



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	羽二生, 芽里
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11248号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55746
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Meri_Haniu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 羽二生 芽里

学 位 論 文 題 名

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

【緒言】 歯科矯正治療は、最適な位置に歯を移動し、顎の成長と調和のとれた正常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(メカニカルストレス)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。歯に矯正力を負荷すると圧迫側では、歯根膜線維芽細胞等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、メカニカルストレスを歯根膜線維芽細胞に付与する方法として圧縮力、遠心力、伸展刺激、また、加圧や静水圧などの圧力を加える等の様々な手法が用いられ、これまでにその影響について研究がなされている。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ある。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。この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付与して、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】 矯正治療時便宜抜去された健全な第一小臼歯の歯根膜からヒト歯根膜線維芽細胞を採取した。5 継代目の培養細胞を $\phi 5 \times 3\text{mm}$ のコラーゲンスポンジに充填し 1 週間培養後、インキュベーター内でコラーゲンスポンジを 1/3 (1mm)、1/4 (0.75mm) 圧縮した。0 (コントロール)、1、3、6、12、24 時間後に破骨細胞分化に関するサイトカインである TNF- α 、FGF-2、IL-1 β 、VEGF、OPG の遺伝子発現の変化を Real time PCR にて検索した。

【結果】圧縮前の細胞の充填状態は Control、1/3 および 1/4 圧縮の間に違いは認められなかった。1/3、1/4 圧縮時の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。破骨細胞分化に関するサイトカインである $\text{TNF-}\alpha$ 、 FGF-2 、 $\text{IL1-}\beta$ 、 VEGF の mRNA 発現量は、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、すべての 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があった。

【考察】1/4、1/3 圧縮後の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、シャーレ内のスポンジ外に多数の細胞が認められたため、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量の変化を観察することとした。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、矯正力負荷時の圧迫側で、歯根膜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た。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。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 $\text{TNF-}\alpha$ の mRNA の発現量が増加すると報告されている。本研究でも $\text{TNF-}\alpha$ 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。このことから、歯根膜線維芽細胞がメカニカルストレスを受けることにより前駆細胞を破骨細胞へ分化誘導する可能性が考えられる。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起きていることから、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、骨吸収刺激能力があることが認められている。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。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-1 β の産生が促進することが報告されている。本研究では 1/3、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とから、産生された IL-1 β が骨吸収活性を誘導している可能性が考えられる。また、1/3 圧縮と 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。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。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 VEGF 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。OPG は、歯根膜線維芽細胞に直接的な圧縮力を加えると減少することが報告されている。一方で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。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、1/4 圧縮時には持続的に OPG mRNA の発現が抑制されていた。この結果は 1/4 圧縮時のほう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 の歯根膜の圧迫側に近い実験系を確立して歯根膜線維芽細胞に機械的刺激を加えることができた。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。