

平成21年6月12日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18791601

研究課題名 (和文) メカニカルストレスに対する歯根膜由来細胞の免疫学的検討

研究課題名 (英文) Mechanical stress induces cytokines production in human periodontal ligament cells

研究代表者

山本 俊郎 (YAMAMOTO TOSHIRO)

京都府公立学校法人京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40347472

研究成果の概要：歯根膜を構成するヒト歯根膜由来細胞（以下 hPDL 細胞）に対し、メカニカルストレスを負荷、サイトカイン産生を検討した。hPDL 細胞はメカニカルストレスの強さと時間の影響を受け、生理的または非生理的なメカニカルストレスに対し炎症性サイトカイン産生能を有し、歯周病や外傷性咬合に代表される歯根膜の炎症に関与すると考えられた。さらに、その局所炎症には病原性細菌の影響が強く、メカニカルストレスはこれを助長する因子と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	800,000	0	800,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	210,000	2,410,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系

キーワード：メカニカルストレス 歯根膜由来細胞 免疫学的検討

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医学の分野において歯周組織の再生には歯肉、歯槽骨、セメント質とともに歯周組織を構成している歯根膜の再生が不可欠であるとされており、その細胞レベルでの種々の研究が行われている。歯根膜は、歯根を取り囲む厚さ約 200 μm の線維

性結合組織で、歯槽骨とセメント質の間に位置し、歯槽骨内に歯牙を固定している。そして、咬合力や外力などの力学的負荷（以下メカニカルストレス）に対して、緩圧機能を有するとともに、自身の恒常性を維持している。この歯根膜を構成する歯根膜由

来細胞（以下 hPDL 細胞）に対してメカニカルストレスは、局所の免疫応答を引き起こすとともに、炎症反応や骨吸収の一因であると考えられている。そして近年、メカニカルストレスを与えた際、hPDL 細胞が発現する遺伝子に関する報告もみられる。しかしながら hPDL 細胞は、異なる数種の細胞によって構成される組織で、均一な細胞集団を調整することが困難である。また、この細胞を同定する特異的マーカーや歯根膜の株細胞が存在しないとされており、その機能を細胞レベルで解析することは極めて難しい組織である。

さらには、従来から hPDL 細胞とメカニカルストレスに関する報告は多く存在するが、生体の咬合圧に近似したメカニカルストレスを負荷した報告は見られないのが現状である。また静水圧、圧迫力、張力などのメカニカルストレスのうち静水圧は、海綿骨の骨芽細胞や破骨細胞に影響を与えたり、その負荷条件で hPDL 細胞由来のプロスタグランジン E やサイクリックアデノシン 1 リン酸産生を左右するとの報告がある。このため、静水圧に対する hPDL 細胞由来のサイトカインに関して検討を加えることは、hPDL 細胞の機能を解析するだけでなく、歯根膜と接している歯槽骨への影響を検討するうえで重要であると考えられる。これまでに我々は、静水圧に対する軟骨細胞や骨芽細胞への影響に関して、サイトカイン発現を中心に検討を加えている。

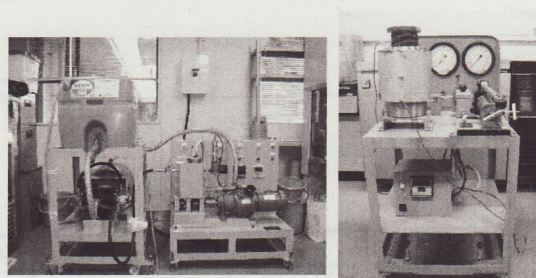
そこで、歯周組織を構成する歯根膜組織である hPDL 細胞に対し、静水圧を用いたメカニカルストレスを負荷する実験系を用いて、hPDL 細胞のサイトカイン産生に関して免疫学的検討を加えた。

2. 研究の目的

メカニカルストレスに対する hPDL 細胞のサイトカイン産生に関する検討。

3. 研究の方法

hPDL 細胞は第 3 大臼歯の歯根膜中央 1/3 付近から採取、10%FBSMEM で 37°C、5% CO₂ 条件下に 3-4 代の初代培養を実施した。そして hPDL 細胞を 1×10^5 cells/well に調整、コンフルエントに達したのち、静水圧負荷装置を利用して、以下の (1) ~ (3) に示す静水圧を負荷した (図 1)。



(1) 静水圧負荷 (1MPa・10 分間, 1MPa・60 分間, 6MPa・60 分間)

(2) 静水圧負荷 (6MPa・10 分間, 6MPa・60 分間, 10MPa・10 分間, 10MPa・60 分間, 50MPa・10 分間, 50MPa・60 分間)

(3) 単独群: 静水圧負荷 (1MPa・60 分間, 6MPa・60 分間, 10MPa・60 分間) 後、24 時間培養。

複合群: 静水圧負荷 (1MPa・60 分間, 6MPa・60 分間, 10MPa・60 分間) 後+歯周病原菌 *P. gingivalis* (1×10^7 CFU/ml) の 24 時間刺激。

(4) 単独群: 静水圧負荷 (1MPa・10 分間, 6MPa・10 分間) 後、24 時間培養。

複合群: 静水圧負荷 (1MPa・10 分間, 6MPa・10 分間) 後+ β -クリプトキサンチン (β -cry: 1×10^{-7} mol) の 24 時間刺激。

その後、炎症性サイトカインである IL (インターロイキン) -1 β 、IL-6、IL-8、TNF (腫瘍壊死因子) - α に関して定性分析の RT-PCR

法と定量分析の ELISA 法で検討を加えるとともに、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞形態の観察を行った。

4. 研究成果

(1) hPDL 細胞は、1MPa・10 分間でメカニカルストレスを負荷後、IL-6 mRNA が発現、さらに 1MPa・60 分間と 6MPa・60 分間で負荷後、IL-6、IL-8、TNF- α mRNA が発現誘導された。炎症性サイトカイン産生量は、負荷後に IL-6 と TNF- α 産生を認めたが、IL-1 β と IL-8 産生をほとんど認めなかった (図 2)。なお、メカニカルストレス負荷後、hPDL 細胞は形態学的な変化をほとんど認めなかった。

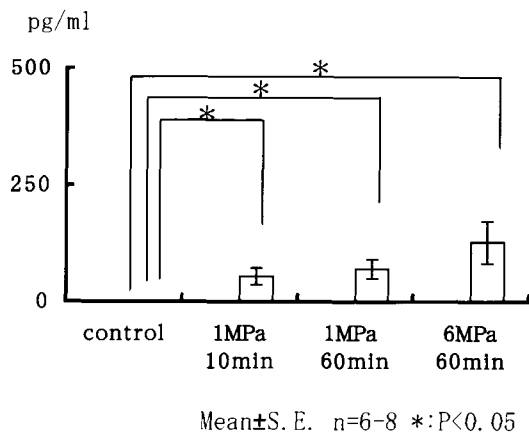


図 2 生理的なメカニカルストレスに対する hPDL 細胞の IL-6 産生量

以上から、hPDL 細胞は、メカニカルストレスに対しサイトカイン産生能を有することが判明した。そして、メカニカルストレスの強さと時間の影響を受けると考えられた。また、生理的環境に近似したメカニカルストレス (6MPa) においても、歯周組織である歯根膜では局所の免疫応答を引き起し、炎症反応の一因となると考えられた。

(2) hPDL 細胞は、6MPa・10 分間負荷後、IL-6、IL-8、TNF- α mRNA が発現、さらにメカニカルストレスの強さと時間を増すと、全ての炎症性サイトカイン mRNA が発現誘導された。炎症性サイトカイン産生量は、負荷後に IL-6、IL-8 産生を認めたが、IL-1 β 、TNF- α 産生をほとんど認めなかった。なお図 3 のように、サイトカイン産生量はメカニカルストレスの強さの方が時間より影響を受けた。

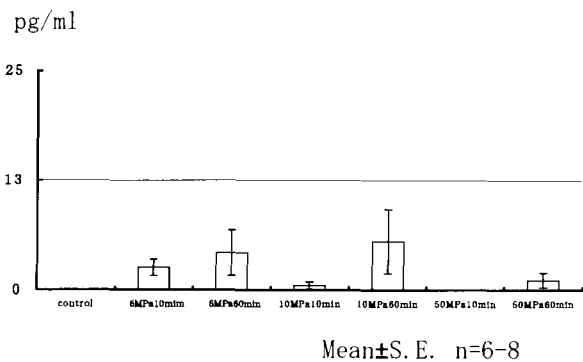
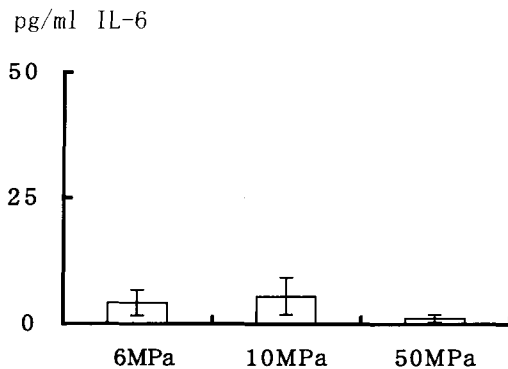


図 3 メカニカルストレスの強さと時間に対する IL-6 産生量の変化

次に、メカニカルストレスの 60 分間負荷においてサイトカイン産生量は、6MPa 負荷後と比べ 10MPa 負荷後に IL-6、IL-8 産生量の増加を示し、特に IL-8 は有意な増加を認めた。さらに 50MPa 負荷後には、6MPa 負荷後と比べ IL-6、IL-8 産生量の減少を示し、特に IL-8 は有意な減少を認めた (図 4)。



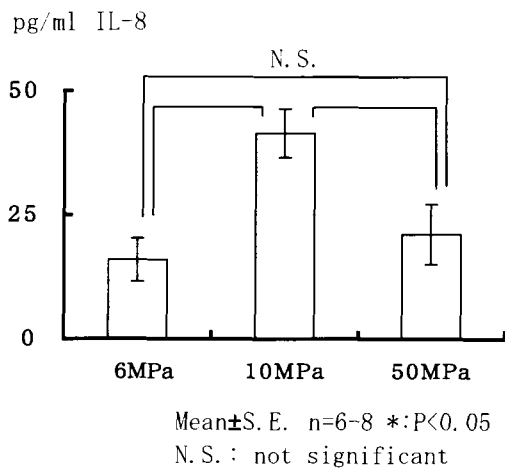


図4 非生理的メカニカルストレスに対するhPDL細胞のIL-6とIL-8産生量

すなわち、hPDL細胞は、生理的強度の約2倍(10MPa)のメカニカルストレスで、生理的負荷に比べ炎症性サイトカイン産生が増加した。なお、非生理的負荷(50MPa)では、逆にサイトカイン産生が抑制された。またhPDL細胞は、6・10MPa負荷後に形態学的変化を認めず、50MPa負荷後ではほぼ紡錘状の形態を有したが、一部細胞が培養皿から剥離した。

以上から、外傷性咬合に代表される歯周組織への過大なメカニカルストレスで生じる局所炎症には、歯根膜由来の炎症性サイトカインが関与すると考えられた。

(3) 単独群はIL-6、IL-8、TNF- α mRNAが発現、複合群はすべての炎症性サイトカイン mRNAを発現誘導した。炎症性サイトカイン産生量は、両群ともにIL-6とIL-8産生を認め、メカニカルストレスの強さが強くなるにつれ増加したが、IL-1 β とTNF- α 産生を認めなかった。また、複合群の方が単独群に比べ、IL-6とIL-8産生量の著しい増加を認めた(図5)。なお、両群ともにhPDL細胞は、形態学的な変化を認めなかった。

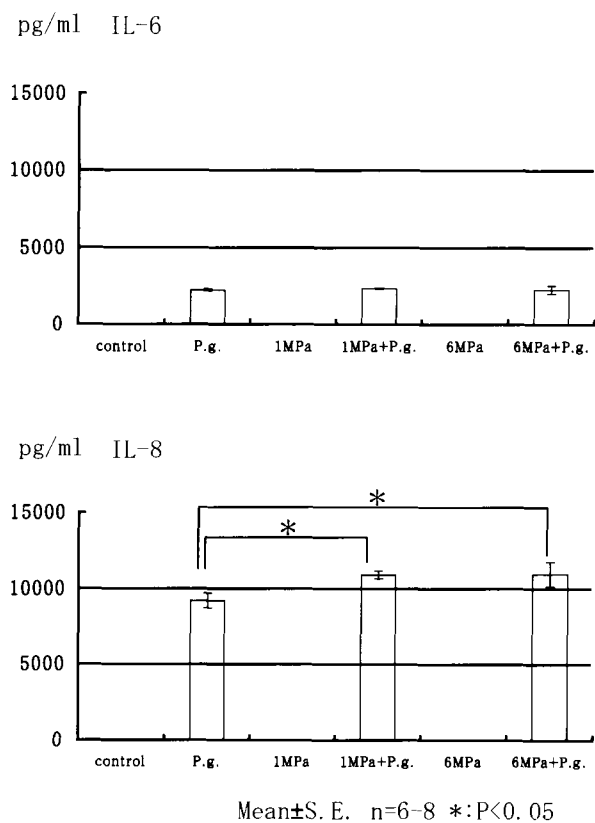


図5 メカニカルストレスと*P. gingivalis*に対するhPDL細胞のIL-6とIL-8産生量

以上から、hPDL細胞の炎症性サイトカイン産生は、メカニカルストレスの強さの影響を受けるが、それよりも歯周病原菌(*P. gingivalis*)の影響を強く受けた。すなわち、歯根膜の局所炎症には病原性因子である歯周病原菌の影響が強く、メカニカルストレスはこれを助長する因子と考えられた。

(4) 両群ともに、IL-6、IL-8、TNF- α mRNAが発現した。炎症性サイトカイン産生量について、複合群は単独群と比べてIL-8産生量の有意な減少を認めが(図6)、IL-1 β とTNF- α 産生は認めなかった。なお、両群ともにhPDL細胞は、形態学的な変化を認めなかった。

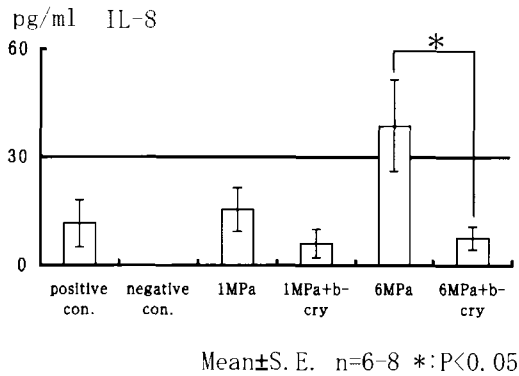


図6 β -cry に対する hPDL 細胞の IL-8 産生量

以上から、抗がん作用を有し温州ミカンに多く含まれる β -cry は、hPDL 細胞のメカニカルストレスに対するサイトカイン産生を抑制し、抗炎症作用を有する可能性が考えられた。

本研究から、歯根膜は生理的または非生理的なメカニカルストレスに対してサイトカイン産生能を有し、局所炎症に関与することが判明した。そこで今後は、同じ歯周組織を構成する歯槽骨に対するメカニカルストレスの影響に関して検討を加える予定である。これにより、歯周病や外傷性咬合をはじめとした口腔領域の炎症性疾患の病態解明（炎症と骨吸収）と治療法の確立が可能となると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①山本俊郎 (7名、1番目)

メカニカルストレスと歯周病原菌が歯根膜のサイトカイン産生に与える影響

日本歯科保存学雑誌 52, 176-183, 2009. (査読あり)

②Yamamoto T (10名、1番目)

Hydrostatic pressure induces cytokines production in human periodontal ligament cells

Oral Science international 3, 64-71, 2006. (査読あり)

[学会発表] (計7件)

①山本俊郎

歯根膜由来細胞を用いたメカニカルストレスに対する *Porphyromonas gingivalis* の影響

第129回日本歯科保存学会2008年度秋季大会 2008年11月6日 富山

②山本俊郎

静水圧負荷装置を用いた過度のメカニカルストレスに対するヒト歯根膜由来細胞のサイトカイン産生能

第52回秋季日本歯周病学会学術大会 2008年10月19日 三重

③山本俊郎

静水圧負荷装置を用いたメカニカルストレスに対するヒト歯根膜由来細胞の炎症性サイトカイン産生能

第51回春季日本歯周病学会学術大会 2008年4月25日 埼玉

④山本俊郎

歯根膜線維の機能についての研究

第62回日本口腔科学会学術集会 2008年4月17日 福岡

⑤山本俊郎

過度のメカニカルストレスに対する歯根膜由来細胞の免疫学的検討

第127回日本歯科保存学会2007年度秋季大会 2007年11月9日 岡山

⑥山本俊郎

メカニカルストレスに対する歯根膜由来細胞の免疫学的検討

第28回日本炎症再生医学会

2007年8月2日東京

⑦山本俊郎

メカニカルストレスに対する歯根膜由来細胞のサイトカイン産生

第126回日本歯科保存学会2007年度
春季大会 2007年6月8日 埼玉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 俊郎 (YAMAMOTO TOSHIRO)

京都府公立学校法人京都府立医科大学・
医学研究科・助教

研究者番号：40347472