

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 9月21日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791868

研究課題名（和文） 歯根膜における荷重・部位依存的な破骨細胞誘導機構の解析

研究課題名（英文） Effect of cyclic mechanical loading magnitude on osteoblast recruitment in periodontal tissue.

研究代表者

野崎 浩佑（NOZAKI KOSUKE）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・特任助教

研究者番号：00507767

研究成果の概要（和文）：

メカニカルストレスは歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞における破骨細胞誘導因子の発現を調整し、歯周組織での破骨細胞の分化・誘導に関わる重要な因子として考えられている。本研究では我々の開発した荷重量、頻度をコントロールできる繰り返し荷重装置を用いて、ラット臼歯に繰り返し荷重を付与し、破骨細胞誘導に関わるシグナリングカスケードの解析を行った。荷重量の増加に伴い、歯槽骨内に破骨細胞数の増加が認められたものの、歯根膜内に破骨細胞の誘導は認められなかった。また免疫組織学的検討により歯根膜の RANKL/OPG 比の増加が観察されたことから、歯周組織において、メカニカルストレス由来の歯周組織の破壊が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is well accepted that cyclic mechanical loading induces osteoclastogenesis in periodontal tissue, but its molecular mechanisms are not well understood, in part because of a lack of appropriate models. In this study, we investigated a novel device that allows cyclic mechanical loading to be performed in a well-controlled manner. Furthermore by employing this model, the effects of cyclic loading on osteoclast recruitment in the periodontal tissue were described. Osteoclastogenesis was induced within alveolar bone subjected to a compression force. With large mechanical stress, cells that were positive for tartrate-resistant acid phosphate, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin were significantly increased in the alveolar bone. By using this device, osteoclast recruitment in the periodontal tissues were observed with excessive loadings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：繰り返し荷重, 歯周組織, 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

顎筋により発生される機能力は歯科補綴装置を介して歯周組織に伝搬するが、機能力が適切であれば、残存組織・機能は保存され、機能力が適切でなければ残存組織の障害が生じる。

歯周組織は歯根膜、歯槽骨、歯肉、セメント質から構成され、特に歯根膜はメカニカルストレスに応答し、歯周組織の恒常性維持を制御する因子を調節していることが解明されている。歯根膜から分離・培養した線維芽細胞にメカニカルストレスを加えると、歯槽骨の破壊・吸収を担う破骨細胞の誘導因子である Receptor Activator of NF kappaB ligand (RANKL) の産生を増加し、抑制因子である Osteoprotegerin (OPG) の産生を減少させる (図 1)。骨芽細胞においてはメカニカルストレスにより RANKL 産生は減少し、OPG 産生は増加する。このように細胞種によりメカニカルストレスに対する反応は異なり、歯根膜のように多種多様な細胞により構成されている組織では、単一細胞を使用した培養法による検討は、メカニカルストレスに対する歯根膜の応答を詳細に検討することが困難である。

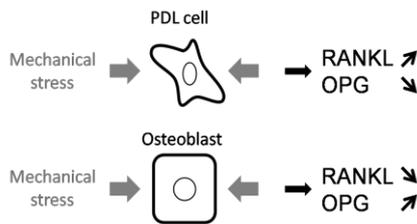


図 1 メカニカルストレスによる細胞の種々の反応

そこで我々はメカニカルストレスが歯周組織に及ぼす影響を検討するために、実験動物を用いた *in vivo* での実験系の確立を試みた。実験動物としてラットを用い、臼歯にワイヤーを接着し、咬合を挙上することで過大な咬合力を歯周組織に付与すると、RANKL の増加に伴う破骨細胞の誘導が観察されたが、歯根膜は圧平され硝子化を伴う急激な組織変化が生じ、メカニカルストレスに対する歯根膜の応答を詳細に検討することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では我々の開発した荷重量、頻度をコントロールできる繰り返し荷重装置を用いて (図 2)、ラット臼歯に繰り返し荷重を付与し、破骨細胞誘導に関わるシグナリングカスケードを解明することを目的とする。

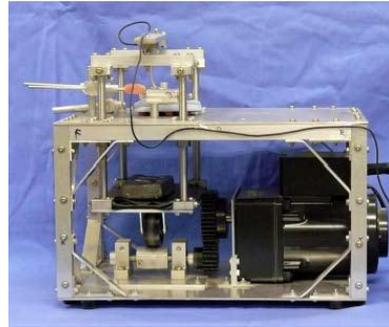


図 2 繰り返し荷重装置

3. 研究の方法

1) 歯根膜組織への荷重実験

実験動物には 8 週齢雄性 Wistar/ST ラットを使用し、麻酔後、頭部固定用ホルダーを使用して荷重装置に固定する (図 3)。上顎右側第一臼歯に 20, 30, 40 N (基準値の 100%, 150%, 200%, 図 4) の荷重を 5.8 Hz で 30 分間毎日行う。

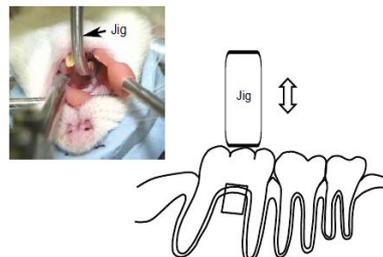


図 3 荷重方法

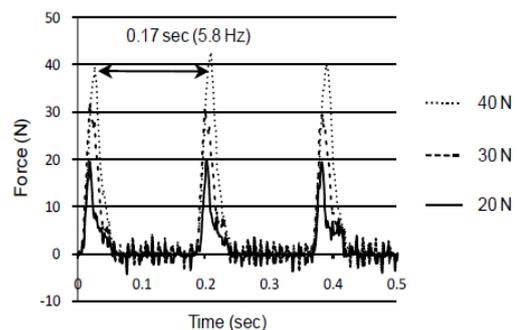


図 4 荷重量のキャリブレーション

2) 組織標本の作製

実験開始 1, 3, 7 日後に屠殺後、対象歯および周囲の組織を 4%ホルマリンにて固定後、EDTAにて脱灰し、通法にしたがいパラフィン包埋する。標本は近遠心方向に 4 μm 厚に薄切し Hematoxylin-eosin 染色 (H&E) (図 5a) および破骨細胞同定のための TRAP 染色 (図

5b) を施し、光学顕微鏡にて観察する。

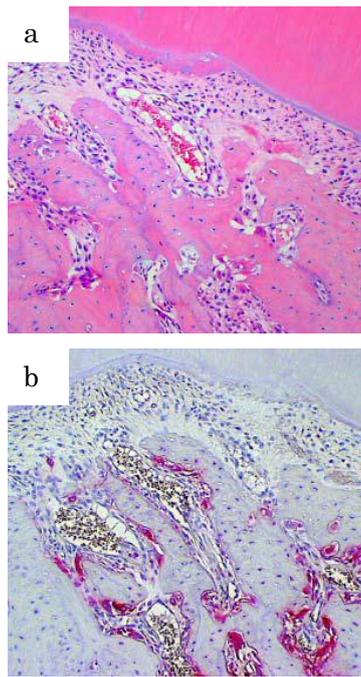


図5 40N 荷重群 7 日目の組織標本

3) 免疫組織学的評価

得られた組織標本から、破骨細胞誘導因子である RANKL の発現 (図 6a) とその抑制因子である OPG の発現 (図 6b) を免疫染色により評価する。

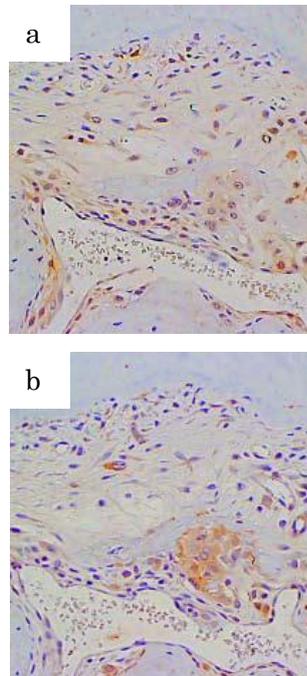


図6 40N 荷重群 7 日目の組織標本

4. 研究成果

1) 荷重量の違いによる破骨細胞の誘導

100%の荷重を付与した群において、すべての観察期間で歯根膜組織の変化は認められなかったが、150%, 200%の荷重付与群では、歯根膜組織の部分的な硝子化が観察され、細胞数の減少が観察されたが (図 7), 歯根膜の圧平はすべての機関において観察されなかった. 次に破骨細胞の誘導を TRAP 染色により確認したところ, 100%荷重群では歯槽骨内に一部, 破骨細胞が確認された. 150%, 200% 荷重群では 3 日目より多数の破骨細胞が歯槽骨内に誘導されているのが確認された. 誘導された破骨細胞数を確認したところ, 100%荷重群と比較して 150%, 200%では有意に破骨細胞数の増加が確認された (図 8). 以上より歯周組織において, 荷重量は破骨細胞の誘導を制御していることが示唆された.

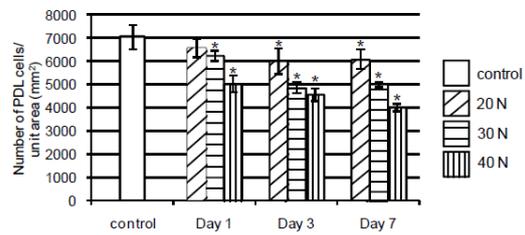


図7 歯根膜細胞数の変化

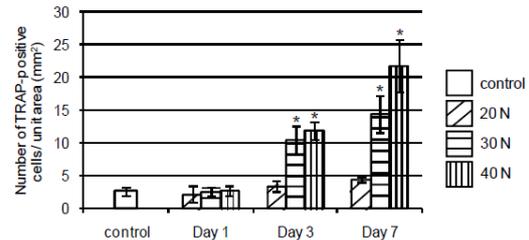


図8 破骨細胞数の変化

2) RANKL/OPG の発現

RANKL (図 9) および OPG (図 10) の発現はすべての試料において観察されたことから, メカニカルストレス存在下では, 破骨細胞誘導と破骨細胞誘導抑制のバランスにより破骨細胞誘導は制御されていると考えられる.

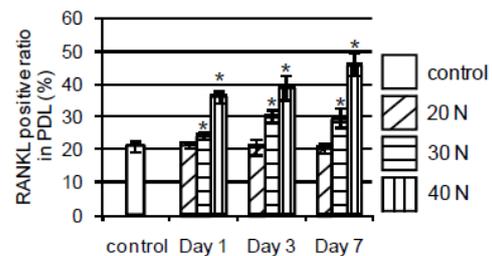


図9 RANKL 発現率の変化

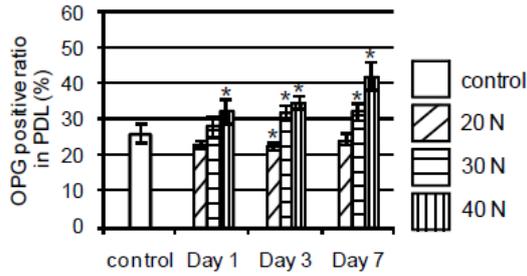


図 10 OPG 発現率の変化

そこで、RANKL/OPG 比を求めたところ (図 11)、200%荷重群では 1 日目からコントロール群と比較して、有意に増加したが、破骨細胞誘導の観察された 150%群では変化が観察されなかった。

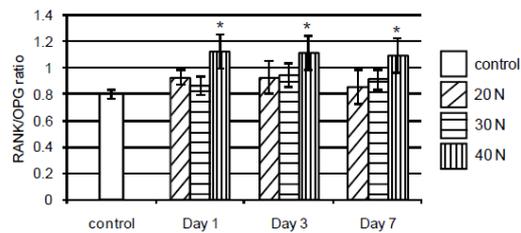


図 11 RANKL/OPG 比の変化

破骨細胞の誘導には、破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞や線維芽細胞の細胞膜上に発現している RANKL の結合が必須である。しかしながら RANKL には細胞膜上で発現している膜発現型の mRANKL と、細胞膜上の RANKL の stalk region が MMP14 等のタンパク質により切断され遊離型となった sRANKL の 2 種類が報告されている。本研究で用いた抗 RANKL 抗体は C 端側と結合するが、組織内に遊離した sRANKL を評価することは困難である。また OPG も同様に分泌型タンパクであるため、本研究で用いた免疫組織学的評価では、破骨細胞誘導に関わる RANKL/OPG 比の関係を明らかにするに至らなかった。

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 1 件)

Nozaki K, Kaku M, Yamashita Y, Yamauchi M, Miura H. Effect of cyclic mechanical loading on osteoclast recruitment in periodontal tissue. J Periodontal Res 2010; 45:8-15. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 浩佑 (Nozaki Kosuke)