破骨細胞分化関連サイトカインを産生していることも確認できた.

３．TNF-αとFGF-2のmRNAの発現量

TNF-αは破骨細胞の前駆細胞である骨髄由来マクロファージに直接作用し破骨細胞への分化誘導を行う破骨細胞分化関連サイトカインであり[15,16]，これまでに歯根膜線維芽細胞に直接圧縮力を負荷することによりTNF-αのmRNAの発現量が増加すると報告されている[17]．本研究でもTNF-αの圧縮１，３，６，12および24時間後のmRNA発現量は，1/3圧縮時および1/4圧縮時，どちらもすべての時間においてコントロールに対し有意に増加して

いた．このような同様の結果より，TNF-αのmRNAの発現量が圧縮力を負荷したことで増加したため,歯根膜線維芽細胞が前駆細胞を破骨細胞へ分化誘導すると考えられる．また，1/4圧縮のほうが1/3圧縮に比べ早期に大きなピークがきている．このことから，1/4圧縮のほうがより有効に骨吸収を誘導し得る圧縮力ではないかと考えられる．

FGF-2は，骨や軟骨細胞の調節機能があることで知られている[18,19]．また骨吸収刺激能力があることも認められ[20,21]，FGF-2を過剰に発現させると，より分化が進んだ骨芽細胞に対してはアポトーシスを誘導することも報告されている[22]．本研究では圧縮力を負荷したことによりFGF-2のmRNAの発現が1/3圧縮時および1/4圧縮時ともにコントロールに対し有意に増加した．この現象は，メカニカルストレスが骨吸収を誘導するメカニズムの中にFGF-2の増加が関与している可能性を示唆しているとも考えられる．また，*in vitro*の研究によりTNF-αはFGFファミリーの発現に関与することや創傷治癒過程においてもTNF-αがこれらの分子に影響力をもつことが報告されている[23]．TNF-αによって誘導されると考えられるFGF-2は線維芽細胞や表皮細胞の分裂促進，血管新生への関与が明らかとなっており，炎症期に続く細胞増殖期に働く分子として知られている[24-27]．TNF-αは1/3圧縮時および1/4圧縮時，どちらもコントロールと比べると有意に増加しているものの，圧縮24時間後において，実験期間中最も減少している．一方でFGF-2は，圧縮24時間後で1/3圧縮時および1/4圧縮時，どちらも最も増加している．この結果は，TNF-αの上昇がFGF-2の発現に関与していることを示唆するとともに，TNF-αとFGF-2の関連が歯根膜における創傷治癒に関与している可能性も考えられる．

4．IL-1βのm-RNAの発現量

IL-1βは，成熟破骨細胞に直接作用し，その骨吸収活性を誘導することが報告されている[28]．また，歯根膜線維芽細胞への伸展刺激などのメカニカルストレスの負荷によりIL-1βの産生が促進することが報告されている[29,30]．本研究では1/3圧縮時および1/4圧縮時，ともにコントロールに対し有意にmRNAの発現量が増加していた．このような同様の結果より，IL-1βのmRNAの発現量が圧縮力を負荷したことで増加したため，骨吸収活性を誘導すると考えられる．また，1/3圧縮時および1/4圧縮時では，1/4圧縮時のほうが持続的に増加している．このことから，1/4圧縮のほうがより有効に骨吸収を誘導し得る圧縮力ではないかと考えられる．

5．VEGFのm RNAの発現量

VEGFは血管新生の促進因子として知られており，骨代謝に影響を及ぼす骨吸収サイトカインとしての役割も認識されている[31,33]．また，破骨細胞前駆細胞の分化に必須であるmacrophage-colony stimulating factor（M-CSF）様作用が認められており[31,32]，マウス大腿骨から採取した骨髄由来細胞にVEGFを添加すると破骨細胞の分化および活性化が促進する[33]ことや実験的な歯の移動の際rhVEGFの局所投与により破骨細胞が増加することが明らかになっている[34]．本研究では，圧縮力を負荷したことによりVEGFのmRNA発現量は，1/3圧縮時および1/4圧縮時，ともに実験期間中，コントロールに対し有意に増加していた.この結果は矯正力の加わった圧迫側歯根膜での破骨細胞の出現,活性化にVGEFの出現が関与していることを示唆しているものと考えられる．圧縮24時間後において，1/3圧縮時ではコントロールに対して約5.5倍，1/4圧縮時では約8.5倍であったことは，1/4圧縮時のほうがより骨吸収を有効に誘導することのできる圧縮力である可能性が考えられる．

6．OPGのm RNAの発現量

OPGは，TNFレセプターファミリーであるが，膜貫通領域をもたない分泌性のタンパク質で，RANKLの真のレセプターで破骨細胞前駆細胞上にあるRANKと競合しRANKL活性を抑制し，破骨細胞形成を阻害する因子である[35]．歯根膜線維芽細胞に直接的な圧縮力を加えるとRANKL発現の増加とOPG発現の減少により破骨細胞が増加することが報告されている[36]．一方で，ラットの歯根膜線維芽細胞に強い機械的ストレス（遠心力）を負荷し５日間観察した実験ではRANKLのmRNA発現が５日間を通して有意に高値を示し，一方でOPGのmRNA発現は２日目に有意に高値を示したとの報告がある[37]．すなわち強い機械的ストレスが加わった場合は，歯根膜線維芽細胞では，RANKL発現がまず増加して破骨細胞形成を誘導するが，少し遅れてOPGの発現を増加することにより，早期に破骨細胞の出現を抑制する可能性が示されている[37]．本実験で，OPGの発現量が，圧縮後６時間までは，1/3圧縮の方が1/4圧縮より減少しているものの圧縮後24時間には1/3圧縮においてはコントロールのレベルにもどっているのに対し，より弱いメカニカルストレスである，1/4圧縮時においては持続的にOPG mRNAの発現が抑制されていた．この結果は1/4圧縮時の方がより有効に骨吸収活性を持続できる可能性を示唆しているものと考えられる．

結　　論

in vivo の歯根膜に近い実験系を確立してヒト歯根膜線維芽細胞に機械的圧縮を加えることができた．その結果，1/3圧縮時と1/4圧縮時の間でTNF-α，FGF2，IL-1β，VEGF，OPGのmRNA発現傾向は類似していたが，相対量は1/4圧縮時の方が多い傾向を示していた．また，ヒト歯根膜線維芽細胞が破骨細胞分化および創傷治癒に関するサイトカインを産生し，骨および支持組織リモデリングの一端を担っている可能性も示唆された．以上のことより，矯

正治療において歯根膜幅を1/4圧迫することが効率的な歯の移動を誘導できるものと考えられた.

謝　　辞

本稿を終えるにあたり，本研究に数々の御援助，御協力いただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座歯科矯正学教室ならびに口腔病態学講座細胞分子薬理学教室の教室員，口腔機能学講座口腔機能解剖学教室，口腔病態学講座口腔病理病態学教室各位に厚く御礼申し上げます.

なお本研究は，文部科学省科学研究費（基礎研究(C) 22592304）の助成により行った.

参 考 文 献

1．Yokoya K, Sasaki T, Shibasaki Y : Distributional changes of osteoclasts and pre-osteoclastic cells in periodontal tissues during experimental tooth movement as revealed by quantitative immunohistochemistry of H(+)-ATPase. J Dent Res 76 : 580-587, 1997.

2．Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H : Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition . J Dent Res 80 : 887-891, 2001.

3．Nakao K, Goto T, Gunjigake K, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K : Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells.J Dent Res 86 : 623-628, 2007.

4．Kaneuji T, Ariyoshi W, Okinaga T, Toshinaga A, Takahashi T, Nishihara T : Mechanisms involved in regulation of osteoclastic differentiation by mechanical stress-loaded osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 408 : 103-109, 2011.

5．大久保　裕一郎：歯根膜線維芽細胞に対する遠心力の影響．松本歯学，30：172-173，2004.

6．白川　哲：ヒト歯根膜由来細胞の分化に与える周期的伸展力の影響．日本歯周誌，48：113-122，2006.

7．酒井　利雄：骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞におけるRANKL遺伝子の周期的細胞伸縮刺激による発現誘導．福岡歯大誌，30：13-26，2003.

8．Kim Takenori, Handa Asako, Ida Junichiro, Yoshida Shigemitsu: RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force. Arch Oral Biol 52 : 244-250, 2007.

9．本城　正：骨芽細胞株MC3T3-E1細胞に対する流体剪断応力負荷時におけるCTGF発現に関わるシグナル伝達機構の研究．岡山歯誌，22：139-152，2003.

10．金井　鐘秀，野原　広美，花田　晃治：持続的加圧刺激がヒト歯根膜線維芽細胞に及ぼす初期効果について．日矯歯誌，51：153-163，1992.

11．Kanzaki H, Chiba M, Shinizu Y, Mitani H : Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis.J Bone Miner Res 17 : 210-220, 2002.

12．Yamaguchi M, Shimizu N, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y : Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E2 production by human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 39 : 877-884, 1994.

13．大嶋　嘉久，植松　節子，平岡　行博，栗原　三郎：ヒト歯根膜線維芽細胞におけるメカニカルストレスによるIL-1β, MMP-1（collagenase), collagen type-ⅠのmRNAの発現について．松本歯学，28：7-12，2002.

14．Somerman M, Young M, Foster R, Moehring J, Imm G, Sauk K : Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. Arch. Oral Biol 35 : 241-247, 1990.

15．Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashino K, Martin TJ, Suda T : Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction.J. Exp. Med 191 : 275-286, 2000.

16．Azuma Yoshiaki, Kaji Keisuke, Katogi Rei, Takeshita Sunao, Kudo Akira: Tumor Necrosis Factor-αInduces Differention of and Bone Resorption by Osteoclasts. J Biol Chem 275 : 4858-4864, 2000.

17．Mitsuhashi Masami, Yamaguchi Masaru, Kojima Tadashi, Nakajima Ryo, Kasai Kazutaka : Effects of HSP70 on the compression force-induced TNF-$\alpha$and RANKL expression in human periodontal ligament cells:Inflammation Regenera 60 :1 87-194, 2011.

18．Canalis E, Centrella M, McCarthy T: Effects ofnbasic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. J. Clin. Invest. 81 : 1572-1577, 1988.

19．Hurley M, Abreu C, Gronowicz G, Kawaguchi H, Lorenzo J : Expression and regulation of basic fibroblast groeth factor mRNA levels in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. J. Biol. Chem. 269 : 9392-9396, 1994.

20．Kawaguchi Hiroshi, Chikazu Daichi, Nakamura Kozo, Kumegawa Masayoshi, Hakeda Yoshiyuki: Direct and Indirect Actions of Fibroblast Growth Factor 2 on Osteoclastic Bone Resorption in Cultures. J Bone

Miner Res 15 : 3, 2000.
21. Chikazu Daichi, Hakeda Yoshiyuki, Ogata Naoshi, Nemoto Ken, Itabashi Akira, Takato Tsuyoshi, Kumegawa Masayoshi, Nakamura Kozo, Kawaguchi Hiroshi: Fibroblast Growth Factor (FHF)-2 Directly Stimulates Mature Osteoclast Function through Activation of FGF Receptor 1 and p42/p44 MAP Kinase. J Biol Chem 275 : 31444-31450, 2000.
22. Mansukhani Alka, Paola Bellosta, Malika Sahni, Claudio Basilico: Signaling by Fibroblast Growth Factors (Fgf) and Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (Fgfr2)-Activating Mutations Blocks Mineralization and Induces Apoptosis in Osteoblasts. JCB 149 : 1297-1308, 2000.
23. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS: Growth factors and cytokines in wound healing.Wound Repair Regen 16 : 585-601, 2008.
24. Mast BA, Schultz GS: Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds.Wound Rep Reg 4 : 411-420, 1996.
25. Broughton G 2nd, Janus JE, Attinger CE: The basic science of wound healing. Plast Reconstr Surg 117 : 1 2S-34S, 2006.
26. Mooney DP, O'Reilly M, Gamelli RL: Tumor necrosis factor and wound healing. Ann Surg 211: 124-129, 1990.
27. Salomon GD, Kasid A, Cromack DT: The local effects of cachectin /tumor necrosis factor on wound healing. Ann Surg 214 : 175-180, 1991.
28. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, Suda T: Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromall cells.Exp Cell Res 247 : 84-93, 1999.
29. Leung. DYM, Glagov S, Mathews MB: A new in vitro system for studying cell response to mechanical stimulation : Different effects of cyclic stretching and agitation on smooth muscle cell biosynthesis. Exp Cell Res109 : 285-298, 1977.
30. Kawase T, Sato S, Miyake K: Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. Adv Dent Res 2 : 234-239, 1988.
31. Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H: Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption.J Exp Med 190 : 293-298, 1999.
32. Kaku M, Kohno S, Kewata T, Fujita C, Takimasa C, Tsutsui K, Tanne K: Effects of vascular endothelial growth factor on osteoclast induction durong tooth movement in mice.J Dent Res 80 : 1880-1883, 2001.
33. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanad K, Kumegawa M,Hakeda Y : Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhancesvosteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. FEBS Lett 473 : 161-164, 2000.
34. Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, Motokawa M, Ohtani J, Tenjo K, Tohma Y, Tokimasa C, Fujita T, Kawata T, Tanne K : Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and the Effects on Bone Remodeling during Experimental Tooth Movement. J Dent Res 82 : 177-182, 2003.
35. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ : Modulation of osteoclast differention and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev 20 : 345-357, 1999.
36. K Hiroyuki, C Mirei, S Yoshinobu, M Hideo : Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Stress Induce Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand Up-Regulation via Prostaglandin E_2 Synthesis. J Bone Miner Res 17 : 2, 2002.
37. Naruse S, Matsuzaka K, Kokubu E, Inoue T : Expressions of RANKL and OPG mRNA on Rat Periodontal Ligament Cells Following Heavy Mechanical Stress.日外傷歯誌, 51 : 10-17, 2009.

Hokkaido J. Dent. Sci., 34 : 97-105, 2014.

ORIGINAL

A study on optimum orthodontic force using human periodontal ligament cells on 3D culture system

Meri Haniu, Takenori Kim, Yoshiaki Satho and Junichiro Ida

ABSTRACT : Osteoclast differentiation on the pressure side with the tooth movement mechanism by orthodontic forces is believed to be controlled by cytokines that periodontal ligament fibroblasts secrete; in experiments thus far, there have been reports using the methods of adding mechanical irritation directly to the cells. Therefore, in this study, we developed a three-dimensional culture system of periodontal ligament fibroblasts which assumes the periodontal ligament of *in vivo* and mechanical compression was applied. The aim of this study is to clarify the relationship of the compression amount and the changes of the cytokine gene expression levels that are related to osteoclast differentiation. We cultured human periodontal ligament fibroblasts from teeth that were extracted for the purpose of orthodontic treatment. After a one week culture in which the culture cells of passage 5 were packed in a $\phi 5 \times 3$ mm collagen sponge, the collagen sponges were compressed by 1/3, 1/4. We searched for changes in the cytokine gene expression level in 0 (the control) after 1, 3, 6, 12, and 24 hours in real-time PCR. Although the packed state of the cells when compressed by 1/3 and 1/4 was similar in comparison to the control, the mRNA expression of cytokines TNF-α, FGF-2, IL-1β and VEGF related to osteoclast differentiation increased significantly more than the control at each point of 1/3 and 1/4 compression. The mRNA expression level of OPG was decreased within 24 hours after the start of 1/3 compression. Overall, the relative amounts of the mRNA expression were similar to the expression tendencies between the time of 1/3 compression and the time of 1/4 compression, but there was a higher tendency at the time of 1/4 compression. From these results, it has been suggested that when mechanical compression is added to the periodontal ligament fibroblasts in an experimental system that is assumed as *in vivo,* the cells produce cytokines and may play a part in bone remodeling. In addition, we believe it is effective to move teeth in orthodontic treatment when the tooth is pushed by a distance of a quarter of the width of the periodontal ligament.

Key Words : three-dimensional culture of periodontal ligament fibroblasts, Mechanical stress, cytokines

Department of Orthodontics, Division of Oral Functional Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Junichiro Iida) Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan.