



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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                                                                                         |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(歯学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第11248号                                                                                        |
| Issue Date          | 2014-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k11248">https://doi.org/10.14943/doctoral.k11248</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/55748">https://hdl.handle.net/2115/55748</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Meri_Haniu.pdf                                                                                  |



# 博士論文

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

平成 26 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

羽二生 芽里

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  $\phi 5 \times 3$  mm 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  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{FGF2}$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{VEGF}$  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、 $\text{OPG}$  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  $\text{OPG}$  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<sup>1-2)</sup>。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<sup>3-4)</sup>、

遠心力<sup>5)</sup>、伸展刺激<sup>6-7)</sup>、また、気圧による加圧<sup>8)</sup>や静水圧<sup>9)</sup>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<sup>3)</sup>。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<sup>10)</sup>、Kanzaki<sup>11)</sup>、Yamaguchi<sup>12)</sup> 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<sup>5)</sup>、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<sup>13)</sup>。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<sup>8)</sup>。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<sup>14)</sup>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、滅菌ディスプレイ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<sup>®</sup>, 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, USA), 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Pn-St, 50U/ml ペニシリン G, 50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン, GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, USA) L-アスコルビン酸 2-リン酸 (Sigma-Aldrich, MO, USA), L-アラニル-L-グルタミン

(Sigma-Aldrich, MO, USA) 含有 minimum essential medium eagle 培地 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) を用いて 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-95 % 気相下に行った。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 5 mm, 高さは 3 mm の円柱状のコラーゲンスポンジ (AteloCell® Atelocollagen spoge MIGHTY, KOKEN, Tokyo, Japan) (図 1-1) 1 個あたりに,  $1 \times 10^7$  個の細胞含有培地 50  $\mu$ l 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, Japan) をホルムアルデヒドと  $\gamma$  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  $\mu$ m で, 孔は相互に繋がっている (図 1-2)。

### 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。3.0 mm の高さを 1/3, 1/4 圧縮するため 2.0mm, 2.25mm の耐熱ガラス（テンパックス®，関谷理化株式会社，東京，日本）を特注（NITTO 社，長野，日本）した。100 mm シャーレー内に 1/3 圧縮時には 2 mm, 1/4 圧縮時には 2.25mm 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, 1, 3, 6, 12, 24 時間とし，持続的に作用させた（図 2）。圧縮させなかったコラーゲンスポンジ，すなわち、作用時間 0 のものをコントロールとして使用した。

### 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ンジ

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, 日本) 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<sup>®</sup>, Sakura Finetechnical Co. Ltd, Tokyo, Japan) 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 5  $\mu$  m の連続凍結切片を作製した. 作製した凍結切片は, DAPI (prolong<sup>®</sup> Gold antifade reagent with DAPI, life technologies<sup>™</sup>, Oregon, USA) 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, Japan) 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<sup>®</sup> 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, USA) 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, USA) を用いて増幅産物を定量した. mRNA の発現量は,  $\beta$ -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, USA) を使用した. すなわち, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Hs01113624\_g1), interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) (Hs01555410\_m1), osteoprotegerin (OPG) (Hs00900358\_m1), vascular endothelial growth factor (VEGF) (Hs00900055\_m1), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) (Hs00960934\_m1),  $\beta$ -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  $\pm$  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 (図 3-1, 2, 3) .

## 2 . Realtime-PCR mRNA の発現量

### (1) TNF- $\alpha$

圧縮 1, 3, 6, 12 および 24 時間後の 1/3 圧縮時の TNF-  $\alpha$  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 (図 4-1) . 1/4 圧縮時においても同様に TNF-  $\alpha$  mRNA は増加するが, ピークは圧縮 3 時間後であった (図 4-2) . 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 4-3) .

### (2) 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 倍増加した（図 5-1）。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（図 5-2）。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 5-3）。

### (3) IL-1 $\beta$

圧縮 1, 3, 6, 12 および 24 時間後の 1/3 圧縮時の IL-1  $\beta$  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（図 6-1）。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（図 6-2）。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 6-3）。

### (4) 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（図 7-1）. 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（図 7-2）. 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 7-3）.

#### (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（図 8-1）. 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（図 8-2）.

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 8-3）.

### 3. 1/3 圧縮時と 1/4 圧縮時の比較

TNF- $\alpha$ , FGF-2, IL-1 $\beta$ , 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- $\alpha$  の 1 2 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<sup>3-4)</sup>, 遠心力<sup>5)</sup>, 伸展刺激<sup>6-7)</sup>, また, 気圧による加圧<sup>8)</sup>や静水圧<sup>9)</sup>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- $\alpha$ と FGF-2 の m-RNA の発現量

TNF- $\alpha$  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<sup>15-16)</sup>，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- $\alpha$  の m-RNA の発現量が増加すると報告されている<sup>17)</sup>．本研究でも 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。このような同様の結果より、TNF- $\alpha$  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起きている。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<sup>18-19)</sup>。また骨吸収刺激能力があることも認められ<sup>20-21)</sup>、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<sup>22)</sup>。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- $\alpha$  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- $\alpha$  がこれらの分子に影響力をもつことが報告されている<sup>23)</sup>。TNF- $\alpha$  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<sup>24-27)</sup>.  $\text{TNF-}\alpha$  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  $\text{FGF-2}$  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,  $\text{TNF-}\alpha$  の上昇が  $\text{FGF-2}$  の発現に関与していることを示唆するとともに,  $\text{TNF-}\alpha$  と  $\text{FGF-2}$  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. $\text{IL-1}\beta$ の m-RNA の発現量

$\text{IL-1}\beta$  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<sup>28)</sup>. 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  $\text{IL-1}\beta$  の産生が促進することが報告されている<sup>29-30)</sup>. 本研究では 1/3 圧縮時および 1/4 圧縮時, と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,  $\text{IL-1}\beta$  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<sup>31-33)</sup>。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<sup>31-32)</sup>、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<sup>33)</sup>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<sup>34)</sup>。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。

## 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<sup>35)</sup>. 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<sup>36)</sup>. 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<sup>37)</sup>. 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<sup>37)</sup>. 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  $\text{TNF-}\alpha$  ,  $\text{FGF2}$  ,  $\text{IL-1}\beta$  ,  $\text{VEGF}$  ,  $\text{OPG}$  の mRNA 発現傾向は類似していたが、相対量は 1/4 圧縮時の方が高い傾向を示していた．また、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．

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.松本歯学会雑誌, 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.日本歯周病学会会誌,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.福岡歯科大学学会雑誌,30 : 13-26, 2003.

8. Takenori Kim, Asako Handa, Junichiro Ida, Shigemitsu Yoshida: RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force. ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY 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.岡山歯学会雑誌, 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. 日本矯正科学会雑誌, 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-1  $\beta$  , MMP-1(collagenase), collagen type-I の mRNA の発現について. 松本歯学会雑誌, 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, Kinoshita 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. Yoshiaki Azuma, Keisuke Kaji, Rei Katogi, Sunao Takeshita, Akira Kudo : Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  Induces Differentiation of and Bone Resorption by Osteoclasts. The Journal of Biological Chemistry, 275:4858-4864, 2000.
17. Masami Mitsuhashi, Masaru Yamaguchi, Tadashi Kojima, Ryo Nakajima, Kazutaka Kasai : Effects of HSP70 on the compression force-induced TNF-  $\alpha$  and RANKL expression in human periodontal ligament cells: Inflammation Res 60 : 187-194, 2011.

18. Canalis E, Centrella M, McCarthy T: Effects of basic 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 growth factor mRNA levels in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 269: 9392–9396, 1994.
20. Hiroshi Kawaguchi, Daichi Chikazu, Kozo Nakamura, Masayoshi Kumegawa, Yoshiyuki Hakeda : Direct and Indirect Actions of Fibroblast Growth Factor 2 on Osteoclastic Bone Resorption in Cultures. *Journal of bone and mineral research* 15 : 3, 2000
21. Daichi Chikazu, Yoshiyuki Hakeda, Naoshi Ogata, Ken Nemoto, Akira Itabashi, Tsuyoshi Takato, Masayoshi Kumegawa, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Fibroblast Growth Factor(FGF)-2 Directly Stimulates Mature Osteoclast Function through Activation of FGF Receptor 1 and p42/p44 MAP Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 275 : 31444-31450, 2000.
22. Alka Mansukhani, 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/stromal 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 Res* 109: 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 during tooth movement in mice. *J Dent Res* 80 : 1880-1883, 2001.

33. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y : Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 473 : 161-164, 2000.

34. S Kohno, M Kaku, K Tsutsui, M Motokawa, J Ohtani, K Tenjo, Y Tohma, C

Tokimasa, T Fujita, T Kawata, K Tanne : Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and the Effects on Bone Remodeling during Experimental Tooth Movement.J Dent Res 82 : 177-182, 2003.

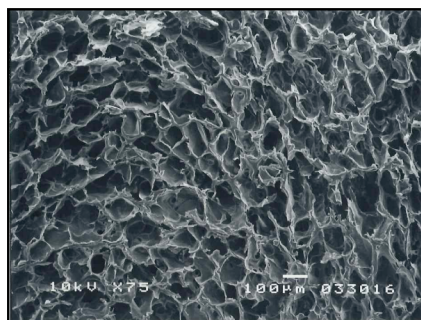
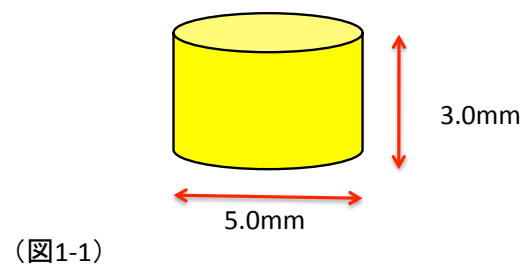
35. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ : Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families.Endocr Rev 20 : 345-357, 1999.

36. Hiroyuki K, Mirei C, Yoshinobu S, Hideo M : Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Stress Induce Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand Up-Regulation via Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis.Journal of bone and mineral research 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.日本外傷歯学会雑誌 5 卷 1 号 : 10-17, 2009.

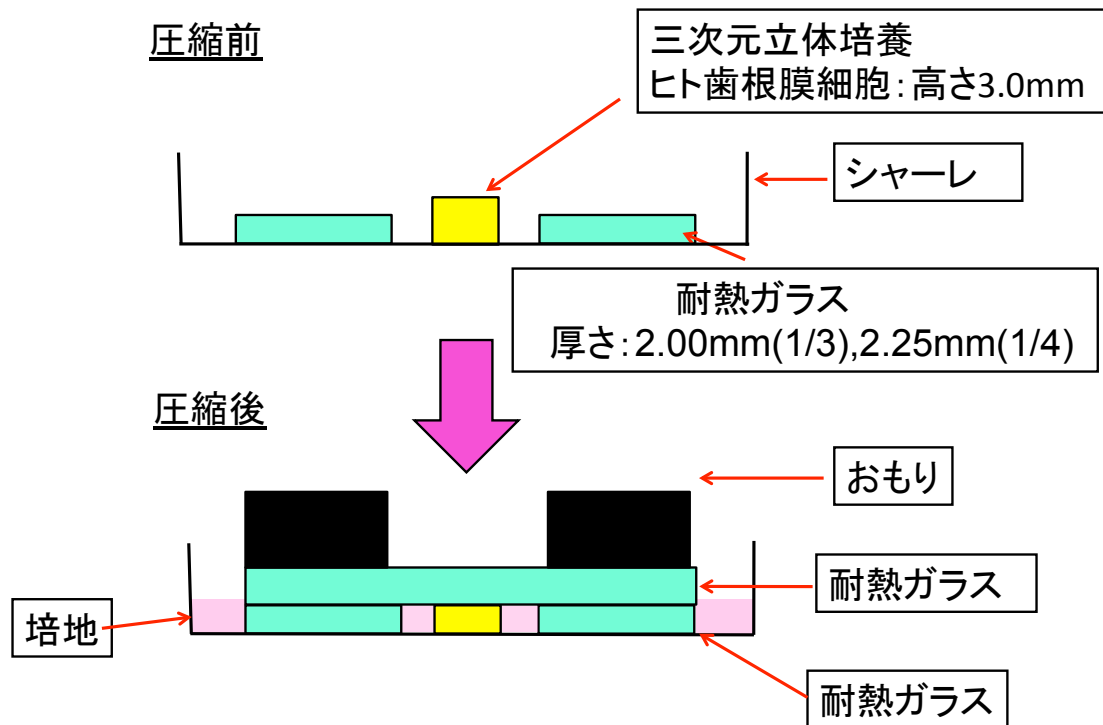
謝辞

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．

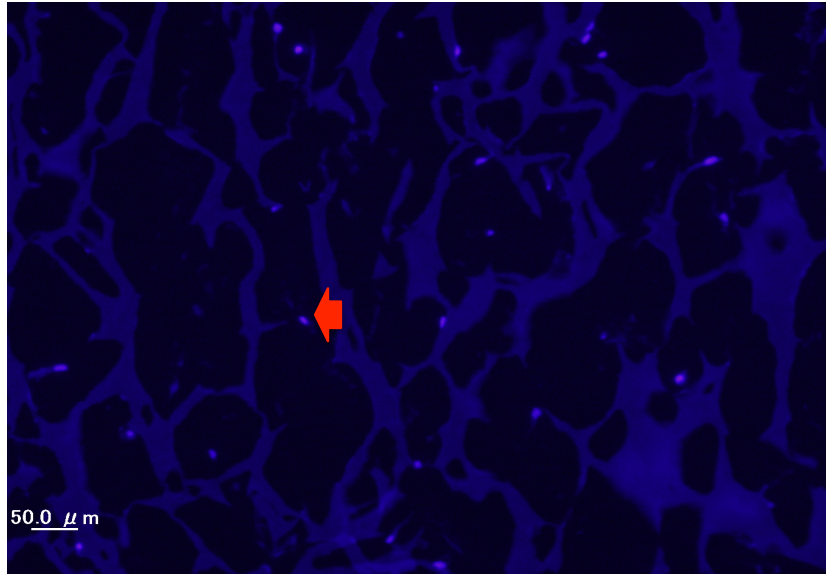


(图1-2)

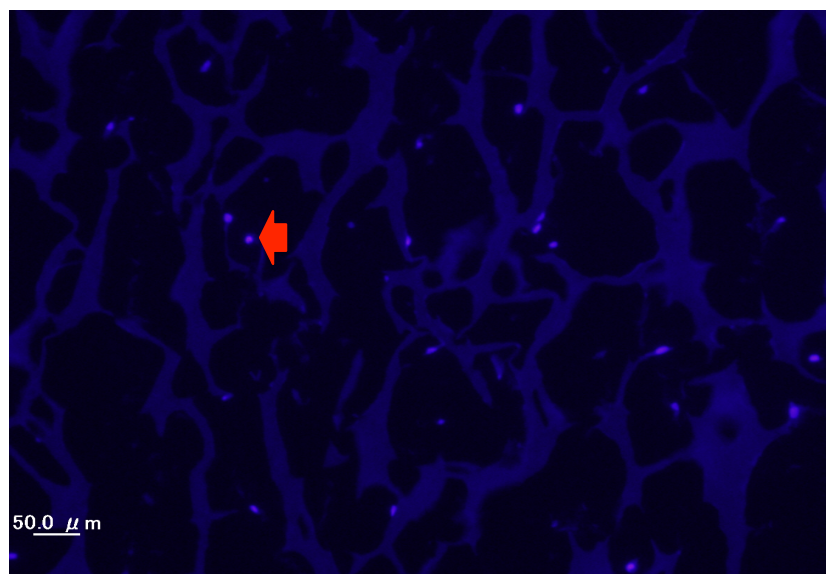
## 三次元立体培養ヒト歯根膜細胞の圧縮方法



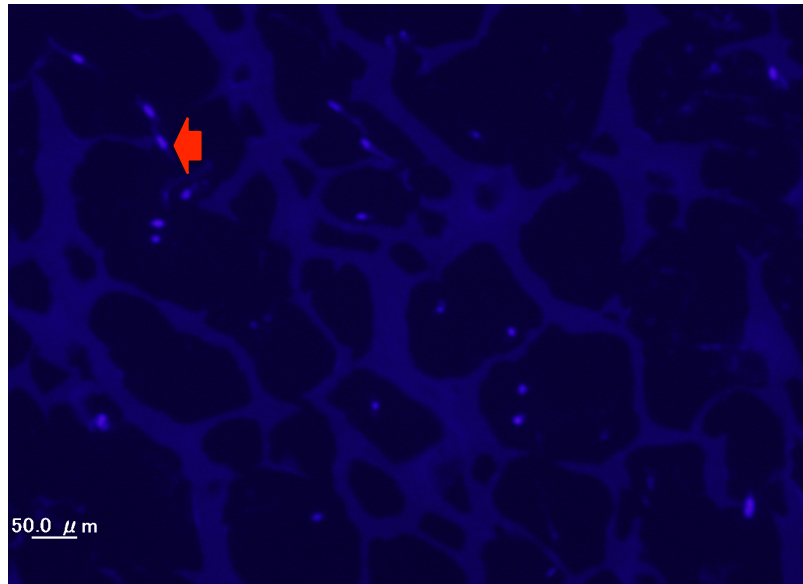
(図 2)



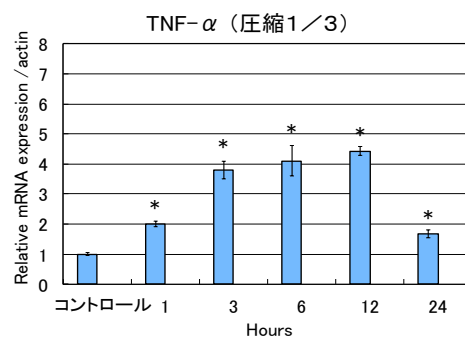
(图3-1)



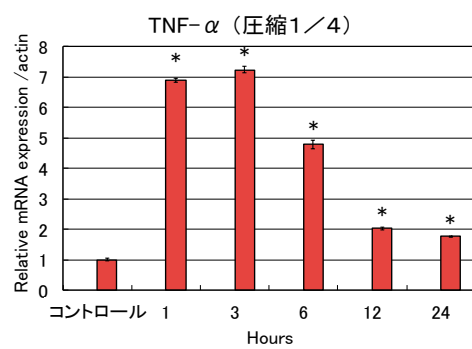
(图3-2)



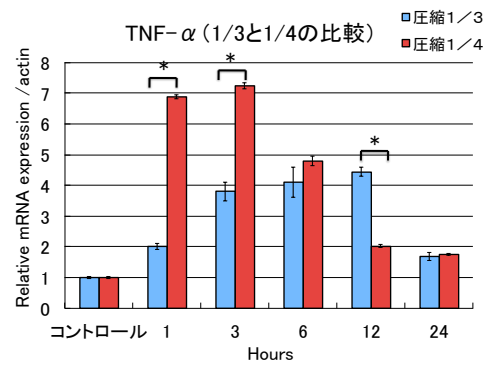
(图3-3)



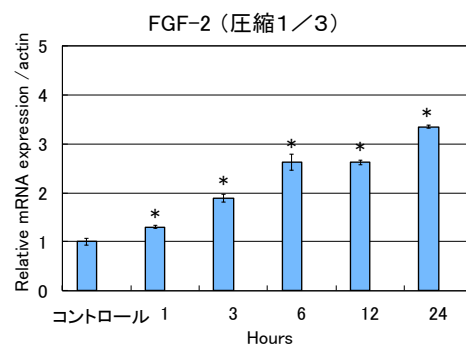
(図4-1)



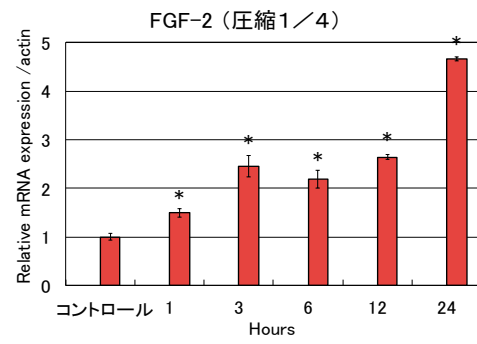
(図4-2)



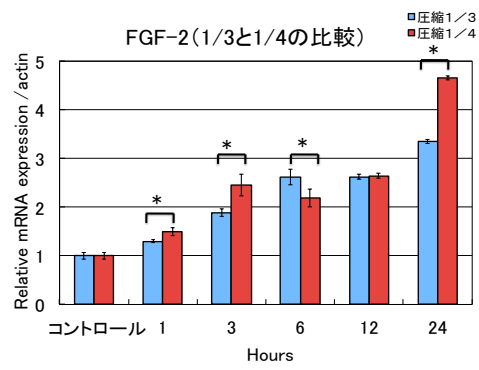
(図4-3)



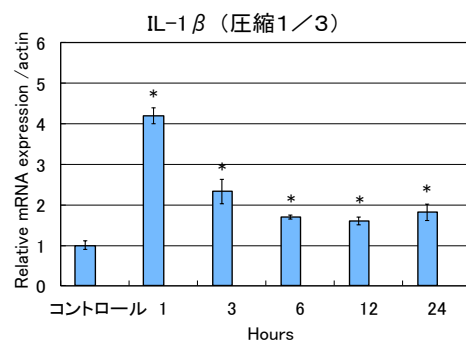
(図5-1)



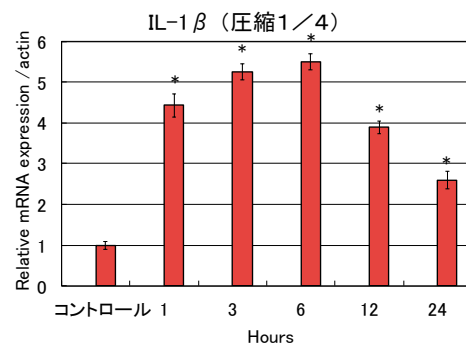
(図5-2)



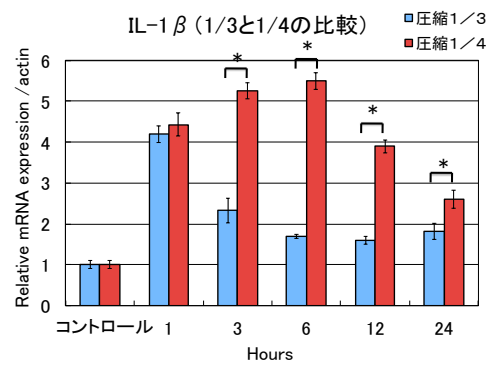
(図5-3)



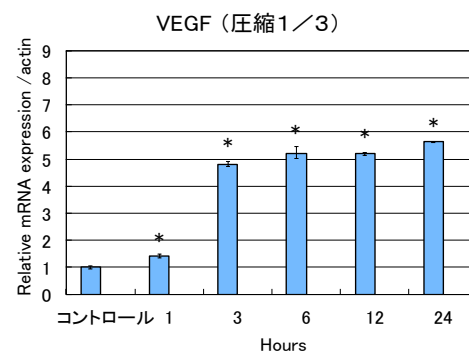
(図6-1)



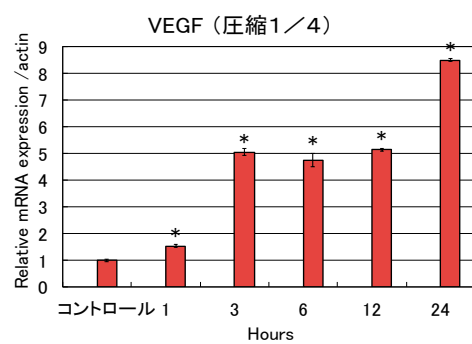
(図6-2)



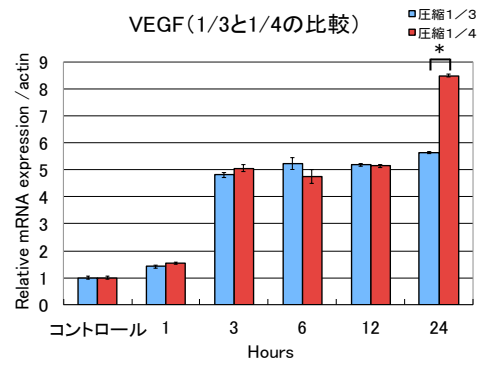
(図6-3)



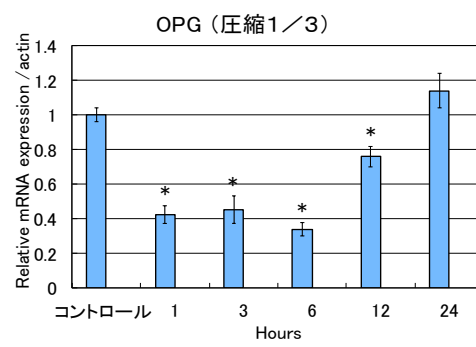
(図7-1)



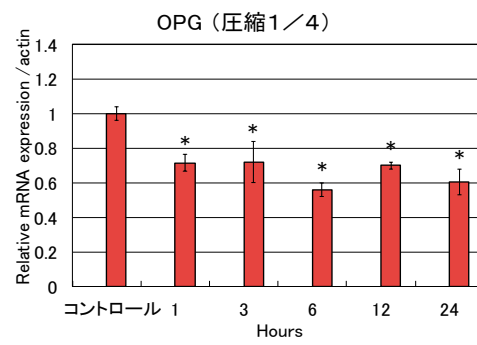
(図7-2)



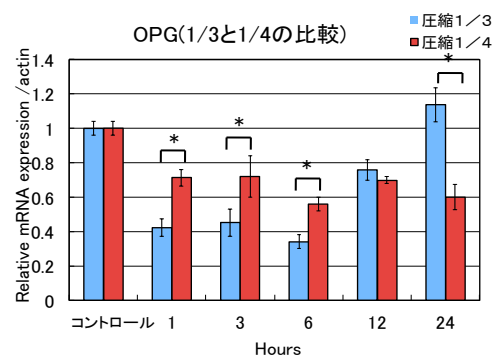
(図7-3)



(図8-1)



(図8-2)



(図8-3)

## 図とその説明

(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:  $30\ \mu\text{m}$ - $200\ \mu\text{m}$ .

(図 1 に挿入)

(図 2) コラーゲンスポンジの圧縮方法

(図 2 に挿入)

(図 3-1) コントロールの細胞の充填状態. 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= $50\ \mu\text{m}$

(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= $50\ \mu\text{m}$

(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= $50\ \mu\text{m}$

(図 3) に挿入

(図 4) 三次元立体培養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  $\text{TNF-}\alpha$  の mRNA の発現量の変化. mean $\pm$ SD, n=3,  $P<0.01$  (\*)

1. 1/3 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

2. 1/4 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

### 3. 1/3 圧縮時と 1/4 圧縮時の比較

(図 4) に挿入

(図 5) 三次元立体培養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 $\pm$ SD, n=3, P<0.01 (\*)

1. 1/3 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

2. 1/4 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

### 3. 1/3 圧縮時と 1/4 圧縮時の比較

(図 5) に挿入

(図 6) 三次元立体培養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-1 $\beta$  の mRNA の発現量の変化. mean $\pm$ SD, n=3, P<0.01 (\*)

1. 1/3 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

2. 1/4 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

### 3. 1/3 圧縮時と 1/4 圧縮時の比較

(図 6) に挿入

(図 7) 三次元立体培養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 $\pm$ SD, n=3, P<0.01 (\*)

1. 1/3 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

2. 1/4 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

3. 1/3 圧縮時と 1/4 圧縮時の比較 (図 7) に挿入

(図 8) 三次元立体培養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 $\pm$ SD, n=3, P<0.01 (\*)

1. 1/3 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

2. 1/4 圧縮時, 0 分をコントロールとした.

3. 1/3 圧縮時と 1/4 圧縮時の比較 (図 8) に挿入

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

Meri Haniu Takenori Kim Yoshiaki Satho Junichiro Ida

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.

## 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 the 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 O (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  $\text{TNF-}\alpha$ , FGF-2, IL-1  $\beta$  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 without 24 hours after the starts 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 was pushed by a distance of a quarter of the width of the periodontal ligament.

Key Word: three-dimensional culture of periodontal ligament fibroblasts,

Mechanical stress, cytokines