

平成 21年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度

課題番号：19592329

研究課題名（和文） 圧縮ストレスによる顎関節滑膜の応答と顎関節症発症メカニズムの解析

研究課題名（英文） Investigation of the relationship between Temporomandibular Joint Disease and compressive loading on human synovium.

研究代表者

覚道 健治（KAKUDO KENJI）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30131379

研究成果の概要：

まず，*in vitro*の実験として，滑膜由来の培養細胞に対し生体におけるブラキシズムに類似したメカニカルストレスを与え，解析できる実験システムを開発した．それは，ラットの顎関節滑膜から初代培養により得た細胞を単層培養にて増殖させ，コラーゲンスキャホールドの中にコラーゲンを併用して三次元培養組織を作製した．次に，顎関節解放手術の際に得られた滑膜組織からヒト滑膜由来培養細胞で同様に三次元培養組織を作製し，独自に開発した繰り返し圧縮刺激装置を用いて，生体におけるブラキシズムに類似した圧縮負荷ストレスを与えた．5日間負荷刺激後，三次元培養組織を回収し，細胞動態およびアポトーシス誘導を組織学的観察，炎症性サイトカインの遺伝子発現をRT-PCR法，タンパク発現をウェスタンブロッティング，ザイモグラフィ等の手法を用いて検索した．結果，過剰負荷想定での圧縮刺激により，MMP-1，MMP-3，IL-6，IL-8などの炎症性サイトカインのmRNA発現，タンパク発現の上昇が認められた．さらに，刺激直後，1時間後，6時間後の遺伝子発現の時間推移を調べた．その結果，サイトカインの種類により圧縮負荷刺激後の発現パターンが異なることが明らかになった．

*in vivo*の実験として，ボランティアによる正常者の噛みしめ時の脳内賦活部位の解析をfunctional MRI（f-MRI）を使用して行った．その結果，噛みしめ時に賦活化される部位を特定することができた．さらに，噛みしめ時の不快症状が脳のどの部位で感知されているかどうかを調べるため，噛みしめのタスクに加え，浸潤麻酔および伝達麻酔を行い，歯根膜からの感覚を遮断し，その上で噛みしめ時のf-MRIを撮影，解析を行った．結果，片側の感覚遮断により，反対側の一次体性感覚野および運動野に賦活化が認められた．また両側の感覚遮断を行うことにより，脳の両側の体性感覚野および運動野の賦活領域の拡大がみられた．このことにより噛みしめ時の歯根膜からの感覚刺激が賦活化する脳の領域が明らかになった．

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1)顎関節 (2)滑膜細胞 (3)三次元培養 (4)繰り返し圧縮刺激 (5)ブラキシズム (6)炎症性サイトカイン (7) f-MRI (8) 脳内賦活部位

1. 研究開始当初の背景

(1) 痛みを伴う顎関節症は、本邦において症例数は増加の一途をたどり、国民の関心も高くなってきている。その病因のひとつに睡眠時のブラキシズムが臨床的に言われているが、その発症メカニズムや病態については、不明な点が多く、治療においては経験則によるものが一般的である。一つに、実験方法が確立されていない点がある。従来の培養滑膜細胞を用いた実験では、単層培養法を用いた研究しか報告がなく、メカニカルストレスの負荷刺激についても、引っ張り試験法や長時間圧縮法などを用いており、生体における顎関節への過剰負荷であるブラキシズムとはかけ離れたモデル実験しか報告はない。われわれは、顎関節内の炎症にもっとも寄与する滑膜から初代培養して滑膜由来培養細胞を得て、三次元培養し、さまざまな条件で圧縮ストレスを与えることができる圧縮負荷刺激装置を用いた生体に近似した条件での実験モデルを作製し、*in vitro* で圧縮負荷による炎症性サイトカインの発現を検索することで、圧縮負荷と顎関節症との因果関係が明らかになると考えた。さらに、どのパターンのメカニカルストレスの障害性が最も高いかを解明できれば、現在経験的に行われている顎関節症に対するスプリント治療の改善にもつながり、また、炎症性変化を持つ滑膜細胞に対して効果的な薬物の発見も期待できる。本研究成果が報告されれば、*in vitro* での科学的根拠に基づいたブラキシズムと滑膜炎との関係を明らかにすることが可能となり、従来推測でしかすぎなかった滑膜への圧縮負荷刺激の臨床的意義が明らかになると信じる。

(2) 顎関節症におけるメカニカルストレスは、睡眠時のブラキシズムが主因といわれている。夜間睡眠時のブラキシズムでは、意識下と比較すると咬合力が増大し、結果として顎関節に過剰負荷が加わることにより関節内部の組織が損傷をうけるものと推察される。こういった過剰圧縮負荷と中枢機能との関係の解明を行うにあたり、非侵襲的な方法として磁気共鳴機能画像法 (f-MRI: Functional Magnetic Resonance Imaging) を使用する。これにより、非侵襲的に脳内の神経活動が確認できるのみならず、従来顎関節症やブラキシズムに関する咀嚼機能に関する研究が、咀嚼筋活動量や顎運動軌跡をパラメータと

していたのに対して、より高次である脳内の機能変化に着目して f-MRI を使用することに本研究の新規性がある。*In vitro* データと臨床データを融合させたこのような研究の報告はない。

2. 研究の目的

(1) ヒト顎関節滑膜由来初代培養して得たヒト顎関節滑膜由来細胞を単層培養し、三次元培養組織を作製し、間歇的な各種圧縮負荷ストレスを付与できる新しい圧縮負荷装置によりブラキシズムを想定した間歇的圧縮負荷ストレスを付与し、各条件における炎症性変化を検索する。

(2) 健常ボランティアに対し、生理的咬合および噛みしめ時の変化を f-MRI で解析し、噛みしめ負荷による脳内の賦活部位を検索する。

以上のことから、滑膜の炎症性変化を引き起こす間歇的圧縮メカニカルストレスの滑膜への圧縮パターンについて解明し、異常な圧縮メカニカルストレスであるブラキシズムと顎関節症との関係について明らかにし、顎関節症発症のメカニズムを解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 顎関節開放術を予定している患者より、インフォームドコンセントを得て、手術の際に採取された滑膜組織を細切して、0.2% コラゲナーゼ消化を行い、10% FBS 含有 DMEM 培地内で初代培養し、単層培養にて増殖させる。継代を経て、高研社製アテロコラーゲンスポンジ (直径 9mm × 4mm) に、コラーゲンゲルに浮遊させた細胞浮遊液を遠心力にて填入し、37°C インキュベーター内でゲル化して三次元培養組織を作製した。この際、最も効率よく細胞を播種できる方法を HE 染色による組織観察で検索し、三次元培養組織内でのアポトーシスの有無を TUNEL 染色にて検索、また細胞とスキャホールドとの接着状態やゲル内での形態変化について透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

(2) 5 日間静置培養した後、コンピューター制御による繰り返し圧縮刺激装置を用いて、インキュベーター内で 1 日 1 時間、0.5Hz の繰り返し圧縮負荷刺激を与えた。この繰り返し圧縮負荷刺激装置では、ピストン上部の錘の重さを変えることで任意の荷重を与えるこ

とができる。今回、生理的負荷刺激として 5 kPa と過剰負荷刺激として 20 kPa との条件で負荷刺激実験を行なった。過剰負荷刺激は、先行研究により求めた三次元培養組織の変形率が 10% 以上のものとし、また、噛みしめ時の顎関節内圧と同等の 20 kPa を選択した。刺激後三次元培養組織内の細胞の破壊や移動を調べるために、HE 染色にて組織学的観察を行い、TUNEL 染色にてアポトーシスの有無を検索した。刺激後の mRNA を抽出し、RT-PCR にて炎症性サイトカインである MMP-1, MMP-3, ADAMTS-4, ADAMTS-5, IL-8 について遺伝子発現を調べ、得られた画像を半定量解析した。

(2) 噛みしめ時の頭部の動揺を規制することにより測定精度を向上させるため、MRI 頭部固定装置の改良を行い、プロトタイプを作製した。つまり、タッピングおよび噛みしめ動作を行った際に体動の影響を受けない条件を検索した。得られた条件で、利き手が右の正常ボランティア 51 名に対し、安静時と噛みしめ時で f-MRI を撮影し、クレンチング時の脳の賦活領域を画像解析した。さらに、その噛みしめによる賦活領域と範囲の末梢における刺激が、歯根膜感覚によるものかどうかを調べるため、正常ボランティア 6 名被験者とし、通常噛みしめ時に加えて、左側上下顎局所麻酔時、左右上下顎局所麻酔を行い、末梢からの感覚を遮断した状態での噛みしめ時の撮影を行い、解析して脳の賦活領域を検出した。さらに、集団解析を行って各条件における共通の脳賦活領域を調べた。

4. 研究成果

(1) 単層培養したヒト顎関節滑膜由来細胞は増殖能が高く、6 代継代後は紡錘形細胞が優勢になっていた。三次元培養組織の HE 染色では、播種された細胞は均一に三次元培養中に分布しており、負荷刺激後も分布状態に変化は認められなかった。無負荷群、負荷群でアポトーシス細胞率は有意差が認められなかった。遺伝子発現は、過剰負荷刺激群では MMP-1 発現が高い傾向にあった (図 1 a)。MMP-2, MMP-3 発現は生理学的負荷および無負荷群と比較し、有意に高い値を示した (図 1 b, c)。負荷刺激群の TIMP-1 発現は無負荷群と比較し高い値を示した (図 1 d)。ADAMTS-4, ADAMTS-5 は過剰負荷群で発現が認められた (図 1 e, f)。IL-8 は負荷群で有意に高い発現を示した (図 1 g)。免疫染色、ウェスタンブロットでは MMP-1, MMP-3 が過剰負荷群で染色性が高かった。ザ

イモグラフィでは MMP-2 の発現が過剰負荷群で高かった。

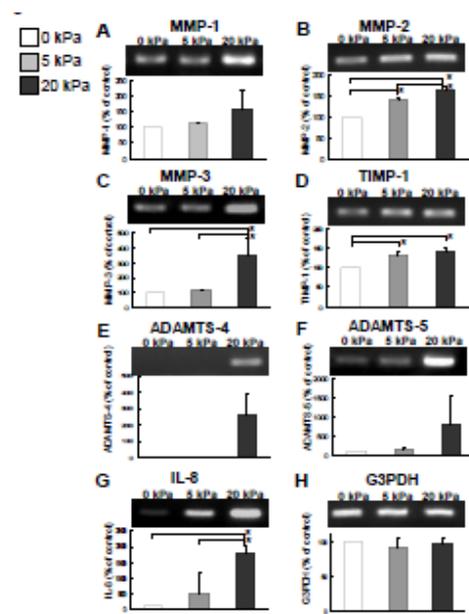


図 1.

(2) 体動による影響を防ぐため、1pixel 異常の動きがみられるデータを除外して解析をおこなった。51 人中 24 人で体動なく 30% の噛みしめ力でのクレンチング時の f-MRI 撮像が可能であった。タッピングと 30% 噛みしめ力のクレンチング時では脳賦活信号濃度や pixel 数の平均値はクレンチング刺激で有意に高い値を示した (図 2)。



図 2.

6 名の被験者とも体動による撮影不能はなかった。男性では、通常噛みしめ時と比較し、左側感覚遮断時には、両側体性感覚連合野の信号上昇を認め、両側感覚遮断時には、左側感覚遮断と比較し、同部位の信号減少を認めた。女性では、左側及び両側感覚遮断で両側一次体性感覚野、一次運動野の信号上昇を認め、両側感覚遮断で両側前頭連合野の信号上昇を認めた (図 3)。

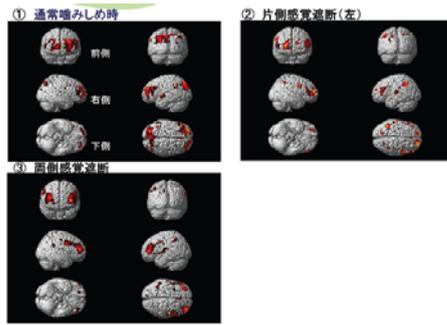


図 3

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5件)

① Syunsuke Baba, Naoyuki Matsumoto, Kenji Kakudo, Yoritaka Yotusi, Kimishige Shimizutani, Masahiro Tanaka, Mitsuo Iwata, Korenori Arai, Yozo Hikida
Effects of Biting Force on Activation of the Brain
The Journal of the Japan Association of Cranio-Manidibular Orthopedics, 20, 59-63, 2007. 査読有

② Syunsuke Baba, Naoyuki Matsumoto, Kenji Kakudo, Yoritaka Yotusi, Kimishige Shimizutani, Masahiro Tanaka, Junko Tanaka, Korenori Arai, Tetsuji Kusumoto
Investigation of Analysis Method of Mastication-Activated Brain Area-Application of Functional MRI-The Journal of the Japan Association of Cranio-Manidibular Orthopedics, 20, 53-58, 2007. 査読有

③ 室井悠里, 覚道健治, 中田 研
ヒト顎関節滑膜細胞の圧縮負荷に対する応答
歯科臨床研究, 5 (1), 93-100, 2008. 査読無

④ Yuri Muroi, Kenji Kakudo, and Ken Nakata.
Effects of Compressive Loading on Human Synovium-derived Cells
Journal of Dental Research, 86 (8), 786-791, 2007. 査読有

⑤ Yuri Muroi and Kenji Kakudo
Long-term effects of cyclic compressive

loading on three-dimensionally cultured human synovium-derived cells.
Journal of Osaka Dental University, 41 (1), 59-66, 2007. 査読有

[学会発表] (計1件)

① 室井 悠里, 鈴木 智之, 岩橋 武彦, 中村 憲正, 覚道 健治, 吉川 秀樹, 中田 研
ヒト滑膜由来細胞を用いた三次元培養組織の鉛直繰返し圧縮負荷による影響—長期的観察—
第39回日本結合組織学術大会・第54回マトリックス研究会大会, H19年5月9日, 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

覚道 健治 (KAKUDO KENJI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 30131379

(2) 研究分担者

清水谷 公成 (SHIMIZUTANI KIMISHIGE)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80121820

四井 資隆 (YOTSUI YORITAKA)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 20167026

(3) 連携研究者

なし