科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20432

研究課題名(和文)3次元口腔粘膜モデルを用いた分子・細胞レベルでの義歯床下骨吸収メカニズムの検証

研究課題名(英文)Effect of pressure-loading to denture supporting tissues on the underlying bone resorption at the molecular and cellular level in a three-dimensional in vitro oral mucosa model

研究代表者

塩見 晶 (Shiomi, Aki)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：80736653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：一般的に義歯の加圧刺激により歯槽骨吸収は促進されると言われており、そのメカニズム解明を目的として、加圧刺激を負荷した3次元培養口腔粘膜モデル(3DOMM)から放出された、骨代謝関連サイトカインの分泌量を分析した。

その結果、骨吸収促進性を示唆するものと、抑制性を示唆するものがあり、一貫した傾向を示さなかったことより、分泌量のバランスが肝要であることが示唆された。(75文字)また、サイトカインの分泌量と3DOMM上皮再生の組織学的所見が関連しており、加圧刺激を受けた結果による口腔粘膜の“病理組織学的”状態に、培養上清中に分泌されるサイトカイン量が左右される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Denture-wearing is well-known to cause the underlying alveolar bone resorption. This study aimed to examine the profile of soluble factors related to bone metabolism and histologic changes of the oral mucosa epithelial layer under cyclic mechanical pressure-loading mimicking denture-wearing using a three-dimensional in vitro oral mucosa model (3DOMM).

As a result, I was not able to find any specific patterns of cytokine profile, regarding to bone resorption as well as bone formation, in the supernatant of 3DOMM under the pressure-loading. Furthermore, histological findings of 3DOMM showed that the quality of epithelial structure seemed to be inversely related to the amount of soluble factors secreted from the 3DOMM, suggesting that a well-structured oral mucosa does not release a large amount of soluble factor. Conversely, the epithelial tissue damage may increase the secretion of cytokines, which indirectly affect the underlying the bone resorption.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：培養口腔粘膜 加圧刺激 骨代謝因子 義歯床下粘膜

1. 研究開始当初の背景

口で食べるという行為は、脳をはじめいろいろな身体器官を刺激し活性化し、ヒトに今生きているという喜びを実感させてくれる。高齢者が豊かな食生活を送ることは、健康で長生きするという身体的な面はもちろん、心理的な面からも QOL の維持・向上に必要不可欠である。平均寿命が伸び超高齢社会となったわが国で、う蝕と歯周病で歯を失う国民の数が減少に転じることは期待できない。そのため、喪失歯に対する欠損補綴処置の必要性はますます拡大し、可撤性義歯の装着総数は 2030 年まで増加するとの予測が出ている。デンタルインプラント治療は、予知性が格段に向上したことや、患者の QOL 向上および多様化に伴い、一般臨床において急激に普及しているものの、経済的負担の面や、患者の健康状態や顎骨の骨量の問題で非適応となる場合もあることから、インプラント治療が今後主流となるのは考えにくく、結果、欠損歯の数が少数であっても、保険適用のある義歯を選択する患者が増加することは必至である。

つまり、従来から行われている可撤性義歯は、その需要が失われたわけではなく、適応範囲の広さを背景に、選択肢の一つとして幅広く支持されている。

患者の QOL 維持のために可撤性義歯の装着とその後のメンテナンスは必須であり、歯科医師が義歯の支持組織の変化を把握することは重要であるといえるが、経験豊富な歯科医師であってもその医学・生物学的意義は十分に理解しているとは考えられない。

口腔粘膜の最大の機能は外界からの様々な刺激や病原体などのストレスから粘膜下組織を防御することである。義歯装着における機械的刺激は、義歯床下組織に様々な影響を与える。まず床下粘膜に変化を及ぼし、最終的には顎骨に変化を引き起こすことが報告されている。組織学的観察において、床下粘膜では粘膜の肥厚やひ薄化、角化層の角化様式の変化、慢性炎症などが起こり、顎骨では骨吸収が起こることが知られており、こうした現象は著しく患者の QOL を低下させている。義歯床下組織の保全を図るためには、義歯によって引き起こされる組織変化とその原因と考えられる要因との因果関係を明らかにすることが必要である。

口腔粘膜組織を構成する主要な細胞である上皮細胞と線維芽細胞は各種成長因子・サイトカインなどを合成・分泌することが知られている。義歯装着による機械的刺激は、粘膜の細胞に直接的に影響を及ぼすだけではなく、上皮細胞と線維芽細胞の相互作用・クロストークによってサイトカインや成長因子産生に質的・量的変化が生じることが容易に想像される。また、義歯装着に起因する顎骨吸収においても、床下粘膜に加えられた圧力刺激が、直接骨表面に破骨細胞を誘導するだけではなく、粘膜組織から放出される各種

液性因子によって起こることが予想される。

成熟破骨細胞の形成にかかわるサイトカインとして RANKL とそのデコイ受容体である OPG、破骨細胞の分化に必須である M-CSF のほか、炎症性サイトカイン IL-18 も破骨細胞の分化を促進することが知られている。また、PTH や IL-11、炎症性サイトカインである IL-6 は骨芽細胞を刺激することで RANKL 発現を促進し、間接的に破骨細胞分化を促進することで知られている。

2. 研究の目的

義歯の装着によって引き起こされる顎堤吸収のメカニズム解明を目的として、加圧刺激を加えた 3 次元培養口腔粘膜モデル (three-dimensional oral mucosa model, 3DOMM) を組織学的・免疫組織化学的に検討し、3DOMM から放出される骨代謝に影響するサイトカインを定量的に分析する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

インフォームドコンセントを得た患者から採取した口腔粘膜を 2% antibiotic-antimycotic solution 含有 0.04% トリプシン溶液に浸漬しインキュベートした後、上皮細胞を分離し上皮細胞用培地 EpiLife[®] で培養を行った。残った結合組織から組織片培養法により線維芽細胞を獲得し、FBS 含有 D-MEM で培養を行った。実験には、上皮細胞は継代数 3~5、線維芽細胞は継代数 3~6 を用いた。

(2) 3DOMM の作成とサンプル回収・処理

まず、I 型コラーゲンゲル溶液 (新田ゼラチン) に線維芽細胞 5×10^5 を加え均一に混合した後、6well プレートのインサートに分注した無細胞 I 型コラーゲンゲル層の上に播種し、7 日間 FBS 含有 D-MEM で液相培養を行った。次に、その上に上皮細胞 5×10^5 を播種し EpiLife[®] で液相培養をさらに 7 日間続け、最後に、7 日間の気相 液相培養を行った。

加圧群の 3DOMM には、7 日間の気相 液相培養の間、独自に開発した培養細胞圧縮装置を使用して、50kPa の反復加圧刺激を負荷した。

加圧を開始した 2 日目、4 日目、6 日目で培養上清サンプルを回収し、-80 度で保存した。3DOMM を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋した。

(3) 培養上清サンプルの分析

骨代謝に影響を及ぼすサイトカインについて、Luminex[®] 200 xPONET[®] 3.1 システムにて解析後、paired t-test ($P < 0.05$) を用いて統計解析した。

MILLIPLEX[®] MAP Kit は以下のものを使用した。

RANKL (Human RANKL Magnetic Bead Single Plex Kit)

IL-18, OPG, IL-6, PTH (Human Bone Magnetic Bead Panel)
M-CSF, IL-11 (Human Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel)

(4) 3DOMM の組織学的・免疫組織化学的検討

4.5 μ m のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色にて 3DOMM の組織像を確認した。

まず 0.3%過酸化水素含有無水メタノールにて内因性ペルオキシダーゼブロックを行い、次に 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)を用いた熱処理による抗原賦活化を行い、5%ヤギ血清を用いた非特異的ブロックを行った後、anti-RANKL 抗体 (ウサギ、ポリクローナル抗体、abcam)を反応させた。インキュベート後、Envision + System HRP (DAKO)で標識し、DAB (DAKO)にて発色を行った。メチレンブルーにて対比染色を行い、3DOMM における RANKL の局在を免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 組織学的検討

ヘマトキシリン・エオジン染色では、非加圧群と加圧群の 3DOMM ともに線維芽細胞を混合したコラーゲンゲル上に角化層を有した重層扁平上皮が形成されていたが、組織構造において反復加圧刺激による顕著な違いは観察できなかった。

(2) 培養上清サンプルの分析

RANKL

3DOMM から培養上清中に放出された可溶性の sRANKL は、3DOMM 作成期間中の 2,4,6 日目の測定点において、加圧群・非加圧群ともにほとんど検出されなかった。一方、作成した 3DOMM を免疫組織化学的に検討した結果では、上皮基底層、有棘層において加圧群で RANKL の発現が増強していた。このことから、口腔粘膜上皮では、膜型 RANKL の発現が加圧刺激により亢進するものの、可溶性 RANKL の上昇に至っていないことが示唆された。ただし、可溶性 RANKL の放出量そのものがわずかであるのか、分泌されるものの、半減期が短い、あるいは、保存状態によるアーチファクトであるかについては、さらに検討が必要と思われる。

PTH と IL-11

3DOMM から培養上清中に放出された PTH と IL-11 は、3DOMM 作成期間中の 6 日目の測定点において、非加圧群に比べて加圧群で有意に増加した。

M-CSF

3DOMM から培養上清中に放出された M-CSF は、3DOMM 作成期間中の 2,4,6 日目の測定点において、非加圧群に比べてほと

んどの加圧群で減少する傾向がみられた。

IL-6

3DOMM から培養上清中に放出された IL-6 は、3DOMM は 6 日目の測定点において、非加圧群に比べてほとんどの加圧群で分泌が増加していたが、加圧群、非加圧群ともに経時的に減少する傾向がみられた。

インビトロ実験での骨代謝に対する IL-6 の影響に関する報告は一貫していない。IL-6 は破骨細胞を活性化し、骨芽細胞分化マーカーの発現を減少させることで骨形成を阻害するという報告の一方で、骨芽細胞分化を誘導するとの報告もある(Kaneshiro S et al. 2014)。さらには、IL-6 は機械的負荷による骨形成を引き起こすとも報告されている(Sims NA. 2016)。IL-6 は破骨細胞や骨芽細胞の分化や活性に影響することは確かだが、分泌により骨吸収へ転じるか骨形成へ転じるかどうかは、さらなる解明が必要である。

さらに、3DOMM の組織学的所見との関連性を検討したところ、3DOMM で上皮の重層化が良好なもので分泌が少なかった。IL-6 の増加が炎症性疾患の発生機序に関与していることや、3DOMM は放射線照射により基底細胞の配列の規則性を失い、IL-1 α や IL-8 といった炎症性サイトカインの分泌が有意に増加したという報告(Tobita T et al. 2010)があることから、IL-6 は上皮のコンディションにおけるバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

IL-18

3DOMM から培養上清中に放出された IL-18 は、3DOMM 作成期間中の 2,4,6 日目の測定点において、加圧刺激により増加した群と減少した群とが見られたが、経時的に放出量は増加する傾向がみられた。

OPG

3DOMM から培養上清中に放出された OPG は、3DOMM 作成期間中の 2,4,6 日目の測定点において、加圧群において増加したものと減少したものとが見られた。経時的に放出量の変化はほとんど認められなかった。

過去の研究において機械的刺激で線維芽細胞から放出される OPG は増加するとの報告がある(Jacobs C et al. 2015)一方で、減少するとの報告もあり(Kim SJ et al. 2013)、矛盾している。OPG は RANKL と RANK の結合を阻害することにより破骨細胞の分化と骨吸収機能を阻害するため、今後は相対的に解析する必要がある。

以上より、一般的に義歯の加圧刺激により歯槽骨吸収は促進されると言われているが、3DOMM に加圧刺激を加えることにより放

出された、骨代謝に関連するサイトカイン分泌量の増減は、骨吸収促進性を示唆するものと、抑制性を示唆するものがあり、一貫した傾向を示すことはなかった。これにより、3DOMM に対する加圧刺激が骨代謝に与える液性因子を論じる場合は、分泌量のバランスが肝要であることが示唆された。

一方、3DOMM では上皮細胞と線維芽細胞が存在するので、細胞間クロストークが起きている。意外にも、サイトカインの分泌量と 3DOMM 上皮再生の組織学的所見が関連していた。このことは、加圧刺激そのものよりも、加圧刺激を受けた結果による口腔粘膜の“病理組織学的”状態に、培養上清中に分泌されるサイトカイン量が左右される可能性が示唆された。

参考文献：

- 橋詰美里ら 日薬理誌 144:172-177 (2014)
臼井通彦ら 日歯周誌 57 (3):120-125 (2015)
Li M et al. (2016) Eur J Orthod, Vol.38, No.4
Lange U et al. (2015) J Rheum Dis Treat 1:1
Kaneshiro S et al. (2014) J Bone Miner Metab, 32:378-392
Kim SJ et al. (2013) Archives of oral biology, 58:707-716
Sims NA. (2016) Int J Biochem Cell Bio, 79:14-23
Kaku M et al. (2014) JOE. 40(3)
Jacobs C et al. (2015) Clin Oral Invest, 19:699-708
Mozzati M et al. (2013) Clin Oral Invest, 17:1259-1266
Takahashi N et al. (2014) BoneKEY Reports, 3: 495
Tobita T et al. (2010) Int J Oral Maxillofac Surg, 39:364-370

5．主な発表論文等

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/material/>

6．研究組織

(1)研究代表者

塩見 晶 (SHIOMI, Aki)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：80736653

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

泉 健次 (IZUMI, Kenji)