

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20440

研究課題名(和文) 機械的刺激による顎堤吸収に関する研究 - 補綴学的な顎堤保全を目指して -

研究課題名(英文) Study on residual ridge resorption by the mechanical stimulation for residual ridge maintenance in prosthetics

研究代表者

荒木 大介 (ARAKI, DAISUKE)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90733303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレスは骨のターンオーバーの調節に重要であることが知られているが、詳細なメカニズムは完全には明らかにされていない。私たちは先の研究で、義歯床下において破骨細胞による骨吸収が義歯床を介した機械的圧力が影響していることを報告している。本研究では、ラット口蓋歯肉線維芽細胞を用いて、メカニカルストレスによる種々のサイトカインの産生の変化と破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞を用いて、メカニカルストレスによる間接的な破骨細胞分化への影響を調査した。本研究によって、ラット歯肉線維芽細胞において周期的圧縮力がPGE2産生を促進し、破骨細胞分化を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Mechanical stress is known to be important for regulation of bone turnover, though the detailed mechanisms are not fully understood. We previously reported that osteoclastic bone resorption under the denture base has been influenced by mechanical force exerted through the denture base. The present study was undertaken to examine the effect of mechanical stress on the production of cytokines using rat gingival fibroblasts isolated from the palate and to examine the indirect effect of mechanical stress on osteoclast differentiation using RAW 264.7 cells as osteoclast precursors. It was revealed that cyclic compressive force promoted production of PGE2 and induced osteoclast differentiation in rat gingival fibroblasts

研究分野：歯科補綴学

キーワード：機械的刺激 メカニカルストレス 歯肉線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯の喪失による欠損部位において、歯槽骨吸収を抑制し、良好な顎堤を保全していくことは、患者満足度の高い補綴治療を提供する上で重要な課題である。超高齢社会において質の高い有床義歯治療が求められている。しかし、歯の喪失が高齢化したことに加え、残存顎堤の著しく少ない症例も多く見られるようになった。不適切な義歯を使用すること起因する骨吸収は、臨床的に広く認められる事実であるが、その詳細なメカニズムはいまだ明らかにされていない。一般的には義歯床を介した過度な咬合力を顎堤が負うことで骨吸収が生じると考えられている。一方、無重力下で機械的負荷の減った宇宙飛行士の骨格の骨量、骨密度の減少からわかるように、骨のリモデリングの調節には機械的刺激が重要であることが明らかである。機械的刺激に対する生体の応答を理解し、有利にコントロールすることによって、顎堤を保全することがこれからの補綴歯科臨床の目標の一つであると考えられる。

機械的刺激に対する細胞の応答として、破骨細胞様細胞や骨芽細胞様細胞に直接、機械的刺激を負荷し、骨吸収・骨形成を検討した研究が多くみられる。しかし、骨組織では骨細胞が圧センサーとして機能することが知られている。また歯科矯正力における骨のリモデリングにおいて、歯に加わる矯正力を歯根膜が感知し、歯根膜線維芽細胞が様々な因子を産生して制御しているとする報告がある。故に、機械的刺激に対する破骨細胞・骨芽細胞の制御は、直接的な機械的刺激による影響を考えるよりは、圧センサーとなる細胞が機械的刺激を受感することによって間接的に骨のリモデリングを制御していると考えられる。

ラットの臼歯部口蓋を対象とした病理組織学的研究において、実験義歯床を介した機械的圧縮刺激が粘膜固有層の圧扁、破骨細胞による骨吸収、粘膜固有層の炎症性細胞浸潤を惹起することを報告している。義歯床下の機械的刺激による骨吸収では、粘膜固有層の細胞が圧センサーとして機能していることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、in vitro における機械的刺激により顎骨吸収が生じる分子メカニズムを明らかにすることが目的である。また本研究では、様々な機械的刺激条件における経時的な細胞応答を検討することが新規であり、新たな知見（骨吸収が生じる条件と生じない条件）が得られるのではないかと想定している。本研究によって、機械的刺激に対する生体の応答を新たに理解できると確信する。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞と細胞培養

培養細胞として、6-8週齢のWistar系雄性ラットの口蓋歯肉より単離・培養したラット歯肉線維芽細胞（rGF細胞）と両側大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞、理化学研究所（埼玉、東京）から購入したマウス破骨細胞前駆細胞様細胞株RAW264.7細胞を使用した。本研究は岡山大学動物実験委員会の指針に従い同委員会の承認（No. OKU2012579）を得て行った。

rGF細胞は、10%ウシ胎仔血清（FBS）（Life technologies, Carlsbad, CA, USA）、2mM L-グルタミン（Life technologies）、炭酸水素ナトリウム（和光純薬工業、大阪、日本）を含むDulbecco's Modified Eagle's培地（DMEM）（日水製薬、東京、日本）にて、37℃、5%CO₂気相下で培養した。メカニカルストレスの負荷には継代数5~7代の細胞を用いた。RAW264.7細胞は、10%FBSを含むα-Minimum

Essential Medium (α -MEM: 和光純薬工業) を使用し, 37 °C, 5%CO₂ 気相下で培養した。破骨細胞への分化誘導には, 50 ng/ml soluble receptor activator of NF- κ B ligand (sRANKL) (オリエンタル酵母工業, 東京, 日本) を添加した。骨髄細胞は, 大腿骨と脛骨の骨端を切断し, 骨髄腔から無菌の 25 ゲージ針より α -MEM をゆっくりと注入し, 50ml 遠沈管にフラッシュアウトした。骨髄細胞懸濁液はパスツールピペットにて均一になるよう懸濁し, α -MEM にて 2 回洗浄した後, 20 ng/ml Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Peprotech, Rocky Hill, CT, USA) と 10%FBS を含む α -MEM (以下, 骨髄細胞の基本培地とする) にて再懸濁し, 24 ウェル細胞培養プレートに 1×10^6 個/ウェルの濃度で播種し, 37 °C, 5%CO₂ 気相下で培養した。培養 3 日後, 非接着細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて 2 回洗浄して除去し, 接着細胞を破骨細胞への分化に用いた。破骨細胞への分化誘導には, 100 ng/ml sRANKL を添加した。すべての細胞の培養液は培養 3 日毎に交換した。

(2) メカニカルストレスの負荷

メカニカルストレスには培養細胞伸展システム (STB-140, STREX 社, 大阪, 日本) を, 培養には 4 ウェルのシリコン膜チャンバー (STB-CH-4W) と 1 ウェルのシリコン膜チャンバー (STB-CH-04, STREX 社) (以下チャンバー) を用いた。



細胞接着性を高めるため, 細胞播種前に 0.05 mg/ml フィブロネクチン希釈液 (和光純薬工業) にてチャンバーをコーティングした。

チャンバー底面が完全に覆われるようにフィブロネクチン希釈液を 1 mL 注ぎ, CO₂ インキュベーター内で 37 °C にて 6 時間静置した。その後, 浮遊フィブロネクチンを取り除くため, PBS 溶液でチャンバーを 2 回洗浄した。このようにフィブロネクチン前処理を行ったチャンバーを装置に固定し, 伸展率 8% の状態で停止させ, rGF 細胞を播種した。この状態を圧縮率 0% とした。24 時間培養した後, チャンバーを伸展させていた力の解放と負荷を繰り返すことで, 圧縮率 7.4%, 1 分間に 10 往復 (0.167Hz) の頻度の一軸方向性の正弦波周期の圧縮刺激を 2 時間負荷した。

周期的圧縮刺激負荷後はチャンバーを前培養した圧縮率 0% の状態で装置を停止させ, 負荷終了後から様々な時間経過後に total RNA と培養上清を回収し, 続く解析や共培養に使用した。なお, 対照群は圧縮刺激負荷群と同一時間に伸展させていないシリコンチャンバー上に播種した rGF 細胞に対し周期的圧縮刺激を負荷することなく静的に培養したものとした。

(3) 細胞傷害性の検出

周期的圧縮刺激の細胞傷害性を調べるため, Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて, 周期的圧縮刺激を負荷した後, 12 時間後の培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。測定には, 吸光グレーティングマイクロプレートリーダー SH-1000 (コロナ電気, 茨城, 日本) を使用した。コントロールとして, 圧縮刺激を負荷しない未処理の正常 rGF 細胞から放出される LDH 活性 (低コントロール) と細胞溶解液の添加によって細胞中の放出可能な最大 LDH 活性 (高コントロール) を得た。圧縮刺激により放出された LDH 活性とコントロールから得られた LDH 活性を計算することで細胞傷害性を導いた。

(4) RAW264.7 細胞の破骨細胞分化

rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激の間接的な RAW264.7 細胞の破骨細胞分化への影響を調べるため、周期的圧縮刺激を負荷した rGF 細胞のコンディショントメディア (CM) を用いて RAW264.7 細胞を培養し、破骨細胞分化を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い評価した。

1 ウェルチャンバー上に rGF 細胞を 7.0×10^4 個/ウェルの濃度で播種し、24 時間の前培養を行った後、周期的圧縮刺激を負荷した。負荷後、圧縮率 0% の状態で装置を停止させ、負荷直後から 12 時間後に培養上清を回収した。

24 ウェル細胞培養プレートに RAW264.7 細胞を 1.5×10^4 個/ウェルの濃度でそれぞれ播種した。50 ng/ml sRANKL と全培養液に対し rGF 細胞の培養上清を 10% もしくは 30% 添加した CM (10% CM もしくは 30% CM) にて、6 日間培養し、6 日後に TRAP/ALP Stain kit (和光純薬工業) を用いてメーカーの指示する方法に従い、TRAP 染色を行った。光学顕微鏡にて破骨細胞数 (3 核以上) を測定した。

(5) 定量 RT-PCR 法

周期的圧縮刺激が、rGF 細胞の遺伝子発現に与える影響について、定量 RT-PCR 法を用いて評価した。Total RNA 抽出および精製には、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用いた。さらに PrimeScript® RT reagent Kit (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用いて、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。定量 RT-PCR は LightCycler™ system (Roche Diagnostics) と SYBR® Premix Ex Taq (タカラバイオ) を用いて Cyclooxygenase-2 (COX-2), Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) と骨代謝関連遺伝子である RANKL および Osteoprotegerin (OPG) 遺伝子の増幅産物を定量した。mRNA の発現量は、

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の発現量を用いて標準化した。

(6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

周期的圧縮刺激が rGF 細胞の Prostaglandin E₂ (PGE₂) 発現に与える影響について、ELISA 法を用いて評価した。PGE₂ ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) を用いてメーカーの指示する方法に従い、培養上清中の PGE₂ 量を測定した。

(7) COX-2 選択的阻害剤の影響

COX-2 選択的阻害剤 Celecoxib (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて、PGE₂ 産生抑制下での rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激による間接的な骨髄細胞の破骨細胞分化への影響を検討した。

1 ウェルチャンバー上に rGF 細胞を 7.0×10^4 個/ウェルの濃度で播種し、24 時間前培養した。その後、終濃度 10 μ M Celecoxib となるようジメチルスルホキシド (DMSO) にて溶解した Celecoxib 溶液を培地に 0.5% 添加した。対照群は DMSO を 0.5% 添加した。Celecoxib を添加した 1 時間後から周期的圧縮刺激を負荷した後、12 時間後の培養上清を回収した。M-CSF を含んだ培地で 3 日間培養したラット骨髄細胞に、100 ng/ml sRANKL と rGF 細胞の 30% CM にてさらに 3 日間培養した。対照には骨髄細胞の基本培地に、rGF 細胞の CM 中と同一となるよう Celecoxib 溶液もしくは DMSO のみを添加したものをを用いた。3 日後に破骨細胞分化を TRAP 染色にて評価した。

(8) 統計解析

すべての実験は少なくとも 2 回繰り返されて、類似した結果を得た。データ解析には、t 検定または、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後に Tukey 法を用いて多重比較を行った。統計学的有意差の検定には統計ソフト

(PASW Statistics 18 : SPSS Japan , 東京 , 日本) を用い , 有意水準は 1% または 5% とした。グラフは , 平均値 \pm S.D. で示した。

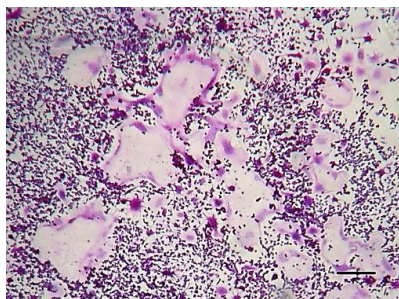
4 . 研究成果

(1) 周期的圧縮刺激の細胞傷害性

rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激 (圧縮率 7.4% , 0.167Hz , 2 時間) 負荷による細胞傷害性は , 3.23% だった。

(2) rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激の間接的な RAW264.7 細胞の破骨細胞分化への影響

sRANKL 存在下で周期的圧縮刺激を負荷していない CM にて培養した RAW264.7 細胞では , 対照群と比較して TRAP 陽性細胞数に差がなかった。一方 , 周期的圧縮刺激を負荷した CM にて培養することで , TRAP 陽性細胞数は有意に増加した。さらに周期的圧縮刺激を負荷した 30%CM では , TRAP 陽性細胞数はより増加し , 多核で巨大な細胞質を有する細胞が多く観察された。

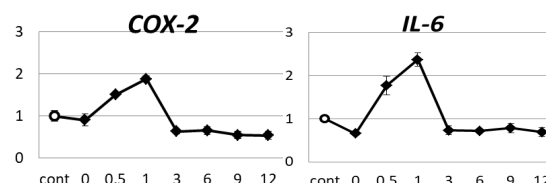


(3) 周期的圧縮刺激が rGF 細胞の遺伝子発現に与える影響

周期的圧縮刺激が , rGF 細胞における炎症関連遺伝子である COX-2 , IL-6 , TNF- α , IL-1 β と骨代謝関連遺伝子である RANKL および OPG の遺伝子発現に与える影響を , 定量 RT-PCR 法を用いて経時的に測定した静的培養状態である対照群と比較して , COX-2 と IL-6 の mRNA の発現は , 周期的圧縮刺激負荷後 1 時間以内に有意に増加した。COX-2 は , 3 時間後から 12 時間後まで対照群と比較して有意に減少したが , 3 時間後から 12 時間後の

群間内では有意差はなかった。

一方 , IL-6 は 3 時間後から 12 時間後までと対照群との群間内では有意差はなかった。TNF- α と IL-1 β の mRNA の発現は , 対照群とすべての負荷後の時間において群間内で有意差はなかった。OPG の mRNA 発現は対照群と比較して 9 時間後に有意に減少したのみだった。RANKL の mRNA 発現は rGF 細胞において検出できなかった。



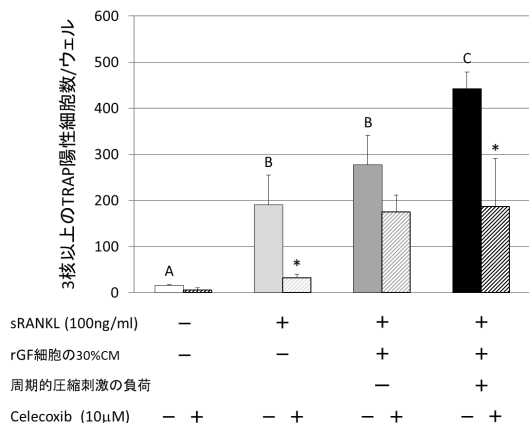
(4) 周期的圧縮刺激が rGF 細胞の PGE₂ 発現に与える影響

ELISA の結果から周期的圧縮刺激により PGE₂ 産生が有意に増加し , 負荷終了の直後と 12 時間後に 2 つのピークが見られた。静的培養状態である対照群は , 全時間で変化はなかった。12 時間後の産生量は , 圧縮刺激を負荷していないコントロールと比較して , およそ 10 倍である 10 ng/ml を示した。

(5) Celecoxib 添加後の rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激の間接的な骨髄細胞の破骨細胞分化への影響

sRANKL 存在下における骨髄細胞の破骨細胞分化は , RAW264.7 細胞の場合と比べて , いずれの条件の培地であっても巨大な細胞質を有する TRAP 陽性細胞が観察された。sRANKL 非存在下では , TRAP 陽性細胞はごくわずしか観察できなかった。骨髄細胞の基本培地では , TRAP 陽性細胞数は sRANKL 添加によって増加したが , さらに Celecoxib を添加することで有意に減少した。Celecoxib 非存在下において , 周期的圧縮刺激を負荷していない CM における TRAP 陽性細胞数は sRANKL を添加した骨髄細胞の基本培地における場合と有意差を認めなかった。一方 , 周期的圧縮刺激を

負荷した CM では、sRANKL を添加した骨髄細胞の基本培地 における場合と比較して TRAP 陽性細胞数は有意に増加したが、Celecoxib 添加によって有意に減少した。ただし、Celecoxib 存在下の CM では、周期的圧縮刺激の有無に関わらず TRAP 陽性細胞の誘導が完全に抑制されることはなかった。



rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激を負荷した CM 中には、破骨細胞分化を促進する因子が含まれており、周期的圧縮刺激は COX-2 と IL-6 の遺伝子発現と PGE₂ 産生を促進することが明らかになった。また、COX-2 阻害剤により周期的圧縮刺激による破骨細胞分化誘導が抑制された。以上のことから、rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激は PGE₂ を介して、破骨細胞分化を誘導する可能性が示唆された。

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 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

荒木 大介 (ARAKI, Daisuke)
 岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：90733303