

平成 21 年 12 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791578

研究課題名（和文）歯周組織における加齢メカニズムの解明と抗加齢医療への試み

研究課題名（英文）Elucidation of an aging mechanism and an anti-aging treatment in periodontal tissue

研究代表者

田中 伸明（TANAKA NOBUAKI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90397969

研究成果の概要（和文）：bFGF および分子量の異なるヒアルロン酸(HA)が、宿主年齢の歯肉組織に対する影響を検討した。その結果、bFGF は細胞密度により作用が異なり、創傷治癒過程における増殖期では細胞増殖能および基質産生能を亢進し、再構築期ではアポトーシス誘導能を亢進することにより組織の再生修復を促進した。また、HAoligo もアポトーシス誘導能を有することが明らかとなり、bFGF と併用することにより相加的作用が認められた。これらの作用は年齢の若い方がより顕著であった。

研究成果の概要（英文）：We studied the effect of bFGF and different HA molecular size in GF isolated from the different host ages. The bFGF showed different action by cell density. The ability of proliferation and matrix-forming were enhanced in proliferative phase during the wound healing process, and the induction of apoptosis was also enhanced in remodeling phase. These effects were more marked in younger host.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：歯肉線維芽細胞、宿主年齢、ヒアルロン酸、b-FGF、感受性

1. 研究開始当初の背景

加齢は様々な病態と関連しており、口腔内を例にしても、成人以降歯周病の罹患率は高まり、その治癒機転も若年者に比較して不良である。加齢による構造的な変化は、各組織を構成している細胞の代謝活性の低下によるものと考えられるが、加齢に伴う組織の細胞代謝の変化については、未だ不明の点が多く

残されている。歯周組織を構成するヒアルロン酸は加齢とともに低分子化されることが知られている。一方で、bFGF は、近年創傷治癒や組織修復に対して効果のあることが確認され、その有効性が実証されつつある。本研究では、加齢に伴う歯周組織のヒアルロン酸の変化とそれに対するbFGFの効果の検討を行った。

2. 研究の目的

加齢を対象とした研究方法はさまざまであるが、細胞レベルでの細胞代謝とヒアルロン酸を中心とする細胞外マトリックス代謝に着目した研究は見当たらない。

本研究では、加齢による影響が出やすいと考えられる歯肉細胞を対象として、年齢の違いによるヒアルロン酸を主とする細胞外マトリックスの感受性の影響を明らかにする。

具体的には、若年者由来および高齢者由来の歯肉細胞を用いて、その異化反応に対する低分子量ヒアルロン酸の影響を明らかにする。さらに、各年齢のドナーから抽出された細胞のヒアルロン酸代謝についても詳細に検討し、細胞レベルでの加齢の影響とこれに対する予防法を探索することを目的とする。

本研究では、歯肉細胞をモデルとして主要な細胞外マトリックスであるヒアルロン酸の低分子化に着目し、ヒアルロン酸を中心とする細胞外マトリックス代謝-細胞代謝の相互作用と加齢の関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

① 宿主年齢の異なる歯肉由来線維芽細胞における細胞増殖能および基質産生能の検討…若年者または成人の小白歯部口蓋より歯肉組織を無菌的に採取、メスにて細切後 typeI コラーゲンゲル上に静置し、outgrowth 法により細胞を増殖させた。

若年者および成人から採取した線維芽細胞の細胞増殖能を、MTT assay 法にて比較検討した。

同様に、各々の培養上清中のコラーゲン量を Sircol Soluble Collagen Assay Kit を用いて測定した。

② 宿主年齢の異なる歯肉由来線維芽細胞の bFGF および分子量の異なる HA に対する感受性の検討…若年者または成人の線維芽細胞を播種し、培養開始から 2 日ごとに bFGF を培養液中に 12 時間添加し、細胞増殖能の検討を行った。

また、コンフルエント到達時後に bFGF を添加しカスパーゼ活性の測定を行った。

一方で HA の分子量がアポトーシス誘導能に及ぼす影響を検討するために、コンフルエント到達時に低分子の HA である HAoligo、高分子量の HA (分子量:200 万)、HA 分解酵素による処理を 12 時間行い、カスパーゼ活性を測定した。

次に、各種 HA 処置と bFGF 処置がアポトーシス誘導能に与える相対効果について検討を行うため、コンフルエント到達後に、HAoligo、高分子量 HA、HA 分解酵素で 12 時間の処置後 PBS にて十分な洗浄をし、その後、bFGF を添加しカスパーゼ活性を測定した。

③ 年齢が異なるラット口蓋創傷モデルの作製と bFGF 局所注入の影響…歯肉の損傷に対する年齢の違いと bFGF 投与の影響を検討するために、ラット口蓋に創傷部を作製した。実験には成長期である 6 週齢および大人である 12 週齢のラットを用いた。

ネンプターによる全身麻酔とキシロカインによる局所麻酔を行い、口蓋部に骨膜に達する切開を加え、粘膜骨膜を除去して骨を露出させた。

さらに、露出した骨面を小綿球にて数回擦過し、残存する骨膜を除去し、止血を確認した。創傷範囲は、どの個体を可及的に同じ大きさにした。

手術 5 日後に、bFGF 溶液または PBS 溶液を欠損部の左右 2 カ所の口蓋粘膜下に注入した。術後 10 日目後に還流固定を行った後、口蓋軟組織を含む組織片を作成し、通常に従いパラフィンに包埋した。口蓋部前頭断連続切片を作成し、ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit を用いて染色を施し、光学顕微鏡下でアポトーシス活性について組織的観察を行った。

4. 研究成果

① 若年者および成人の歯肉線維芽細胞を播種後、1, 3, 5 日後の細胞形態の経日的な変化を光学顕微鏡により観察、比較した。

培養開始 1 日目では、細胞がディッシュ底面に接着したばかりで細胞形態にほとんど変化が認められなかったが、3 日目では成人よりも若年者の歯肉細胞の方が増殖能の促進している像が観察され、5 日目では若年者の方が成人に比べ、コンフルエントの状態に近かった。

また、1, 3, 5 日目後の増殖能を MTT 法により定量的に検討したところ、いずれの日数においても若年者の方が有意に高い増殖能を示した。

次に、同様に 1, 3, 5 日目後の培養上清中のコラーゲン量を測定したところ、若年者の方が成人に比較していずれの日数においても有意に高い値を示した。

② 若年者または成人由来線維芽細胞の増殖能に対する bFGF の添加の影響を検討した。bFGF 非添加の増殖能は、5, 7 日目において若年者の方が成人と比較して有意に高い値を示した。

bFGF を添加することにより、成人の増殖能は、若年者の細胞と同程度にまで亢進し、両群間の差は認められなくなった。

また、若年者および成人の両群におけるカスパーゼ 3 活性に対する bFGF 添加の影響を検討したところ、コンフルエント時に両群共に bFGF 添加によりカスパーゼ 3 活性は濃度依存的に有意に亢進した。

年齢間の比較では、bFGF 添加により、若年

者の方がカスパーゼ3活性の亢進が有意に高かった。

次に、HAの分子量が線維芽細胞のアポトーシス3活性に及ぼす影響を検討した。HAoligoを添加することにより、カスパーゼ3活性は濃度依存的に有意に亢進した。また、いずれの用量においても成人群と比較し若年者において有意に大きい値が認められた。

なお、HAase、高分子量HA添加によるカスパーゼ3活性の変化は認められなかった。

これらのことより、HAoligoによる線維芽細胞のアポトーシス誘導能は若年であるほど大きいことが明らかとなった。

次に、bFGFによるアポトーシス誘導に対するHAoligoの相加的効果について検討を行った。若年者および成人の線維芽細胞においてHAoligo前処置後にbFGFを添加することにより、カスパーゼ3活性の濃度依存的な有意の亢進が認められた。

なお、高分子量HAおよびHAase前処置による影響は認められなかった。

このことから、HAoligo前処置を行うことにより、bFGFのアポトーシス誘導能に対し相加的な効果を示すことが明らかとなった。

③ ラット口蓋創傷部に対するbFGF局所注入の影響を検討した。

術後10日目のラット口蓋写真像において、創傷形成部周囲にbFGFを注入した結果、6週齢、12週齢ラットのいずれにおいても創傷部の早期縮小が認められた。

また、幼弱ラットと成熟ラット間においてbFGFの創傷治癒効果の差が認められた。

次に、bFGF局所注入によるアポトーシス活性について検討を行った。6週齢ラットへのbFGFの局所注入により、創傷部位周辺には多数の細胞核の染色が観察され、アポトーシスの亢進が明らかとなった。

一方、12週齢ラットにおいては、アポトーシスの亢進はほとんど観察されなかった。

このことから、bFGFは幼弱ラットにおけるアポトーシスを亢進させることが明らかとなった。

また、成熟ラットと比較し、幼弱ラットにおいてアポトーシス活性が顕著に高いことが示された。

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8件)

1. Lin YY, Tanaka N, Ohkuma S, Iwabuchi Y, Tanne Y, Kamiya T, Kunimatsu R, Huang YC, Yoshioka M, Mitsuyoshi T, Tanimoto K, Tanaka E, Tanne K.

Applying an excessive mechanical stress alters the effect of subchondral osteoblasts on chondrocytes in a co-culture system. Eur J Oral Sci. 2010 in Press. (査読有)

2. Tanimoto K, Yanagida T, Tanne Y, Kamiya T, Huang YC, Mitsuyoshi T, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K.

Modulation of Hyaluronan Fragmentation by Interleukin-1 Beta in Synovial Membrane Cells. Ann Biomed Eng. Jan 23, 2010. (査読有)

3. Tanimoto K, Kitamura R, Tanne Y, Kamiya T, Kunimatsu R, Yoshioka M, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K.

Modulation of hyaluronan catabolism in chondrocytes by mechanical stimuli. J Biomed Mater Res A. Jun 30, 2009. (査読有)

4. Nakatani Y, Tanimoto K, Tanaka N, Tanne Y, Kamiya T, Kunimatsu R, Tanaka E, Tanne K.

Effects of hyaluronan oligosaccharide on the expression of MMP-1 in periodontal ligament cells. Arch Oral Biol. 54(8):757-763, 2009. (査読有)

5. Lin YY, Tanaka N, Ohkuma S, Kamiya T, Kunimatsu R, Huang YC, Yoshioka M, Mitsuyoshi T, Tanne Y, Tanimoto K, Tanaka E, Tanne K.

The mandibular cartilage metabolism is altered by damaged subchondral bone from traumatic impact loading. Ann Biomed Eng. 37(7):1358-1367, 2009. (査読有)

6. Kamiya T, Tanimoto K, Tanne Y, Lin YY, Kunimatsu R, Yoshioka M, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K.

Effects of mechanical stimuli on the synthesis of superficial zone protein in chondrocytes. J Biomed Mater Res A. Mar 11, 2009. (査読有)

7. Kitamura R, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Huang YC, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K.

Effects of mechanical load on the expression and activity of hyaluronidase in cultured synovial membrane cells. J Biomed Mater Res A. Jan 22, 2009. (査読有)

8. Michida M, Tanaka N, Tanimoto K, Tanne K.

An Adolescent Case of Skeletal Maxillary Protrusion with Osteoarthritis of the Temporomandibular Joint. Orthod Waves. 2009 in Press. (査読有)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 伸明 (Tanaka Nobuaki)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90397969

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：