

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791587
 研究課題名（和文）
 メカニカルストレスによる歯周組織から誘導されるヒト歯根吸収因子の解析
 研究課題名（英文） Analysis of absorbing factors against tooth roots induced by
 mechanical stress from periodontal tissues
 研究代表者
 岡山 三紀（OKAYAMA MIKI）
 北海道医療大学・歯学部・助教
 研究者番号：30382500

研究成果の概要（和文）：メカニカルストレスモデルとして、ヒト歯根膜細胞に遠心力により重力を負荷する実験系およびピペッティングによるシェアストレスを負荷する実験系を用い、MAP キナーゼの一つである ERK のリン酸化を主な指標として、シグナル伝達経路を解析した。

研究成果の概要（英文）：Gravity loading (G-loading) was applied to human periodontal ligament (PDL) as a model of mechanical stress. ERK was phosphorylated after 5 min by G-loading at 7G and the phosphorylation of ERK was observed with ATP treatment to the cells at 5 min. G-loading also induced ATP in PDL. An inhibitor of purinergic receptor diminished ERK phosphorylation by G-loading and UTP, P2Y specific agonist induced ERK phosphorylation. Thus, G-loading induced ERK phosphorylation via ATP and P2Y receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯科

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療における歯の移動は、歯と歯槽骨ならびに歯根膜などの歯周組織に加わる力学的負荷（メカニカルストレス）を、断

続的、持続的および間欠的に負荷することに起因する。

その際、圧迫側では歯槽骨が吸収され、牽引側では歯槽骨が形成される骨のリモデリン

グが起きている。歯に適切な矯正力を加えた場合、歯槽骨が吸収され、歯根は過度（重度）に吸収されることはない。しかしながら、過度の矯正力を負荷すると、歯根が吸収されるという問題点も残されている。したがって、矯正歯科治療において、歯根吸収を伴うことなく、より迅速に歯を移動させるためには、歯根吸収を抑制する手段が必要であり、歯根吸収の抑制は良い矯正歯科治療をもたらすものと考えられる。

硬組織の吸収は破骨細胞によって行われる。破骨細胞の硬組織の融解は、硬組織の硬度が高いほど起こりにくいことが知られている。歯周組織の硬度は石灰化度に依存しており、石灰化度を比較すると、エナメル質が97%で圧倒的に高く、骨、セメント質、象牙質は、60~70%で類似している。したがって、破骨細胞による融解では、骨、セメント質、象牙質の三者間に大きな違いが生ずることは無いように思われる。しかしながら実際には、適切な矯正力を加えると、歯槽骨が吸収され歯根は過度に吸収されずに残存する。したがって、矯正力というメカニカルストレスによって、圧迫歯根表側に何らかの因子が誘導され、歯根吸収抑制に働いているように見受けられる。

矯正歯科治療において矯正力が負荷される歯周組織には、歯根膜、セメント質、歯肉、歯槽骨がある。この中で歯根膜は、歯周組織への栄養供給を行うと同時に、力学的負荷に対する緩衝材としての役割も担い、さらにメカニカルストレスを感知するセンサーとして機能しているのではないかと考えられている。我々はこれまで、ヒトから採取した歯根膜細胞にメカニカルストレスを負荷し、ストレスに応答するシグナルを検討してきた。その結果、ストレスに応答して、IL-1 α 、IL-1 β 、IGF-1、TGF- β 、cyclooxygenase-2 (COX-2)、osteopontin、PTH-Rなどが誘導されることを見いだした（未発表データ）。また、他のグループによる歯根膜細胞にメカニカルストレスを負荷した研究でも同様な結果が報告されており、*in vivo* 実験では IL-1 β 、c-fos、IGF-1、PGE2、TGF- β などが、培養細胞実験では cAMP、NO、Ca²⁺、COX-2、osteopontin、type-I collagen、TIMP-1、TIMP-2、Actinなどが誘導されている。したがって、歯周組織、特に歯根膜は、メカニカルストレスを負荷されることで、何らかのシグナルを歯槽骨や歯根表面に伝達し、歯槽骨を吸収させ、歯根を維持させるメカニズムによって、歯の移動をコントロールしているのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

歯根吸収抑制因子を矯正治療に応用するために、歯根膜を中心とした歯周組織からの

骨吸収抑制シグナルを同定し、その作用メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒトの抜去歯より歯根膜細胞およびセメント芽細胞を単離し、メカニカルストレスを負荷後、DNA マイクロアレイチップによって遺伝子の発現量の違いを分析する。その中から歯根吸収抑制因子の候補遺伝子を選択し、siRNAによる遺伝子のノックダウンと破骨細胞の吸収窩を用いた吸収抑制効果の確認実験によって、吸収抑制のある遺伝子の同定を行う。同定された吸収抑制因子の cDNA を単離し、発現ベクターを構築する。発現ベクターを歯根膜細胞およびセメント芽細胞に遺伝子導入し、破骨細胞と共存培養によって、吸収抑制効果の検討を行う。

4. 研究成果

・重力負荷による ERK のリン酸化

重力負荷と ERK のリン酸化の関係について検討した。負荷する重力強度を 7G と 25G で ERK のリン酸化を検討した。ERK は哺乳類では ERK1/p44MAPK、ERK2/p42MAPK の 2 種類のサブタイプが存在する。今回用いた抗 ERK 抗体は 2 つのサブタイプを検出するが、リン酸化を検出する抗 p-ERK 抗体は p-ERK1 に対する抗体認識能が非常に弱く、ほぼ p-ERK2 のみを認識する特性がある。7G の重力を負荷すると ERK のリン酸化が強く検出され、コントロール (1G、遠心力を負荷しない状態) と比較して約 4 倍の増強がみられた (図 6-A)。この結果から、以後の実験では全て 7G の重力を負荷した。次に、7G の重力負荷の時間を 5~15 分の間で変化させ ERK のリン酸化を検討したところ、5 分以降で有意な ERK のリン酸化が検出された (図 6-B)。以上の結果から、以後の実験条件は全て、7G、5 分間の重力負荷で行うこととした。

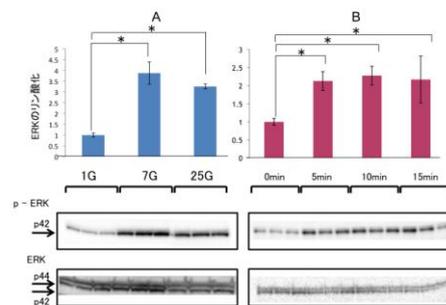


図6. 重力強度および重力負荷時間依存的なERKのリン酸化
A: ヒト歯根膜細胞に7G、25Gの重力を負荷した。採用した条件の中では、7Gの重力負荷でERKのリン酸化が有意に上昇し、control (1G)と比較して約4倍の増強がみられ、その後変化はなかった。
B: ヒト歯根膜細胞に7Gの重力を5、10、15分間負荷した。7G、5分間の重力負荷で有意に上昇し、その後変化がなかった。*、p<0.01 (Dunnnett法)

重力負荷による ATP の放出

重力負荷で ATP が放出されるかどうかを調べるため、重力を負荷しないコントロール群と、重力負荷群のメディウムを採取し、メディウム中の ATP 濃度をルシフェラーゼ活性を

用いて測定した。全ての計測値について Smirnov の棄却検定を行った。棄却検定は、最大偏差 (t_0) と棄却限界値を比較し、最大偏差 (t_0) > 棄却限界値となった場合、測定値の中に外れ値が存在するとした。本実験のコントロール群 (1G) では、平均値、不偏分散、データの最大値と最小値を用いて計算した結果、最大偏差 (t_0) は 4.948455885 になった。棄却限界値は $n=35$ の場合、有意水準 0.025 で 2.978 である。したがって最大偏差 t_0 (4.948455885) > 棄却限界値 (2.978) となるため、この検定には外れ値が存在すると判定された。そこで平均値より最も離れた値を外れ値として除外した。この計算を繰り返して、外れ値が検出されなくなるまで検定を行った結果、上位 5 つの値が外れ値として検出され除外した。重力負荷群 (7G) では、外れ値が検出されなかった。そこで外れ値除外後の測定値を用いて統計処理を行った結果、2 群間に有意差が認められ (p 値 = 0.003179)、重力負荷により ATP の放出が増加することが示された (図 7)。それぞれの群の統計値は、Control 群 ($n=31$) で平均値が 2928、標準偏差が 996.0096 で、重力負荷群 ($n=36$) の平均値が 30338.26、標準偏差が 49640.8 であった。

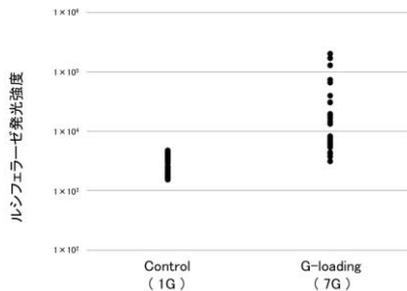


図7. 重力負荷によるATPの放出
ヒト歯根膜細胞に7Gの重力を5分間負荷し、ATP濃度の変化をATP assay kitとLuminometerを用いて測定した。重力負荷により、ATPの放出が増加した。 $n=31$ 、検定 $p < 0.01$ 、control: $2.93 \pm 1.00 \times 10^3$ (平均 \pm S.D.)、G-loading: $3.03 \pm 4.96 \times 10^4$ (平均 \pm S.D.)

ATP 濃度依存的な ERK のリン酸化

重力負荷で ATP が放出されることが示唆されたため、ATP 添加の効果について検討した。1、10、100 μ M の ATP を培養液中に添加し、5 分間刺激したところ、10 μ M で ERK のリン酸化のピークがみられた (図 8)。この結果から、以後の ATP の実験は全て 10 μ M で行うこととした。

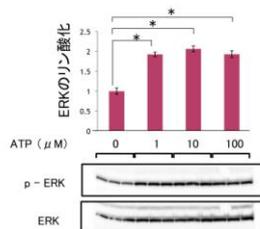


図8. ATP濃度依存的なERKのリン酸化
1、10、100 μ MのATPを培養液中に添加して5分間刺激したところ、10 μ MでERKのリン酸化のピークがみられた。 $*$ 、 $p < 0.01$ (Dunnett法)

ERK のリン酸化への apyrase の効果

メカニカルストレスによる ERK のリン酸化が、放出された ATP によるものであることを確認するために、ATP 分解酵素である apyrase の効果を検討した。メディウムに apyrase をそれぞれ 10、20 units/ml 添加し、15 分間ブレインキューベーション後、重力を負荷した。その結果、apyrase により ERK のリン酸化は濃度依存的に抑制されたが、その抑制効果は完全ではなかった (図 9-A)。そこで同様に apyrase 処理後、ATP 刺激による ERK のリン酸化を調べたところ、重力負荷同様、apyrase による抑制効果は完全ではなく、apyrase による ATP の分解は、完全ではないことが示された (図 9-B)。

ERK のリン酸化に対する Ca^{2+} シグナルの影響

重力負荷が Ca^{2+} シグナルを介して ERK のリン酸化を促進しているかを検討するため、まず、 Ca^{2+} イオノフォアの一つである ionomycin の

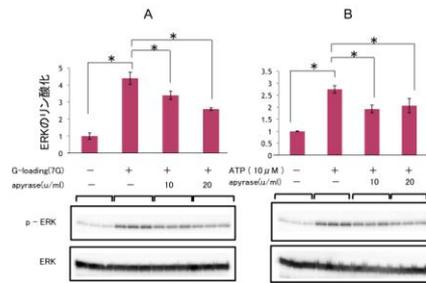


図9. 重力負荷によるおよびERKのリン酸化へのapyraseの効果
A: ヒト歯根膜細胞に10,20u/mlのapyraseを添加し、7Gの重力を負荷した。
B: ヒト歯根膜細胞に10,20u/mlのapyraseを添加し、10 μ MのATPで刺激した。重力負荷およびATP刺激によるERKのリン酸化はATPaseであるapyraseにより抑制された。 $*$ 、 $p < 0.01$ (Dunnett法)

効果を調べた。1、5、10 μ M の ionomycin で 5 分間処理し、ERK のリン酸化を調べた結果、全ての濃度で有意に ERK のリン酸化が増強した (図 10)。

メカニカルストレスによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇

メカニカルストレスによって細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられるかどうかを検討した。重

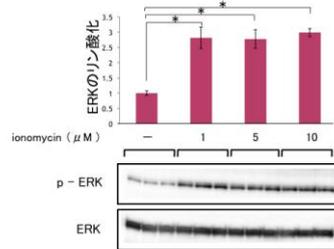


図10. ATP濃度依存的なERKのリン酸化
ヒト歯根膜細胞に1、5、10 μ Mのionomycinを添加し、ERKのリン酸化を調べた。ionomycin処理により、明らかなERKのリン酸化がみられた。 $*$ 、 $p < 0.01$ (Dunnett法)

力負荷による Ca^{2+} 濃度の上昇を顕微鏡下で直接見ることはできないため、重力負荷の代わりに液体の流れによるメカニカルストレスであるシェアストレスを用いた。Fura-2 を取り込ませたヒト歯根膜細胞に、ピペットで勢いよくメディアムをそそぎ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態をイメージング装置を用いて解析した。その結果、細胞間で反応の強弱はあったもののほぼ全ての細胞に Ca^{2+} 応答が認められた (図 11)。

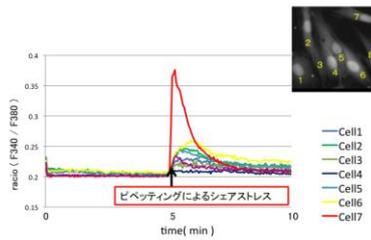


図11. メカニカルストレスによる Ca^{2+} response
ヒト歯根膜細胞にピペッティングによるシェアストレスを負荷し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べた。ピペッティングによるシェアストレスによって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。細胞間で細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化量が認められた。

ERK のリン酸化に対する suramin の影響

メカニカルストレスによって放出される ATP が、プリン受容体を介して作用しているかどうかを検討した。プリン受容体の非選択的阻害剤である suramin をそれぞれ 100、200 μM 培養液に添加し、15 分後に重力負荷し ERK のリン酸化を解析した。その結果、ERK のリン酸化は suramin によって強力に阻害され、コントロールのレベル以下まで低下した (図 13-A)。同様に suramin を培養液に添加し ATP 刺激による ERK のリン酸化を調べた結果、ERK のリン酸化は重力負荷同様、suramin によって阻害された (図 13-B)。

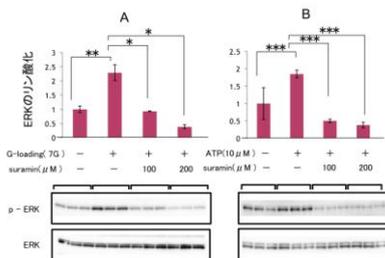


図13. 重力負荷によるERKのリン酸化に対するsuraminの影響
ヒト歯根膜細胞にそれぞれ100、200 μM のsuraminを添加し、重力負荷(A)およびATP刺激(B)によるERKのリン酸化を調べた。重力負荷およびATP刺激によるERKのリン酸化はプリン受容体の阻害剤であるsuraminによって阻害された。A: * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, (Dunnett法); B: *** $p < 0.001$, (Kruskal-Wallis法)

細胞外 Ca^{2+} 除去による ERK のリン酸化

メカニカルストレスによって放出される ATP が、プリン受容体の P2X 受容体と P2Y 受容体

のどちらかを介して作用しているかを検討するため細胞外 Ca^{2+} を除去し重力負荷による ERK のリン酸化を検討した。その結果、細胞外液から Ca^{2+} を除いた状態でも重力負荷により ERK はリン酸化された (図 14-A)。

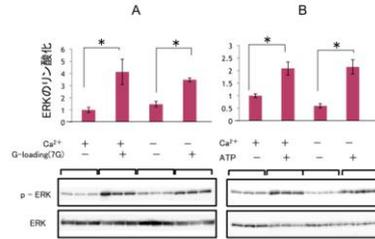


図14. 細胞外 Ca^{2+} 除去によるERKのリン酸化の効果
A: 細胞外 Ca^{2+} を除去し、重力負荷によるERKのリン酸化を調べた。B: 細胞外 Ca^{2+} を除去し、ATP刺激によるERKのリン酸化を調べた。細胞外液から Ca^{2+} を除いた状態でも、重力負荷およびATP刺激によるERKはリン酸化された。* $p < 0.01$ (Dunnett法)

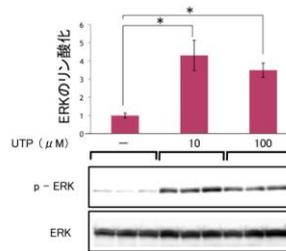


図15. UTP (P2Yアゴニスト) 刺激によるERKのリン酸化
ヒト歯根膜細胞にそれぞれ100、100 μM のUTP (P2Yアゴニスト) で刺激し、ERKのリン酸化を調べた。それぞれ10、100 μM のUTPを培養液に添加し、5分間刺激したところ、10 μM でERKのリン酸化のピークがみられP2Y受容体の存在が示唆された。* $p < 0.01$ (Dunnett法)

UTP 刺激による ERK のリン酸化

P2Y 受容体の関与を確認するために、P2Y 受容体の選択的アゴニストである UTP による ERK のリン酸化を調べた。それぞれ、10、100 μM の UTP を培養液中に添加し、5 分間刺激したところ、10 μM で ERK のリン酸化が有意に認められ (図 15)、P2Y 受容体の関与が強く示唆された。

ヒト歯根膜細胞における P2Y 受容体の mRNA 発現

ヒト歯根膜細胞に発現する P2Y 受容体の種類を明らかにするため、total RNA を抽出し、

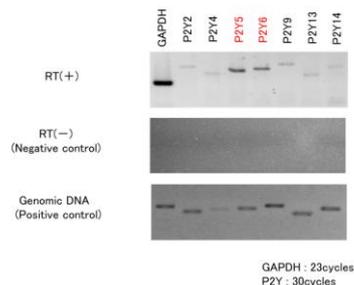


図16. ヒト歯根膜細胞におけるP2Y受容体のmRNA発現
ヒト歯根膜細胞のトータルRNAを抽出し、RT-PCR法でP2Y受容体の発現を調べた。

RT-PCR 法で P2Y 受容体の発現を検討した。その結果、P2Y5 および P2Y6 の強い発現が認められた (図 16)。

重力負荷による COX-2 の mRNA 発現の上昇
 歯槽骨吸収に影響する ERK の下流のシグナルを明らかにするため、重力負荷による COX-2 の mRNA 発現の変化を検討した。7G の重力を 5 分間負荷し、1 時間、2 時間、3 時間後に total RNA を抽出し、RT-PCR 法により mRNA 発現量を比較した。その結果、重力負荷後、1 時間で COX-2 の発現の明らかな上昇が認められた (図 17)。

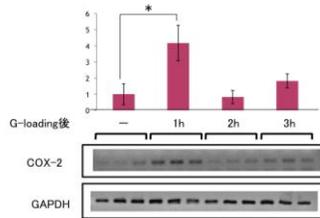


図17. 重力負荷によるCOX-2のmRNAの発現の上昇
 重力負荷によるCOX-2の発現の上昇を調べた。7Gの重力を5分間負荷し、1時間、2時間、3時間後にトータルRNAを抽出し、RT-PCR法によりmRNA発現量を比較した。*、 $p < 0.01$ (Dunnett 法)

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 3 件)

1. Iijima M, Muguruma T, Brantley WA, Oka yama M, Yuasa T, Mizoguchi I. Torsional properties and microstructures of miniscrew implants. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 査読有、134巻、2008、333.e1-6
2. MURATA Masaru, OKAYAMA Miki, HINO Jun, ITO Katsutoshi, MIZOGUCHI Itaru and ARISUE Makoto. Clinical Statistics of 43 Cases using Midpalatal Implants and Application of Collagenous Sponge for Bone Defect after Removal of Implants. Journal of Hard Tissue Biology, 査読有、18 巻、2009、185-192
3. Miki Okayama, Toshiya Arakawa, Akihiko Tanimura, Itaru Mizoguchi, Yoshifumi Tajima and Taishin Takuma. Role of VAMP8/endobrevin in Constitutive Exocytotic Pathway in HeLa Cells. Cell structure and function. 査読有、34 巻、2009、115-125

[学会発表] (計 8 件)

1. 伊藤麻衣、岡山三紀、荒川俊哉、田隈泰信、溝口 到 歯根膜におけるメカニカルストレス応答遺伝子の解析、第 67 回日本矯正歯科

学会学術大会

2. 岡山三紀、六車武史、村田 勝、柴田孝典、溝口 到 Corticotomy surgery を併用した片側性交叉咬合症例、第 67 回日本矯正歯科学会学術大会
3. 荒川俊哉、安彦善裕、岡山三紀、溝口 到、田隈泰信 点特異的に DNA メチル基を持つベクターの構築法の開発とその応用、第 50 回歯科基礎医学会学術大会
4. 岡山三紀、村田 勝、田崎純一、溝口 到 口蓋インプラントを用いて上顎歯列弓遠心移動を行った再治療症例、第 68 回日本矯正歯科学会学術大会
5. 伊藤麻衣、岡山三紀、荒川俊哉、田隈泰信、溝口 到 重力負荷による歯根膜細胞のシグナル応答機構、第 68 回日本矯正歯科学会学術大会
6. 岡山三紀、設楽彰子、荒川俊哉、溝口 到、田隈泰信 ウミホタル・ルシフェラーゼ安定発現細胞を用いた SNARE の機能解析、第 83 回日本生化学会
7. 設楽彰子、岡山三紀、荒川俊哉、溝口 到、田隈泰信 W-View 光学系を用いた構成的開口分泌関連 v-SNARE の網羅的解析、第 51 回歯科基礎医学会学術大会
8. 伊藤麻衣、荒川俊哉、設楽彰子、岡山三紀、溝口 到、田隈泰信 歯根膜細胞の重力負荷に対するシグナル応答機構、第 51 回歯科基礎医学会学術大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 三紀 (OKAYAMA MIKI)
 北海道医療大学・歯学部・助教
 研究者番号：30382500