

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10191

研究課題名(和文) bFGFを応用した歯根吸収における予防と治療方法開発の基盤構築

研究課題名(英文) Basic research for development of prevention and treatment methods for root resorption applying bFGF

研究代表者

黒石 加代子(中尾加代子)(Kuroishi, Kayoko)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60468303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：矯正歯科治療を想定した機械的刺激によるヒト歯根膜細胞への影響と塩基性線維芽細胞増殖因子bFGF(FGF-2)に着目し、セメント芽細胞分化因子CEMP1、CAPの発現動態を検討し歯根吸収の発生機序の解明を目的とした。FGF-2 mRNAは機械的刺激やbFGF添加で変化しなかった。CEMP1 mRNAは、機械的刺激で変化せずbFGF添加で有意に増加した。CAPおよびFGF-2受容体FGFR 1 mRNAは機械的刺激およびbFGF添加で有意に増加した。FGF-2は機械的刺激下のヒト歯根膜細胞においてセメント芽細胞分化因子CEMP1やCAP発現に関与し、歯根吸収の発生機序に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により矯正歯科治療に伴う歯根吸収発症機序を学術的に明らかにし、矯正学的歯の移動により生じた歯根吸収の予防法そして吸収した歯根の再生方法を開発し、歯根吸収の治療法が確立できれば、嚢胞や埋伏歯等により生じた重度歯根吸収にも応用し、抜歯を回避し歯の長期保存の可能性や治療の選択肢が拡大することが期待され社会的有用性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of mechanical stimulation on human periodontal ligament cells and the expression kinetics of cementoblast differentiation factors, CEMP1 and CAP, focusing on basic fibroblast growth factor, bFGF (FGF-2), in order to clarify the mechanism of root resorption in orthodontic treatment. CEMP1 mRNA was not changed by mechanical stimulation, but was significantly increased by addition of bFGF. CAP and FGF-2 receptor FGFR1 mRNA was significantly increased by mechanical stimulation and addition of bFGF. FGF-2 is involved in cementoblast differentiation factor CEMP1 and CAP expression in mechanically stimulated human periodontal ligament cells, suggesting that FGF-2 may be involved in the developmental mechanism of root resorption.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯根吸収      メカニカルストレス    CEMP1    CAP    FGF2 (bFGF)

## 1. 研究開始当初の背景

矯正学的歯の移動は歯に矯正力を加えることで生じ、その副作用として生じる歯根吸収は矯正歯科臨床で大きな問題の1つである。矯正力は、歯根膜細胞からの様々な炎症性サイトカインの放出を刺激し周囲歯周組織の炎症反応により歯根吸収が発症すると考えられているが、その発生機序は未だ不明な点が多く歯根吸収の予防法や治療法は確立していない。矯正学的歯の移動時のラット圧迫側歯根膜組織および機械的刺激下のヒト歯根膜細胞において FGF (線維芽細胞増殖因子、basic fibroblast growth factors) -2 (bFGF) の発現が増加し<sup>[文献 1,2,3]</sup>、ヒト歯根膜における bFGF と FGF 受容体の発現が報告されている<sup>[文献 4]</sup>。このことから、メカニカルストレス下の歯根膜から産生された FGF がオートクラインやパラクラインにて歯根膜に作用することが示唆される。また bFGF の歯根膜への作用として、ヒト歯根膜細胞に占める歯根膜幹細胞の割合を増加させ、培養条件を変えることで歯根膜幹細胞が脂肪細胞と骨芽細胞への分化能を有し<sup>[文献 5]</sup>、血管内皮細胞成長因子 (VEGF)-A の発現を誘導し血管形成を促進することが報告されている<sup>[文献 6]</sup>。また歯周病モデルのイヌ歯周組織欠損部において bFGF が骨の再生を促進し歯根膜およびセメント質が早期に形成され<sup>[文献 7]</sup>、実験的セメント質欠損部の新生セメント質形成を促進することが報告された<sup>[文献 8,9]</sup>。歯根膜とセメント質は同じ歯小嚢に由来し、歯根膜は細胞成分に線維芽細胞、セメント芽細胞、未分化間葉細胞等を含み様々な機能を発揮する可能性があるが、歯根膜細胞が吸収した歯根を再生できるか明らかではない。歯周組織修復因子としての bFGF を歯根膜細胞に作用させ活性化し、歯根膜細胞がセメント芽細胞様細胞に分化しセメント質を形成し、歯根吸収を予防あるいは吸収した歯根の再生に寄与できるのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

矯正歯科治療を想定した機械的刺激下における歯根膜細胞への影響と、歯根膜細胞に発現が確認されている FGF-2 (bFGF) の働きに着目し、セメント芽細胞分化因子 CEMP1 (Cementum protein 1)、CAP (Cementum attachment protein) の発現動態について検討し、歯根膜細胞に及ぼす機械的刺激と FGF-2 の影響を調べ歯根吸収の発生機序を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 遠心分離機を用いた機械的刺激による細胞傷害性の検討：ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPdLF; Lonza) を 10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM にて培養後、 $0.3 \times 10^6$  cell/flask で T-25 培養フラスコに継代した。48 時間培養後、PBS (-) で洗浄し、DMEM 培地に置き換え、サブコンフェルトで維持した。遠心分離機を用いて機械的刺激 (遠心力; 600rpm:16.0g/cm<sup>2</sup>、900rpm:36.0g/cm<sup>2</sup>、1200rpm:64.0g/cm<sup>2</sup>) を 24 時間付与した。その後、培養液を回収し、CytotoxicityLDH AssayKit-WST (Dojindo) を用いて、プロトコルに従って細胞傷害率を算出した (n=3)。

(2) bFGF 添加濃度の検討：ヒト歯根膜線維芽細胞を培養後、 $5.0 \times 10^3$  cell/ml に調整し、96 well plate に  $100 \mu$  l/well ずつ播種した。24 時間培養後、調整した bFGF を 0、5、10、20、30、50、100ng/ml となるように  $10 \mu$  l ずつ添加した。さらに 24 時間培養後、Cell Counting Kit-8 溶液 (Dojindo) を  $10 \mu$  l 添加後、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度で計測した (n=5)。

(3) 機械的刺激の付与：ヒト歯根膜線維芽細胞を培養後、 $0.7 \times 10^6$  cell/flask で T-25 培養フラスコに継代した。48 時間培養後、DMEM 培地に置き換えサブコンフェルトで維持した。機械的刺激 (遠心力; 600rpm:16.0g/cm<sup>2</sup>、900rpm:36.0g/cm<sup>2</sup>) を 24 時間付与後、細胞を回収し、RT-qPCR 法にて各遺伝子\*の発現レベルの変化を評価した (n=4)。

(4) bFGF 20ng/ml の添加と機械的刺激の付与：ヒト歯根膜線維芽細胞を T-25 培養フラスコに継代し、サブコンフェルトで維持した。機械的刺激 (遠心力; 900rpm) の付与前に bFGF 20ng/ml を培養液に添加し機械的刺激を 24 時間付与した。その後 RT-qPCR 法にて各遺伝子 (\*) の発現レベルの変化を評価した (n=4)。

(\*) FGF-2 (bFGF, Basic fibroblast growth factor: 線維芽細胞増殖因子増殖因子)、FGFR1 (Fibroblast growth factor receptor 1: FGF-2 受容体)、FGFR2 (Fibroblast growth factor receptor 2: FGF-2 受容体)、CEMP1 (Cementum protein 1: セメント芽細胞分化因子)、CAP (Cementum attachment protein: セメント芽細胞分化因子)、GLUT1 (Glucose transporter 1: セメント質特異的因子)、ALP (Alkaline Phosphatase: 骨芽細胞分化因子)、Runx2 (Runt-related transcription factor 2: 骨芽細胞分化因子)、Ctsk (Cathepsin K: 破骨(歯)細胞活性化因子)

## 4. 研究成果

(1) 遠心分離機を用いた機械的刺激 600rpm (16.0g/cm<sup>2</sup>)、

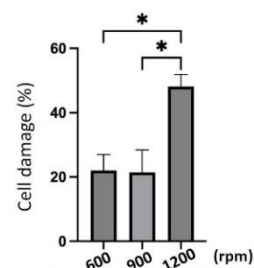


図1. 細胞傷害性

900rpm (36.0g/cm<sup>2</sup>)と比較して、1200rpm (64.0g/cm<sup>2</sup>)で、有意に細胞傷害率が高かった (図1)。歯根吸収が生じやすい矯正力を想定し、900rpmを機械的的刺激としてその後の実験を行った。

(2) bFGFは20ng/ml以上の濃度において、細胞生存率が低下した (図2)。ヒト歯根膜線維芽細胞をFGF-2の過剰環境にするために、bFGF 20ng/mlで培養液に添加することとした。

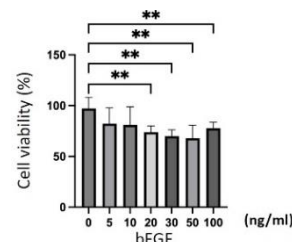


図2. bFGFの添加濃度の検証

(3) 定常状態のヒト歯根膜細胞において FGF-2 は発現しており、その発現は機械的的刺激の影響を受けなかった (図3A)。FGFR1は、900rpmで発現が有意に増加し、600rpmで最も発現が増加した (図3B)。FGFR2発現は、機械的的刺激の影響を受けなかった (図3C)。CEMP1および GLUT1は、機械的的刺激の影響を受けなかった (図3D, F)。CAPは、FGFR1と同様の発現変化を示し、機械的刺激によって発現が有意に増加した (図3E)。ALPは機械的的刺激の影響を受けなかった (図3G)が、Runx2および Ctskは、機械的刺激により発現が有意に増加した (図3H, I)。

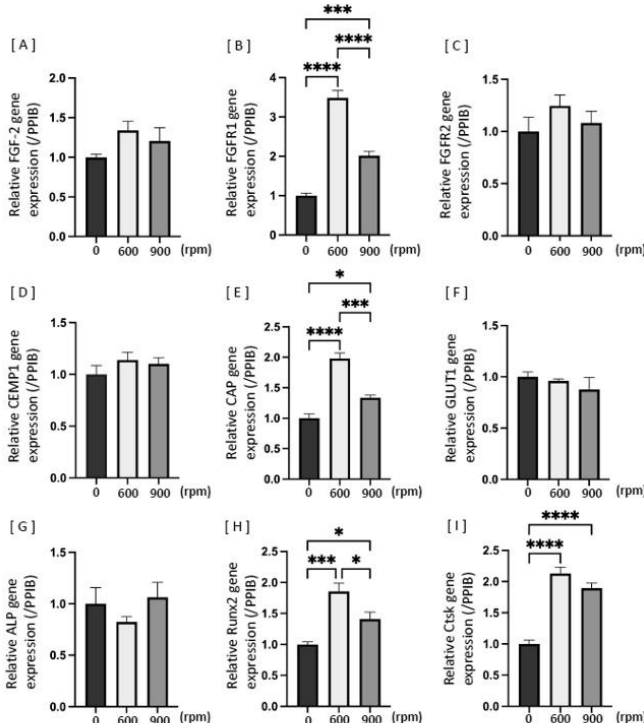


図3. 機械的刺激による遺伝子発現の変化

(4) FGF-2は、機械的刺激やbFGF添加により発現は変化しなかった (図4A)。FGF-2の受容体FGFR1は、機械的刺激およびbFGF添加により発現が有意に増加したが、FGFR2においては、発現は変化しなかった (図4B, C)。セメント芽細胞分化因子であるCEMP1は定常時にbFGF添加により発現は有意に増加し、CAPは機械的刺激下でbFGF添加により有意な発現増加を認めた (図4D, E)。セメント質特異的因子であるGLUT1は、bFGF添加による変化を示さなかった (図4F)。骨芽細胞分化因子ALP、RUNX2および破骨(歯)細胞分化因子CtskはbFGF添加による変化を示さなかった (図4G, H, I)。

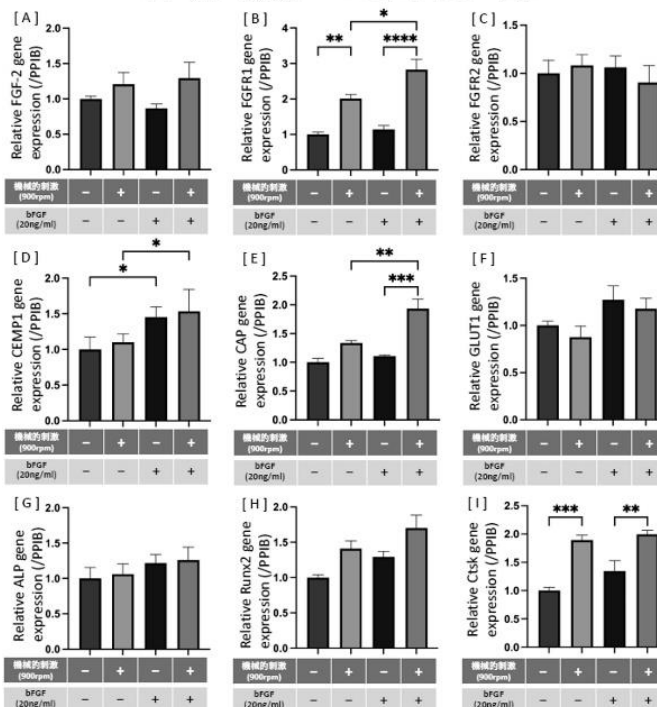


図4. bFGFの添加と機械的刺激による遺伝子発現の変化

これらのことから、FGF-2は機械的刺激下におけるヒト歯根膜細胞において、セメント芽細胞分化因子CEMP1やCAPの発現に関与している可能性があり、FGF-2が歯根吸収の発生機序に関与していることが示唆された。

<引用文献>

[1] Salomaol et al., *Dental Press J Orthod*, 2014, [2] Li et al., *J Dent Res*, 2011, [3] Chang et al., *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, [4] Grzibovskis et al., *Stomatologija*, 2011, [5] Hidaka et al., *Arch Oral Biol*, 2012, [6] Yanagita et al., *J Dent Res*, 2014, [7] Nagayasu-Tanaka et al., *PLoS One*, 2015, [8] Sato et al., *J periodontol*, 2004, [9] Anzai et al., *PLoS One*, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 力丸早紀子、黒石加代子、郡司掛香織、水原正博、川元龍夫
2. 発表標題 機械的刺激下のヒト歯根膜細胞におけるFGF-2を介したCEMP1、CAPの発現
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 力丸早紀子、黒石加代子、郡司掛香織、水原正博、川元龍夫
2. 発表標題 矯正歯科治療を想定した機械的刺激下のヒト歯根膜細胞におけるFGF-2を介したCEMP1、CAPの発現
3. 学会等名 第19回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森井 葵  (Morii Aoi)  (20882046)	九州歯科大学・歯学部・医員   (27102)	削除：2022年6月16日
研究分担者	左合 美紗  (Sago Misa)  (40815825)	九州歯科大学・歯学部・特別研修員   (27102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	川元 龍夫  (Kawamoto Tatsuo)  (50323704)	九州歯科大学・歯学部・教授    (27102)	
研究 分 担 者	水原 正博  (Mizuhara Masahiro)  (60845402)	九州歯科大学・歯学部・助教    (27102)	
研究 分 担 者	郡司掛 香織  (Gunjigake Kaori)  (90448811)	九州歯科大学・歯学部・講師    (27102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関