

機関番号： 11301

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2009 ~ 2010

課題番号： 21792057

研究課題名 (和文) 歯の移動時の歯周組織におけるポストデス・シグナルの役割

研究課題名 (英文) The role of the post-death signal in the periodontium during orthodontic tooth movement

研究代表者

久保田 衛 (KUBOTA MAMORU)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号： 30374945

研究成果の概要 (和文) : 本研究は、歯の移動時の部位特異的な歯周組織再構築のメカニズムの一端を解明することを目的として、歯周組織を構成する細胞の死後に放出されるシグナルに着目して研究を行った。8週齢の Wistar 系雄性ラットの上顎第一臼歯を移動後に、TUNEL 法などの染色を施し形態学的にアポトーシスを観察した。カスパーゼの阻害剤である Z-VAD の存在下で歯の移動を行った。また、骨芽細胞および歯根膜細胞を培養し、低血清培地条件、低酸素条件、持続的圧縮力条件のそれぞれを用いて、アポトーシスを誘導した。細胞生存率は減少し、遺伝子発現パターン解析により、いくつかのシグナル伝達経路が候補としてあがった。

研究成果の概要 (英文) : The purpose of this study is to elucidate the mechanism of site-specific periodontium remodeling during orthodontic tooth movement. Therefore it was paid attention the signal that the cells, which constituted periodontium, released after death, and a study was conducted. The maxillary first molars of 8 weeks-old male Wistar rats were moved, and apoptosis was observed morphologically staining by the TUNEL methods. Furthermore, tooth movement was examined in the presence of Z-VAD, which was a repressor of caspase. In addition, osteoblasts and a periodontal ligament cells were cultured in vitro, and apoptosis was induced using low-serum culture media, hypoxia or continuous compression force condition. The survival rate of the cell decreased, and some signal transduction pathways were detected as candidates by gene expression pattern analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：アポトーシス，歯の移動，シグナル伝達，歯周組織，細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) 矯正学的歯の移動はメカニカルストレスを受けた歯周組織の改造によって達成される。

その際、既存の組織・細胞集団が異なる機能を有する新しい組織・細胞集団に置き換わる過程が存在する。

(2) 過去の研究から、歯を移動する際のメカニカルストレスによって歯周組織にネクローシスやアポトーシスなどの細胞死が引き起こされている事が明らかにされているが、これらの細胞死がその後の改造現象にどのような役割を果たしているかは不明である。

(3) 最近、骨細胞のアポトーシス小体がTNF- α を介して骨吸収部位のターゲティングに関わっていることが示された。

2. 研究の目的

本研究では、歯周組織を構成する細胞の死後に放出されるシグナルに着目し、歯の移動時の部位特異的な歯周組織再構築のメカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯の移動時に生じるアポトーシスの検出実験動物として8週齢のWistar系雄性ラットを用いる。歯の移動には規格化して作製した装置を用い、上顎左右第一臼歯を舌側に移動させる。装置装着1、3、7、14、21日後に上顎骨を摘出し、通法に従ってパラフィン切片を作製する。切片には、HE染色とTdT (TUNEL法)を用いたFragment End-Labeling法による染色を施し、細胞死が起きた組織を形態学的に観察するとともに、断片化したDNAを検出することによって、アポトーシスを起こした細胞をin situで同定する。さらに、アポトーシスの分布と骨吸収や歯根吸収が生じた領域の関連性について、組織形態計測学的に解析する。

(2) 歯根膜細胞、セメント細胞、骨細胞の初代培養歯根膜細胞は、矯正治療のために抜歯された、歯周病等の疾患に罹患していない正常な小白歯の歯根中央1/3表面から歯根膜片を剥離して培養する。これらは10%牛胎児血清添加 α -MEM培養液中に浮遊させ、outgrowthした細胞からそれぞれ分離培養した線維芽細胞様細胞を用いる。セメント細胞は、歯根膜を剥離した歯根表面から外科用メスで切離したセメント質細片をコラゲナーゼ処理し、10%牛胎児血清添加DMEM/F12培養液中で分離培養する⁵⁾。骨細胞は、上顎骨骨切り術の際に切除される皮質骨骨片から同様に分離培養する。

(3) 人為的アポトーシスとアポトーシス小体の調整

(2)で得られた細胞を0.1%牛胎児血清添加培養液中で7日間培養し、アポトーシスを誘

導する。それぞれの細胞のアポトーシス小体は、Annexin V-Biotin結合性を基にstreptavidinコンジュゲート磁気ビーズを用いてソーティングし、精製する。ネクローシスを起こした細胞は同時にpropidium iodideを用いて排除する。実験には最終濃度が50,000~200,000個/mlになるように調整して用いる。

(4) アポトーシス小体の破骨細胞形成能の評価

ヒト末梢血由来単球系細胞培養系を用い、ヒトの歯根膜細胞、セメント細胞、骨細胞由来のアポトーシス小体がTRAP陽性多核細胞形成に及ぼす影響を調べる。ヒト末梢血は健康な成人から提供を受け、CD14陽性細胞を得る。本細胞をM-CSFとRANKLの存在下で培養し、形成されるTRAP陽性多核細胞数をカウントする。

(5) アポトーシス小体の作用を仲介するサイトカインの検討

アポトーシス小体が破骨細胞形成に及ぼす作用を仲介する因子を同定するため、各種サイトカインをELISA法により測定するとともに、(4)の実験をTNF- α の中和抗体あるいはOsteoprotegerinの存在下で行う。

(7) カスパーゼの阻害剤が歯の移動に及ぼす影響

アポトーシスを人為的に抑制した場合に歯の移動に伴う歯周組織の改造がどのような影響を受けるか明らかにするため、(1)の実験をアポトーシスの実行分子であるカスパーゼの阻害剤(IAPファミリー蛋白質またはペプチド性阻害剤)の存在下で行う。

(8) アポトーシス小体の骨(象牙質)吸収活性の評価

(4)の実験をデンティンディスク上で行い、吸収窩の面積を測定し、各細胞のアポトーシス小体の吸収活性を比較する。

(9) 得られた研究成果をまとめ、査読付き国際雑誌に投稿する。

4. 研究成果

(1) 歯の移動時に生じるアポトーシス

8週齢のWistar系雄性ラットの上顎第一臼歯を、規格化して作製した装置(図1)を用いて移動後に上顎骨を摘出し、組織ブロックを作成した。通法に従ってパラフィン切片(水平断)を作製し、TUNEL法などの染色を施し形態学的に観察している。



図1 ラットの上顎第一臼歯を口蓋側に移動するために作製した規格化した装置

(2) カスパーゼの阻害剤が歯の移動に及ぼす影響

8週齢のWistar系雄性ラットの上顎第一臼歯をカスパーゼ阻害剤の存在下（局所投与）で15日間舌側に移動した。実験はスプリットマウスデザインとし、左側第一臼歯部口蓋にはcaspase 1, 3, 4, 7の阻害剤であるZ-VAD (1mg/mL)を、右側第一臼歯部口蓋にはvehicleであるsaline (5% DMSO)を、それぞれ30 μ Lずつ3日毎に局所注射した。歯の移動量は、移動0, 3, 9, 15日目にシリコン印象材を用いて上顎の精密模型を作製し、実体顕微鏡下で口蓋正中から左右の第一臼歯近心舌側咬頭までの距離をノギスで計測して算出した。統計処理にはtwo-way ANOVAを用いた。

結果として、図2に示すように動物の体重は順調に増加しており、カスパーゼ阻害剤の局所投与による全身的な影響はほとんどなかったものと考えられた。

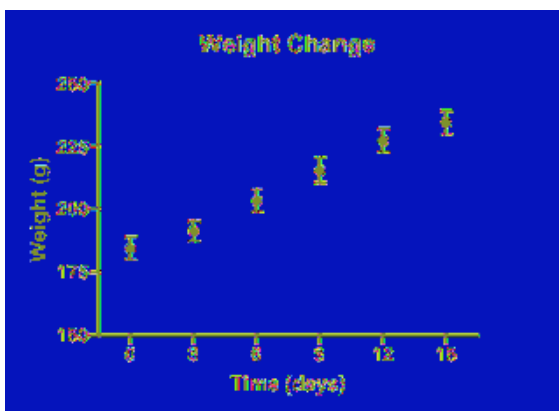


図2 カスパーゼ阻害剤 Z-VAD局所投与が体重に及ぼす影響（15日間）

実験期間中、歯の移動量は経時的に増加したが、左右の第一臼歯の移動量に統計学的な有意差は認められなかった（図3）。今回の実験では歯の移動期間が15日間と短く、カスパーゼの阻害が歯の移動に及ぼす影響を明らかにするためには、より長期間の観察が必要と思われる。

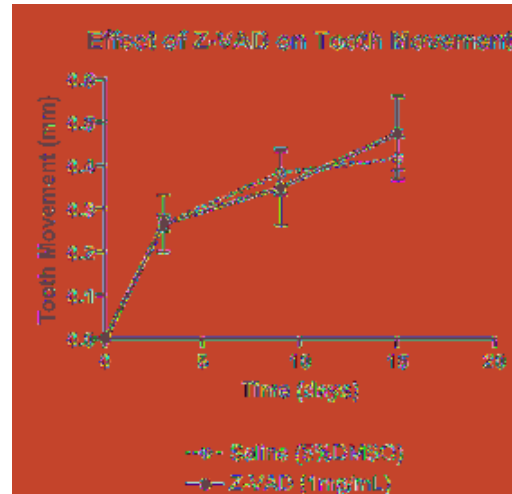


図3 カスパーゼ阻害剤 Z-VAD が、歯の移動に及ぼす影響（15日間）

(3) in vitro における歯根膜細胞、骨芽細胞のアポトーシス誘導

in vitro アポトーシス誘導法として、低酸素条件、持続的圧縮力条件のそれぞれを用いて骨芽細胞および歯根膜細胞を培養した。（図4）

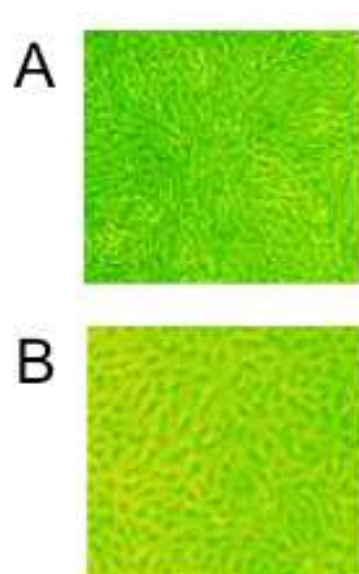


図4 アポトーシス誘導前の培養ヒト歯根膜細胞 (A) とヒト骨芽細胞 (B) の位相差顕微鏡像

アポトーシス誘導後、細胞生存率は減少した。刺激後の細胞から total RNA を抽出した。BioAnalyzer 分析で測定し、RIN (RNA integrity number) =10 を示す非分解 total RNA を用いて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。(図5)

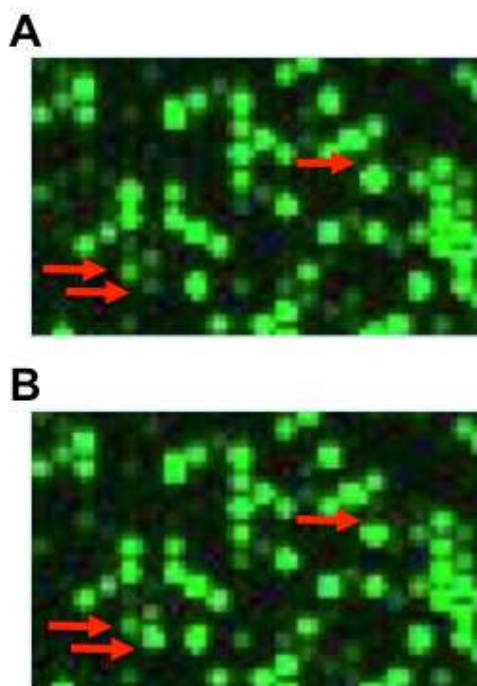


図5 マイクロアレイによる遺伝子発現解析
コントロール(A)、アポトーシス誘導(B)
赤い矢印で示したところに明確な遺伝子発現の差が認められる。

さらに遺伝子発現パターン解析により、HIF-1 α およびHIF-2 α やATF-2ネットワーク、Canonical NF-kappa B pathway, direct p53 effect を介するシグナル伝達経路が候補としてあがった。

これらのアポトーシス経路の違いとアポトーシス小体、および破骨細胞形成について検討している。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 衛 (KUBOTA MAMORU)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常

勤講師

研究者番号: 30374945

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: