

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791586

研究課題名(和文)メカニカルストレスによる骨代謝に対する神経ペプチドの制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the neural regulation of the bone metabolism under the mechanical stress.

研究代表者

黒石 加代子(中尾 加代子)(KUROISHI KAYOKO)

九州歯科大学・歯学科・助教

研究者番号：60468303

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレスによる骨代謝に対する神経ペプチドの制御機構の解析のために、神経ペプチドと関連のあるオステオアクチビン(OA)についてヒト歯根膜線維芽細胞について調べた。ラットの臼歯に実験的矯正力を加えたとき、OAは歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、および破骨細胞に発現した。歯根膜線維芽細胞に伸展力を加えるとOAの免疫陽性細胞は減少した。これらの結果より伸展力によってOAの細胞外ドメインが遊離して、伸展側の骨芽細胞に作用し骨形成を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To analyze the neural regulation of the bone metabolism under the mechanical stress, we investigated the role of osteoactivin (OA) in the human periodontal ligament (HPDL) cells. When the mechanical stress was loaded to the rat molar, OA appeared in the HPDL cells, osteoblasts, and osteoclasts. When HPDL cells were given the tension force, the immunoreactivity of OA was reduced. These results suggested that tension forces induced the release of extracellular domain of OA, resulting in the stimulation of bone formation at the tension side.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1690,000
2009年度	900,000	270,000	1170,000
2010年度	900,000	270,000	1170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：メカニカルストレス、神経、歯根膜線維芽細胞、オステオアクチビン、骨形成

1. 研究開始当初の背景

我々は以前より知覚神経ペプチドがどのように骨代謝に影響を及ぼすかについて調べてきた。そして、骨組織の細胞にも神経ペプチドのレセプターが存在し、神経ペプチドが直接的に骨代謝に影響を及ぼしている事

を示してきた。

一方、今までに多くの研究がメカニカルストレスは骨代謝にどのような影響があるかについて行われて来たが、メカニカルストレスを加えたときに生じる疼痛に関連した神経ペプチドが、そのような状況下でどのよう

に影響しているかについては全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は神経ペプチドに関連し、かつ骨形成に関連するオステオアクチビンについて、ラット臼歯に実験的歯牙移動を行った場合のオステオアクチビンの局在と、歯根膜線維芽細胞に伸展力を加えたときのオステオアクチビンの発現の変化を調べることが目的とした。

3. 研究の方法

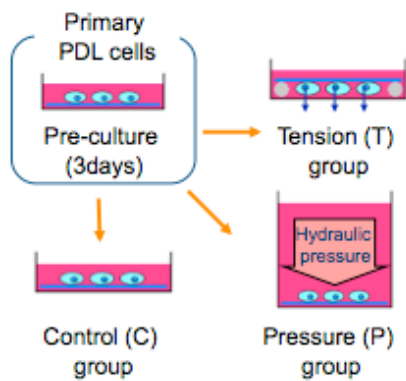
(1)動物実験

ラット上顎第一第二臼歯間に矯正用ゴムを挿入し、実験的歯牙移動を行った。経時的に組織を固定し、歯周組織を取り出し、クライオスタットにて凍結組織切片を作成した。抗ラットオステオアクチビン抗体を作用させ、二次抗体にHRP結合抗ウサギIgGを反応させた。発色はDABを用いた。

(2)培養ヒト歯根膜線維芽細胞を用いた実験

歯科矯正治療で便宜抜去した歯の歯根膜を分離培養し、ヒト歯根膜線維芽細胞として用いた。

ヒト歯根膜線維芽細胞を培養し、培養液を増加させることによって圧迫力を、また、スライドグラス上に培養したヒト歯根膜線維芽細胞を逆さまにして培養する事により伸展力加えたモデルとし、通常培養のものを対照群として比較検討した(下図参照)。



培養後、細胞を固定し抗オステオアクチビン抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

次に、培養後 mRNA を回収し、逆転写を行い cDNA を作成した。オステオアクチビンと GAPDH のプライマーを用いて半定量的 RT-PCR を行った。また、定量的 PCR として real-time PCR も行った。

培養時に、培養 dish の中央に角形ステンレスワイヤーをおいて培養し、細胞が増えた時点でワイヤーを外し、そのワイヤーがあった細胞のない所にどの程度のスピードで細胞が遊走してくるかを調べ、その遊走に対してオステオアクチビンがどのように関係す

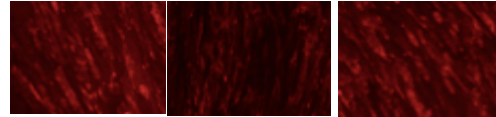
るかについて調べた。

4. 研究成果

(1)歯周組織のオステオアクチビンの局在について

オステオアクチビンは歯根膜細胞のみならず、圧迫側の破骨細胞、牽引側の骨芽細胞にも局在が認められた。

(2)ヒト歯根膜細胞のオステオアクチビン免疫陽性細胞の発現変化



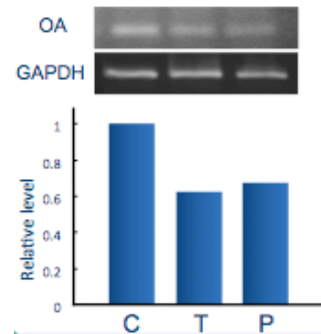
対照群 伸展群 圧迫群

上図に示す様に、対照群と圧迫群ではあまり変化が認められなかったが、伸展群では免疫陽性細胞の数が減少した。

(3)ヒト歯根膜細胞のオステオアクチビン mRNA の発現変化

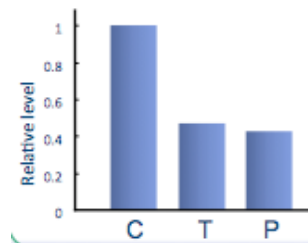
対照群(C)に比べ伸展群(T), 圧迫群(P)ともに発現量が減少した。

半定量的 PCR と Real-time PCR の結果を示す。



半定量的 PCR

	OA/GAPDH	Relative level
C	2.986	1.00
T	1.400	0.47
P	1.266	0.42

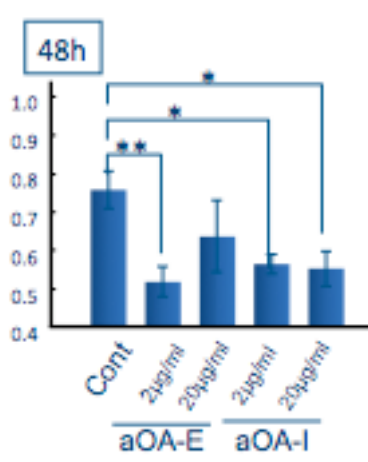


Real-time PCR

(4)細胞遊走に対するオステオアクチビンの影響

抗オステオアクチビン抗体を加える事によって細胞遊走が促進した。

(aOA-E; 抗オステオアクチビン細胞外ドメイン抗体、aOA-I: 抗オステオアクチビン細胞内ドメイン抗体)



以上結果により、オステオアクチビンは歯根膜線維芽細胞のみならず骨芽細胞、破骨細胞にも発現すること、伸展力によりヒト歯根膜線維芽細胞の発現が減少すること、また、伸展力、圧迫力によりオステオアクチビンのm-RNAの発現が減少することが明らかとなった。また、オステオアクチビンの中和抗体を加える事により、ヒト歯根膜線維芽細胞の遊走が促進されることが明らかとなった。

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 11 件)

1. Kawata K, Kuroishi K, Kobayashi S T, Goto T; Osteoactivin Expression in Periodontal Cells Subject to Orthodontic Forces. JADR, 2010.11.20, 21, Kokura, Kitakyushu.

2. Nakao K, Goto T, Gunjigake K, Fukuda A, Kobayashi S, Yamaguchi K; Osteoactivin expression in human periodontal ligament fibroblasts under mechanical loading. International Association for Dental

Research, 2010.07.14~17, Barcelona, Spain.

3. Fukuda A, Goto T, Nakao K, Gunjigake K, Kataoka S, Kurata S, Kobayashi S, Yamaguchi K
The role of hemokinin-1 in osteoclast formation. International Association for Dental Research, 2010.07.14~17, Barcelona, Spain

4. 福田文、後藤哲哉、黒石加代子、郡司掛香織、片岡真司、蔵田清香、小林繁、山口和憲；破骨細胞形成におけるヘモキニン-1 (HK-1) の役割について。第70回九州歯科学会、2010.05.23、北九州。

5. Nakao K, Goto T, Gunjigake K, Fukuda A, Kobayashi S, Yamaguchi K; Mechanical loading modulates the expression of osteoactivin in periodontal tissue. JADR 57th annual Meeting, 2nd Meeting of PAPF and 1st Meeting of APR, September 22-24, 2009, Wuhan, China,.

6. 中尾加代子、後藤哲哉、郡司掛香織、福田文、木尾哲朗、小林 繁、山口和憲；ヒト歯根膜線維芽細胞のosteoactivinの発現に対するメカニカルストレスの影響。第68回日本矯正歯科学会、平成21年11月16~18日、福岡市。

7. 後藤哲哉、中尾加代子、郡司掛香織、市木貴子、片岡真司、小林 繁；ヒト歯根膜線維芽細胞におけるosteoactivinの発現について。第51回歯科基礎医学会総会、平成21年9月9~11日、新潟市。

8. 市木貴子、後藤哲哉、森川和政、郡司掛香織、中尾加代子、小林 繁；Neurokinin Bとラット破骨細胞の関連について。第69回九州歯科学会、平成21年5月30、31日、北九州市。

9. Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Yamamura M, Kobayashi S, Yamaguchi K: Hypoxia decreases the osteogenic activity of human periodontal ligament cells. 86th IADR, 2008 July 2-5, Toronto, Canada.

10. 市木貴子、森川和政、中尾加世子、郡司掛香織、小林 繁、後藤哲哉：ラット破骨細胞におけるニューロキニンレセプターの発現について。第 68 回九州歯科学会、平成 20 年 5 月 31、6 月 1 日、北九州市。

11. 市木貴子、後藤哲哉、森川和政、中尾加世子、郡司掛香織、小林 繁：神経ペプチド・タキキニンとラット破骨細胞の関連について。第 50 回歯科基礎医学会総会、平成 20 年 9 月 23-25 日、有明、東京。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒石加代子 (KUROISHI KAYOKO)

九州歯科大学・歯学科・助教

研究者番号：60468303