

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18592252
 研究課題名（和文） Relaxin がヒト歯根膜線維芽細胞の細胞外マトリックス代謝に及ぼす影響
 研究課題名（英文） Effects of relaxin on collagen metabolism by human periodontal ligament cells
 研究代表者
 山口 大（YAMAGUCHI MASARU）
 日本大学・松戸歯学部・准教授
 研究者番号：60333100

研究成果の概要：伸展された歯根膜細胞に relaxin 刺激を行った結果， Col-I タンパク産生量および mRNA 発現量は relaxin 濃度依存的に減少が認められたが，MMP-1 の発現量は濃度依存的に増加が認められた。relaxin が伸展されたヒト歯根膜細胞における Col-I と MMP-1 の発現に影響を与えたことより，このホルモンが矯正治療後の後戻りを防止するのに有効である可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

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：Relaxin, ヒト歯根膜線維芽細胞, 細胞外マトリックス代謝, 伸展力

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科臨床において矯正装置除去後，少なからず後戻りが見られる場合がある。特に捻転歯は矯正治療後，長期保定を行っても後戻りが見られることが多い。最近，後戻りの局所的原因の一つとして，コラーゲン，エラスチンなどの線維が，矯正力に抵抗するために増生したことで，元の位置を”memory”し，後戻りが生じると報告され，それには歯根膜線維のリモデリングが関与していると報告されている。

relaxin は，構造的にインスリン/relaxin ファミリーのペプチドホルモン群に属し，

leucine-rich の繰り返し構造をもつ 2 種類の G 蛋白質共役受容体（LGR7, LGR8）に結合することが知られている。コラーゲナーゼの放出によってコラーゲンを破壊する作用を持つホルモンで，主に妊娠中の哺乳類にみられ分娩時に子宮頸管を柔らかくする。さらに relaxin は男性，女性ともに存在し，コラーゲン代謝，抗線維化，新脈管形成（腎臓や肺の末梢血管を拡張させて血流量を増加させる）をするなどの生理学的作用を持つことが知られている。また relaxin が歯根膜を介し矯正治療による歯の動きに影響する可能性が考えられるとも報告されている。

歯根膜は主に型コラーゲン (Col-I) と型コラーゲン (Col-III) から成る。歯根膜の恒常性の維持はコラーゲンと matrix metalloproteinase (MMP) の相互作用による。MMP は、細胞外器質の構成成分の多くを分解する。また組織修復や恒常性の維持には、コラーゲンの遺伝子発現と MMP の遺伝子発現が重要である。これらの遺伝子の相互作用の恒常性が保たれなかった場合には、Col-I の過剰分泌によるケロイド症や MMP の過剰分泌による皮膚潰瘍症といった病的症状が生じる。そこで、捻転歯の矯正治療後の後戻り防止策の研究の一環として、ヒト歯根膜における relaxin の作用に関する研究を計画し、*in vitro* におけるヒト歯根膜細胞の relaxin receptor の有無、relaxin がヒト歯根膜線維芽細胞のコラーゲン代謝に及ぼす影響を Col-I, Col-III, MMP-1 について検討した。また捻転歯モデルとして細胞伸展を行い、それらにおける relaxin の影響について Col-I, MMP-1 について検討した。

2. 研究の目的

(1) 捻転歯の矯正治療後の後戻り防止策の研究の一環として、ヒト歯根膜における relaxin (RLX) の作用に関する研究を計画し、*in vitro* におけるヒト歯根膜細胞の relaxin receptor の有無、relaxin がヒト歯根膜線維芽細胞のコラーゲン代謝に及ぼす影響を type I collagen (Col-I), type III collagen (Col-III), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) について検討する。

(2) 捻転歯モデルとして細胞伸展を行い、それらにおける RLX の影響について Col-I, MMP-1 について検討する。

(3) さらに、正中口蓋縫合拡大後の RLX 注入による後戻り抑制効果を究明するためにラットの正中口蓋縫合拡大後に RLX を注入し、拡大後の後戻り量の比較検討と拡大時の Col-I と MMP-1 の分布頻度について免疫組織化学的および画像解析法を用いて検討を行う。

3. 研究の方法

実験には、ヒト歯根膜細胞を用い relaxin 受容体である LGR7, 8 の存在を、免疫組織染色および Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて検討した。またヒト歯根膜細胞に relaxin 刺激を行い Col-I, Col-III, MMP-1 のタンパク発現を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて、mRNA 発現を real-time PCR 法にて検討した。さらに捻転歯モデルとして歯根膜細胞の伸展を行い、その時のタンパク発現および mRNA 発現を ELISA 法および real-time PCR 法にて検討を行った (Fig. 1)。

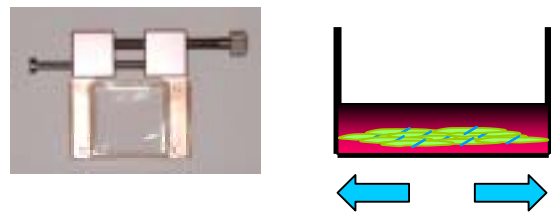


Fig. 1 STREX system (STB-10, STREX Co.)

実験には体重約 180 g, 6 週齢の Wistar 雄性ラットを 24 匹用い、偽薬注入群 (対照群) 12 匹と RLX 注入群 (実験群) 12 匹とにグループ分けした。ツイードループペンディングプライヤーを用い、太さ約 0.5mm のラウンドステンレススチールワイヤーをらせん状に屈曲し厚さ 1.5mm の金属リングを作製した。上顎左右切歯間に厚さ 1.5mm の金属リングを挿入固定し、切歯を離開させることによって間接的に正中口蓋縫合部を拡大した (Fig. 2)。



Fig. 2. 正中口蓋縫合部の拡大

口蓋の計測点は、上顎両側第一臼歯舌側齒頸部間距離とし、幅径の測定は装置装着 7 日後に行った。拡大後、装置を除去し縫合部に注射器を用いて偽薬 (20 mmol / l 酢酸ナトリウム) と recombinant human RLX-2 (80 µg / ml in PBS, PEPROTECH, France) とそれぞれ注入量 3.2 µg / 40 µl を 4 回に分けて正中口蓋縫合部へ注入した。装置除去後の 1, 3, 7, 14 日における後戻り量の経時的变化と組織学的変化を観察した。口蓋骨を摘出し EDTA で脱灰を施した後、パラフィン切片を作製して H. E 染色並びに免疫組織化学染色、画像解析法を行った。

4. 研究成果

実験には、ヒト歯根膜細胞を用い relaxin 受容体である LGR7, 8 の存在を、免疫組織染色および Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて検討した。またヒト歯根膜細胞に relaxin 刺激を行い Col-1, Col-III, MMP-1 のタンパク発現を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて、mRNA 発現を real-time PCR 法にて検討した。さらに捻転歯モデルとして歯根膜細胞の伸展を行い、その時のタンパク発現および mRNA 発現を ELISA 法および real-time PCR 法にて検討を行った。

免疫染色および RT-PCR によって、ヒト歯根膜細胞に LGR7, LGR8 の発現が認められた (Fig. 3)。

relaxin 刺激後 (1ng/ml-100ng/ml, 48 時間), Col-1 タンパク産生量および mRNA 発現量は relaxin 濃度依存的に減少が認められた。一方, MMP-1 のタンパク産生量および mRNA 発現量は relaxin 濃度依存的に増加が認められた。

細胞伸展を行った結果, Col-1 と MMP-1 共のタンパク産生量および mRNA 発現量が増加した。さらに細胞伸展後、relaxin 刺激を行った結果, Col-1 タンパク産生量および mRNA 発現量は relaxin 濃度依存的に減少が認められたが, MMP-1 のタンパク産生量および mRNA 発現量は relaxin 濃度依存的に増加が認められた (Figs. 4 and 5)。

拡大量は実験群で 0.37 ± 0.05 mm, 対照群で 0.32 ± 0.08 mm の拡大量を認めた。対照群と実験群を比較すると後戻り量はいずれの群においても実験群が低値を示し, 有意差が認められた (Fig. 6)。Type I collagen, MMP-1 はともに線維芽細胞, 縫合部結合組織, ならびに骨芽細胞に陽性所見を示した (Fig. 7)。Type I collagen と MMP-1 の染色面積の測定に関してはラット正中口蓋縫合部の陽性コントロールを基準とし, 濃染されている面積について Image-Pro Plus software (version 5.0: Media Cybernetics, Maryland, USA) を用いて測定を行い以下の計算式で面積率 (%) を算出した。

面積率 (%) = (縫合部の陽性面積 / 縫合部の総面積) × 100

Type I collagen での対照群陽性部位面積率は, 1 日群と比較し 3, 7 日群では経時的に減少していたが 14 日群では 7 日群と同等の値を示した。実験群陽性部位面積率は, 1 日群から 3, 7 日群と大幅に減少し 14 日群まで経時的に減少を認めた。MMP-1 での対照群陽性部位面積率は, 全群を通して経時的に減少傾向を示した。実験群陽性部位面積率は, 1, 3, 7 日群で同等の値を示し 14 日群では僅少の減少を認めたが, 陽性細胞の面積率は全期間を

通して一定に保たれていた。Type I collagen の面積の測定において対照群では 1 日群から 3 日群にかけて減少傾向が認められたが 7, 14 日群では変化が認められなかったことから collagen 代謝が抑制されていることが示唆された (Fig. 8)。一方, 実験群では 1 日群から 3, 7 日群で大幅な減少を認めその後経時的に減少を認めた。これらの結果は, 実験群において全期間を通し増加した MMP-1 が, type I collagen の分解に関与しているものと推測される。本実験結果では対照群と比較して実験群で, MMP-1 が経時的に増加した結果 type I collagen の分解がおり, 抗線維化作用を示したことにより拡大装置除去後の後戻りの減少がみられたと考えられる (Fig. 9)。

以上の結果より, relaxin がヒト歯根膜細胞における Col-1 と MMP-1 の発現に影響を与えたことより, このホルモンが矯正治療後の後戻りを防止するのに有効である可能性が示唆された。

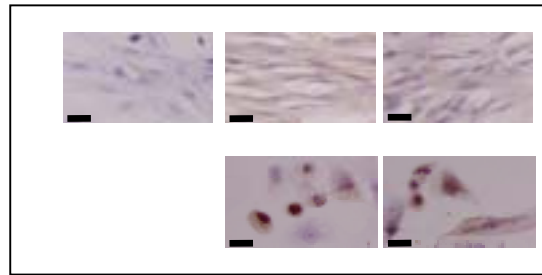


Fig. 3A. Immunocytochemical staining of hPDL cells (× 100).

Lack of staining of the isotype matched control indicates that the immunocytochemistry assay was reliable. The high-powered view reveals the presence of LGR7 and LGR8 in hPDL cells and human uterus endometrial epithelial cells by positive brown staining of anti LGR7 and LGR8 antibodies. Bar =20 μm.

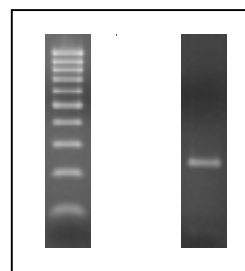


Fig. 3B. Gene expression of LGR-7 and LGR-8 in hPDL cells determined by RT-PCR.

The clear band at 244 bp represents LGR7, while LGR8 is shown at 241bp.

Col-I release (µg/ml)

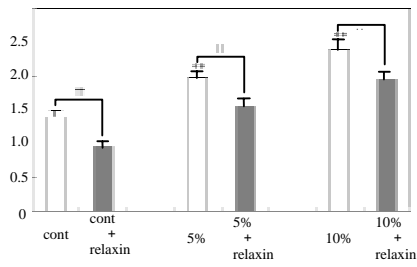


Fig. 4A. Release of Col-I in stretched hPDL cells treated with relaxin.

Relative Quantity

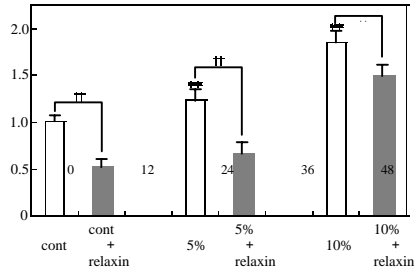


Fig.4B. Gene expression of Col-I in stretched hPDL cells treated with relaxin.

The release (Fig.4A) and gene expression (Fig.4B) of Col-I were increased following application of 5% and 10% tension-force for 12 hours as compared with the control cells (p<0.05, Tukey test, Asterisk (**) indicates p<0.01), which occurred in a magnitude-dependent manner (p<0.05, ANOVA). Further, relaxin (100 ng/ml, 48 hours) decreased the release (Fig.5A) and gene expression (Fig.5B) of Col-I from the 5% and 10% stretched hPDL cells as compared with the corresponding control cells (p<0.05, Tukey test, Asterisk (*) indicates p<0.01), which also occurred in a magnitude-dependent manner (p<0.05, ANOVA).

Col-I release (µg/ml)

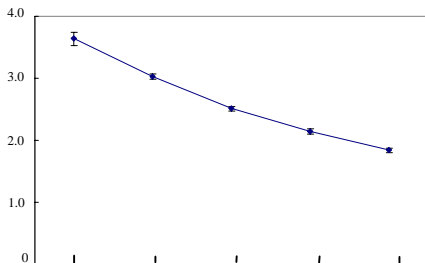


Fig. 4C. Time course effect of relaxin on release of Col-I in stretched hPDL
When stretched (10%) hPDL cells were treated with relaxin, Col-I release was decreased in a time-dependent manner for 48 hours (p<0.05, ANOVA). The value for the stretched cells at 48 hours was significantly decreased, as compared with that for 0 hour (p<0.05, Tukey test). Asterisk (**) indicates p<0.01.

MMP-1 release (ng/ml)

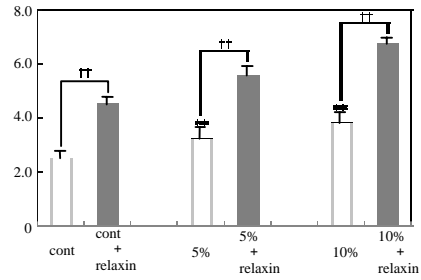


Fig. 5A. Release of MMP-1 in stretched hPDL cells treated with

Relative Quantity

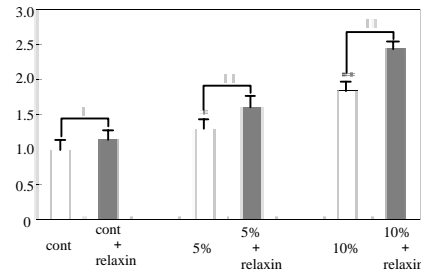


Fig. 5B. Gene expression of MMP-1 in stretched hPDL cells treated with

The release (Fig.5A) and gene expression (Fig.5B) of MMP-1 was increased following application of 5% and 10% tension-force for 12 hours as compared with the control cells (p<0.05, Tukey test, Asterisk (*) indicates p<0.05, (**) indicates p<0.01), which occurred in a magnitude-dependent manner (p<0.05, ANOVA). Further, relaxin (100 ng/ml, 48 hours) increased the release (Fig.6a) and gene expression (Fig.6b) of MMP-1 in the 5% and 10% stretched hPDL cells as compared with the corresponding control cells (p<0.05, Tukey test, Asterisk (*) indicates p<0.01), which also occurred in a magnitude-dependent manner (p<0.05, ANOVA).

MMP-1 release (ng/ml)

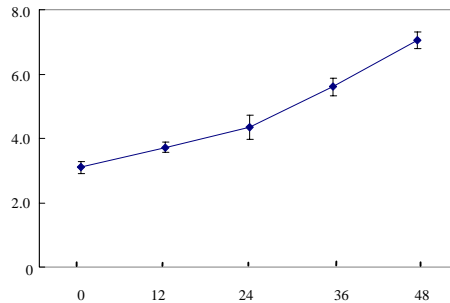


Fig. 5C. Time course effect of relaxin on release of MMP-1 in stretched hPDL cells.

When stretched (10%) hPDL cells were treated with relaxin, MMP-1 release was increased in a time-dependent manner for 48 hours (p<0.05, ANOVA). The value for the stretched cells at 48 hours was significantly increased, as compared with that for 0 hour (p<0.05, Tukey test). Asterisk (**) indicates p<0.01.

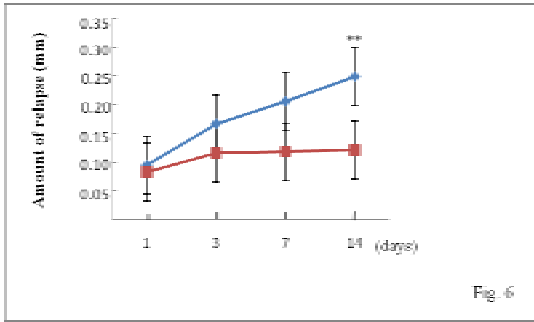


Fig. 6 Amount of relapse after the removal of appliance by RLX injection (** p<0.01) (t-test)

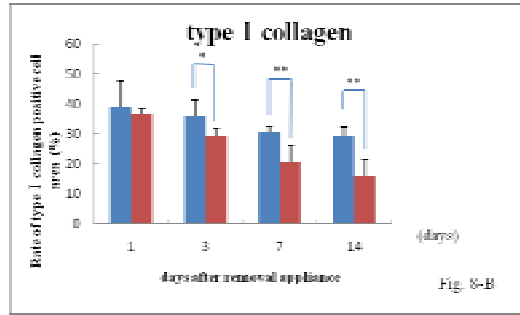


Fig. 8-B Rate of type I collagen positive cell area after the removal of appliance by RLX injection (%) (* p<0.05, ** p<0.01) (t-test)

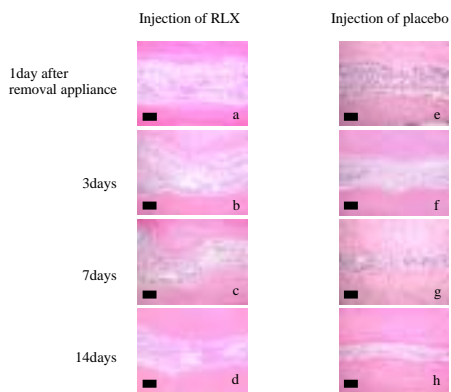


Fig. 7 Histopathological findings (H-E) in rat expanded midpalatal suture by RLX injection (bar : 50 µm) a-d : control group e-h : experimental group

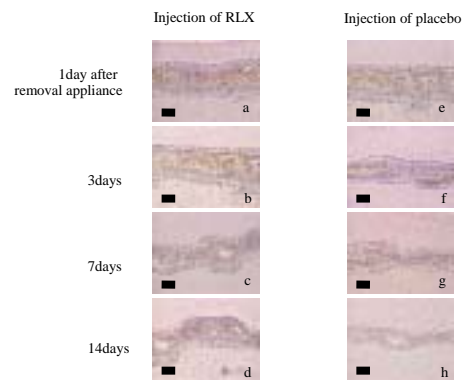


Fig. 9-A Immunohistochemical localization of MMP1 in rat expanded midpalatal suture by RLX injection (bar : 50 µm) a-d : control group e-h : experimental group

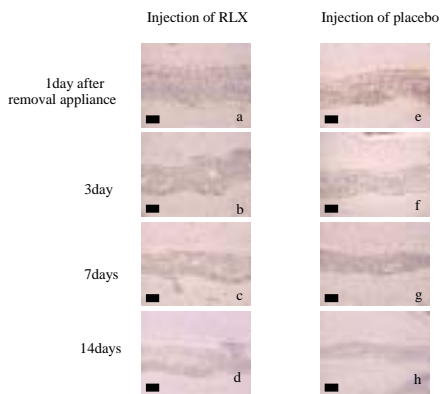


Fig. 8-A Immunohistochemical localization of type I collagen in rat expanded midpalatal suture by RLX injection (bar : 50 µm) a-d : control group e-h : experimental group

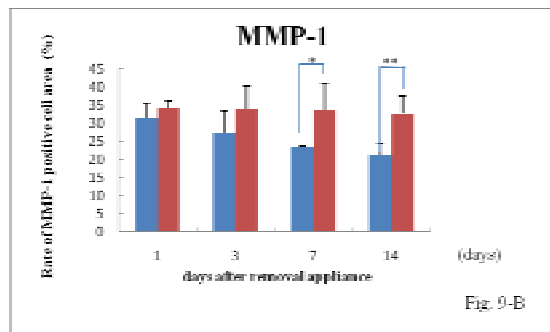


Fig. 9-B Rate of MMP-1 positive cell area after the removal of appliance by RLX injection (%) (* p<0.05, ** p<0.01) (t-test)

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 4 件)

Takano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Kojima T, Kasai K. Effects of relaxin on collagen type I released by stretched human periodontal ligament cells. Orthod Craniofacial Res. 査読有, in press.

Kubo R, Utsunomiya T, Yamaguchi M. Histopathological Study of Inhibitory Effects for Relapse by Relaxin after Expansion in Rat Midpalatal Suture. Int J Oral-Med Sci, 査読有, in press.

Takano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Kojima T, Kasai K. Relaxin modulates collagen type I and metalloproteinase-1 expression by human periodontal ligament cells. J Oral Bioscience. 査読有, 50 (4), 222-229, 2008.

Yamaguchi M, Kubo R, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Immunohistochemical localization of relaxin in rat periodontal ligament, dental pulp tissue, and midpalatal suture. Int J Oral-Med Sci, 査読有, 7, 35-39, 2008.

[学会発表](計 5 件)

高野 真知、山口 大、中嶋 亮、藤田 祥仁、児島 格、葛西 一貴、Relaxin がヒト歯根膜由来細胞のコラーゲン代謝に及ぼす影響、第 50 回 歯科基礎医学会学術大会、2008.9.23, 東京.

Takano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Kojima T, Kasai K. Relaxin modulates collagen type I and matrix metalloproteinase-1 expression by human periodontal ligament cells. 86th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Reserch. July 4, 2008. Toronto, Canada.

高野 真知、中嶋 亮、児島 格、山口 大、葛西 一貴。
ヒト歯根膜由来細胞における LGR7, LGR8 発現の検討、
第 66 回日本矯正歯科学会大会、
2007.9.20, 大阪.

久保 利枝、山口 大、宇都宮 忠彦、山本 浩嗣、葛西 一貴。
ラット正中口蓋縫合拡大による relaxin 発現と Type collagen 発現の変化について、
第 66 回日本矯正歯科学会大会、
2007.9.20, 大阪.

久保 利枝、山口 大、兼川 美香、宇都宮 忠彦、山本 浩嗣、葛西 一貴。
ラット正中口蓋縫合拡大による relaxin 発現の変化について、
第 65 回日本矯正歯科学会大会、
2006.9.14, 札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 大 (YAMAGUCHI MASARU)
日本大学・松戸歯学部・准教授
研究者番号：60333100