

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18594

研究課題名（和文）血管の偏在による局所的低酸素が歯根膜の線維形成に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）Effect of local hypoxia due to uneven distribution of blood vessels on fibrogenesis of periodontal ligament

研究代表者

河村 篤志（Kawamura, Atsushi）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：90645889

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：咬合機能の維持・回復には、歯根膜の組織特性の理解が不可欠である。これまでの研究から、歯根膜細胞は部位特異的な特徴を有する不均一な組織であることが間接的に示唆されているが、その詳細と制御メカニズムについては依然として不明である。本研究では血管構造に乏しいセメント質近傍における歯根膜線維の成熟度が高い現象に着目し、低酸素に起因する線維形成の活性化が、歯根膜組織の部位特異性を生み出している可能性を明らかにすることを目的とする。歯根膜の部位特異性の理解は、補綴処置に付随して歯周組織に生じる、様々な臨床症状を生物学的に理解するための基礎的情報として極めて重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は歯根膜組織における低酸素状態が線維形成に及ぼす影響を理解することであり、線維構造の検出と定量解析において一定の成果を得ることが出来た。補綴処置に付随して歯周組織に生じる臨床症状を生物学的に理解するための基礎的情報として、極めて重要であり臨床/学術的に高い意義を有している。

研究成果の概要（英文）：Understanding the tissue characteristics of the periodontal ligament (PDL) is essential for maintaining occlusal function. Previous studies have indirectly suggested that PDL cells are heterogeneous with site-specific characteristics, but their details and regulatory mechanisms remain unclear. In this study, we focused on the high maturity of PDL fibers in the vicinity of cementum, which has poor vascular structure. It is possible that collagenous fiber maturation caused by low oxygen produces site-specificity of the PDL. Understanding the site-specificity of the PDL is extremely important as basic information for biologically understanding the various clinical symptoms associated with prosthetic procedures.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯根膜 歯根膜線維 部位特異性 低酸素

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯と歯槽骨の間に介在する非石灰化組織であり、咬合機能において重要な役割を果たしている。近年の研究から、歯根膜組織の細胞構成や線維の特性は一様ではなく、部位によって異なる性質を有することが明らかとなりつつある。セメント質-歯槽骨軸における違いとしては、硬組織界面と歯根膜中央部における発現転写因子の差異や (Takimoto et al. *Development*. 2015), 咬合力にตอบสนองするコラーゲン修飾酵素発現のセメント質側と歯槽骨側における差異 (Kaku et al. *J Cell Physiol*. 2016) が報告されているだけでなく、歯頸部-歯根尖軸における違いとしては線維の密度が歯頸部や根尖部と比べて歯根中央部で疎であることが報告されている (Naveh et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018)。またこれらの特徴は咬合力によっても変化することが指摘されていることから、臨床的にも歯根膜の病態を適切に診断するために、歯根膜の部位特異性を理解することは極めて重要である。

正常マウス歯周組織において、血管に乏しいセメント質近傍では線維構造が密である一方、血管の豊富な根分岐部の歯根膜ではコラーゲン線維の成熟度が極めて低い (Fig. 1)。一般に組織中の血管に乏しい部位は低酸素状態となることから、低酸素感受性分子である Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) の発現が亢進することが知られている。HIF-1 は TGF β の産生による Smad 経路の活性化を介して線維形成を促進することから、その結果として密な線維形成が生じると考えられる。実際に、がん組織や、創傷治癒過程における組織中の低酸素状態が、HIF-1 の発現を介して線維形成に影響を及ぼすメカニズムが明らかになっていることから (Masoud et al. *Acta Pharm Sin B*. 2015, Mingyuan et al. *Oncotarget*. 2017), 歯根膜組織においても低酸素状態が線維形成に影響を及ぼしている可能性が強く推察される (Fig. 2)。

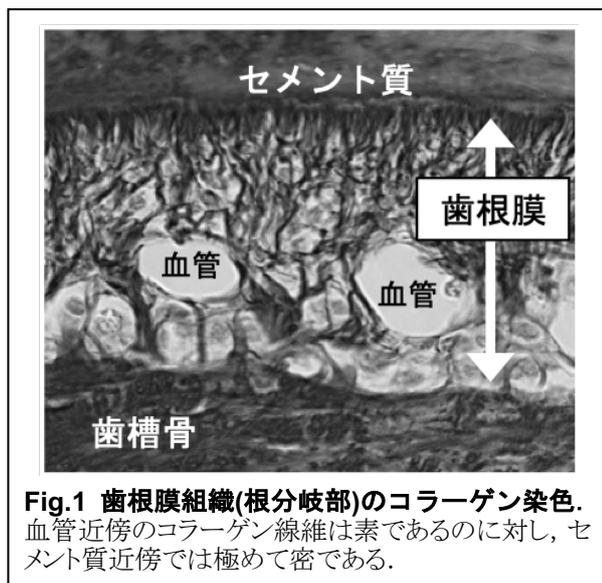


Fig.1 歯根膜組織(根分岐部)のコラーゲン染色. 血管近傍のコラーゲン線維は素であるのに対し、セメント質近傍では極めて密である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯根膜線維の部位特異性を生み出す解剖学的特徴と、これを制御する分子的背景を明らかにするため、血管の偏在によって生じる組織中の酸素分圧勾配と、低酸素に誘導される線維形成の活性化メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜における低酸素状態と HIF-1 の発現ならびに血管構造の組織学的検索

歯根膜組織における低酸素状態の検出には組織低酸素プローブとして実績の高い Hypoxyprobe™ システムを用いた。低酸素細胞に集積する Pimonidazole を野生型マウス (C57BL/6, 雄性, 8 週齢) に腹腔内投与した。投与から 24 時間後に上顎歯周組織を摘出し、パラフィン包埋組織標本を作成した。anti-Pimonidazole 抗体により Pimonidazole が取り込まれた低酸素部位の検出を行い、血管の検出には anti-CD31 抗体, anti-Endomucin 抗, anti-alphaSMA 抗体, HIF-1 の検出には anti-HIF1 α 抗体を用いた。蛍光多



Fig.2 組織中の酸素分圧勾配が線維形成の差異を生み出す。セメント質近傍は低酸素のため、HIF-1 の発現と TGF β -Smad 経路の活性化により線維形成が亢進される。

重染色法により、低酸素組織と HIF の発現、血管の相関を検索した。

(2) 歯根膜における線維構造と成熟度の定量解析

線維形成については Picosirius red 染色の偏光観察ならびに Second-harmonic-generation (SHG) により検出を行った。予備実験の結果から、歯根表面の歯根膜と分岐部歯根膜は血管の分布や線維の配向が大きく異なることから、それぞれを異なる観察領域とし、その差異を含めて解析を行った。

(3) 組織低酸素が歯根膜の線維形成に及ぼす影響の解析

歯根膜組織における人為的な低酸素状態の誘導法として、矯正力の負荷を行った。Ni-Ti コイル (25gf) を上顎切歯と第一臼歯間に装着し、臼歯に矯正力を負荷した。圧迫側となる遠心根近心側歯根膜における組織変化と線維の定量解析を行った。線維の配向と成熟の定量解析には自動化プログラム CT-FIRE (<https://loci.wisc.edu/software/ctfire>)を用いた。

4. 研究成果

(1) 歯根膜における低酸素状態と HIF-1 の

発現ならびに血管構造の組織学的検索

血管構造については anti-Endomucin 抗体, anti-CD34 抗体, anti- α SMA 抗体を用いて免疫染色法による検出を行った。観察領域とした上顎第一臼歯の遠心根ならびに分岐部の歯根膜において、それぞれの抗体に陽性の管腔構造が検出された。どの抗体に陽性の管腔構造も、根分岐部と根尖付近において豊富であり、遠心根の近心側、遠心側における歯根膜においては主として歯槽骨表面に検出された。つぎに Pimonidazole を腹腔内投与し、歯根膜組織における低酸素細胞の検出を試みたが、anti-Pimonidazole 抗体に陽性の細胞は検出されなかった。腹腔内への投与量や免疫染色法による検出条件についても検討を重ねたが、anti-Pimonidazole 抗体に陽性の細胞の検出には至らなかった。また anti-HIF1 α 抗体についても陽性細胞の検出には至らなかった。HIF1 α の検出については、今後、凍結標本を用いた検出を行う予定としている。

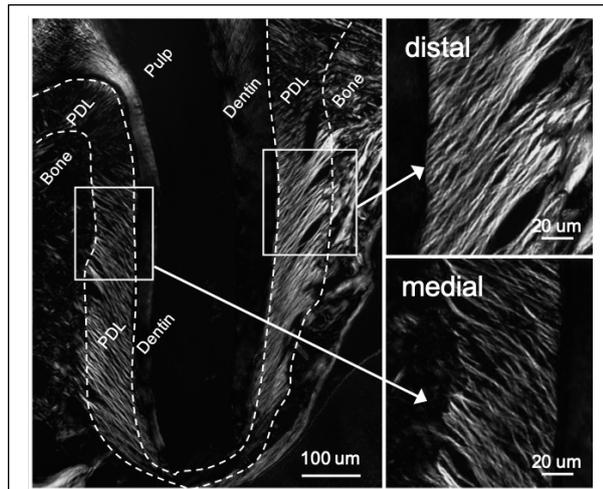


Fig. 3. マウス歯根膜線維の組織解析。

(Picosirius red 染色の偏光観察) マウス臼歯遠心根の歯根膜では遠心側と近心側では線維の成熟度に大きな違いがあったが、血管構造との相関は認められなかった。

(2) 歯根膜における線維構造と成熟度の定量解析

歯根膜におけるコラーゲン線維の検出には Picosirius 染色による偏光観察を用いた (Fig. 3)。観

察領域の中では、遠心根の遠心側歯根膜においてもっとも線維密度が高く、次いで近心側歯根膜において明瞭な線維構造が検出された。根分岐部における線維は Picosirius 染色による偏光観察では検出限界以下であり、遠心根の歯根膜と比べて著しく低密度、低成熟で有ることが示唆された。次に多光子顕微鏡を用いた Second Harmonic Generations (SHG) による検出を行った。この方法は非染色のコラーゲン線維を非破壊、かつ定量的に検出することのできる方法である。これまでのところ、データの取得までは終了しているが、線維の配向等の定量的解析については今後 CT-FIRE (<https://loci.wisc.edu/software/ctfire>) を用いて実施する予定としている。

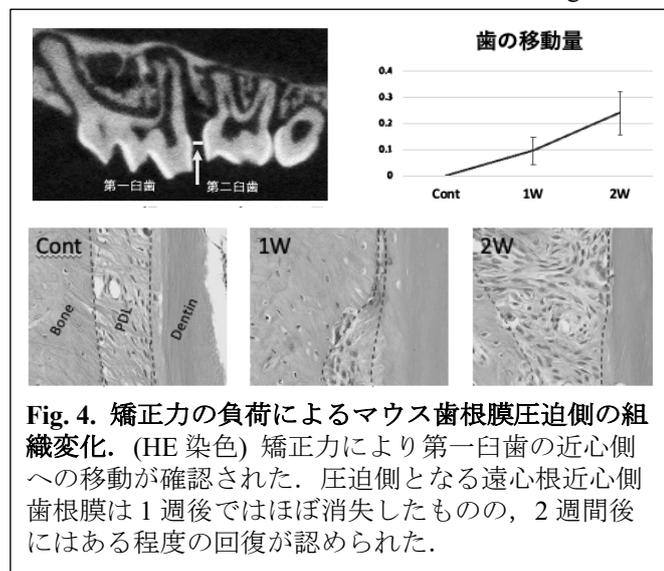


Fig. 4. 矯正力の負荷によるマウス歯根膜圧迫側の組織変化。(HE 染色) 矯正力により第一臼歯の近心側への移動が確認された。圧迫側となる遠心根近心側歯根膜は1週後ではほぼ消失したものの、2週間後にはある程度の回復が認められた。

(3) 組織低酸素が歯根膜の線維形成に及ぼす影響の解析

歯根膜組織における低酸素状態を誘導する方法として、矯正力 (25gf) により歯根膜を圧迫して虚血状態とする方法を用いた。圧迫側となる遠心根の近心側歯根膜においては、負荷の極初期から細胞の消失が認められ、1週間後では大部分の細胞が消失し、2週間後にはある程度の厚みの歯根膜腔が回復していた (Fig. 4)。Picrosirius 染色により線維の検出を行い、CT-FIRE による線維の定量解析を行った (Fig. 5)。圧迫側の歯根膜における線維の幅と長さは2週間後では有意に減少し、Cont で見られた線維の配向性は失われていた。本実験では低酸素状態を誘導する方法として矯正力を用いたが、観察された組織変化は虚血による変化ではなく、力学的な圧迫力の直接的な変化である可能性が高いと思われる。より軽微な力による負荷や、異なる介入法を検討する必要があると考えられる。

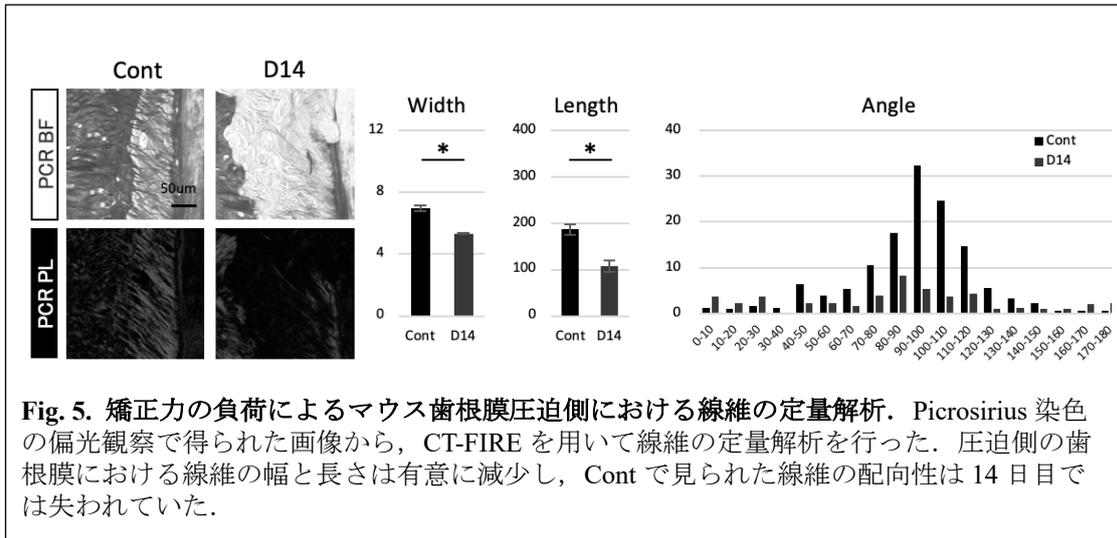


Fig. 5. 矯正力の負荷によるマウス歯根膜圧迫側における線維の定量解析。Picrosirius 染色の偏光観察で得られた画像から、CT-FIRE を用いて線維の定量解析を行った。圧迫側の歯根膜における線維の幅と長さは有意に減少し、Cont で見られた線維の配向性は14日目では失われていた。

考察

げっ歯類の正常歯周組織では、歯槽骨の骨細胞の分布や、歯根膜のコラーゲン線維の分布に一定の規則性が見られることが多い。前述のように血管に乏しいセメント質近傍では線維構造が密である一方、血管の豊富な根分岐部の歯根膜ではコラーゲン線維の成熟度が極めて低いことに着目し、血管の分布に乏しい部位の低酸素状態が線維形成に影響を及ぼすことにより、歯根膜線維の部位特異性を生み出していると考えられる。歯根膜に限らず、組織に低酸素状態が惹起される状態は、臨床的にはしばしば遭遇する。天然歯の咬合状態の変化が、歯周組織の血流や血管の脈動に影響を及ぼすだけでなく (加藤. 補綴誌. 1982)、ブリッジのポンティック基底面に接する粘膜上皮や、補綴物における過剰なサブジンジバル・カントゥア等、圧迫により虚血状態が生じる状態は多い。低酸素状態によって惹起される組織変化は、補綴処置に付随する様々な臨床症状の理解につながると考えられる。

多くの先行研究が間接的に示唆している様に、歯根膜には明らかに部位特異性が存在するにも関わらず、これまでその特異性の詳細な検討や差異を生み出すメカニズムについての研究は極めて少ない。臨床的にも歯周病の根分岐部病変は予後が悪く、その治癒は難しいとされてきた。これはひとえに根分岐部が単に清掃しにくいためであると考えられてきたが、根分岐部における未熟で低密度な歯根膜線維は炎症細胞の浸潤や分解酵素の波及を容易としていることが推察される。したがって予後の悪い根分岐部病変は単に清掃性が困難なためだけでなく、歯根膜自身が有する線維の幼弱な特性のためである可能性がある。

また咬合力等の力が組織に及ぼす影響を解析する方法のひとつとして有限要素法が広く用いられている。有限要素法はコンピューター上で種々のことなる条件を付与し、力の波及や組織や人工材料に生じた歪を予測することが可能である。歯根膜組織のヤング率を一様であると仮定したモデルと、歯根膜線維を要素として組み込んだモデルでは荷重時の応力分布が変化することが報告されている (McCormack et al. *PlosOne*. 2017)。したがって、根中央部や分岐部において線維密度が極めて低い歯根膜線維の特性を加味すると、有限要素解析から得られる応力分布解析

は大きく影響を受ける可能性が高い。したがって歯根膜の部位特異性の解析によって得られる成果は、歯根膜組織の重要な形態情報の1つとして、歯根膜研究への貢献は多大である。

現時点では解析半ばであるが、歯根膜線維の部位特異性を生み出す解剖学的特徴のなかでも、線維構造の高感度な検出と定量解析において一定の成果を得ることが出来た。今後は別のプロジェクトとして進めているプロテオミクスの技術を用いたデータを加えて、歯根膜の部位特性を生み出す分子的背景を包括的に明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arai Yoshiaki, Inanobe-Takatsuka Mutsumi, Takashima Makiko, Ogawa Shin, Kawamura Atsushi, Nohno Kaname, Uoshima Katsumi	4. 巻 65
2. 論文標題 Reducing bacterial counts around the abutment following professional mechanical plaque removal at the implant bridge: A randomized crossover comparison of removing or not removing the superstructure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 91 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPOR_2019_431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Yuta, Kawamura Atsushi, Takashima Makiko, Arai Yoshiaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Evaluation of the bubble mixture rate and the bond strength of post to dentin according to the technique of applying resin cement	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Japan Prosthodontic Society	6. 最初と最後の頁 264 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/ajps.12.264	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Nobuaki, Arai Yoshiaki, Kawamura Atsushi, Hasegawa Mana, Komatsu Maki, Hara Sayaka, Takagi Ritsuo, Fujii Noritaka	4. 巻 12
2. 論文標題 A case report on prosthodontic reconstruction for open-bite resulting from mandibular condylar tumor resection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Japan Prosthodontic Society	6. 最初と最後の頁 337 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/ajps.12.337	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野山敦士、池田順行、北村 厚、松崎奈々香、山崎裕太、河村篤志、高嶋真樹子、荒井良明、高木律男
2. 発表標題 顎関節治療部開設後14年間における受診患者の臨床統計的検討
3. 学会等名 第33回日本顎関節学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒井良明, 松崎奈々香, 山崎裕太, 河村篤志, 高嶋真樹子, 魚島勝美
2. 発表標題 新潟大学医歯学総合病院における口腔インプラント治療の14年間の臨床統計
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第50回学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------