

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593011

研究課題名(和文) 三次元立体培養歯根膜線維芽細胞を用いた加齢に伴う至適矯正力の解明

研究課題名(英文) A study on optimum orthodontic force using periodontal ligament fibroblasts on 3D culture system with aging

研究代表者

金井 壮律 (Kanai, Takenori)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20344517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴い歯根膜線維芽細胞の生理機能低下が進んでいると考えられる。そこで今回、加齢に伴った種々の三次元立体培養歯根膜線維芽細胞を作成し、効率的に破骨細胞を誘導できる至適矯正力を導き出す研究計画を構築した。

その結果、老化の指標である8-OHdGの違いは観察されなかったが、矯正力を加えた時、骨免疫関連サイトカインの発現増加が認められた。しかし、矯正力の増加に比例してサイトカイン発現増加が認められたのではなく、1/4圧迫した時に発現のピークを認めた。作製した三次元立体歯根膜線維芽細胞を歯根膜と考えるならば、歯根膜幅を1/4圧迫することが年齢問わず効率的な歯の移動を誘導できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The physiological hypofunction of periodontal ligament (PDL) fibroblasts were considered to be progressing with age. In this investigation, an attempt was made to determine the optimal orthodontic force according to the change of expression of cytokines related to the osteoclasts differentiation after each compressive load on PDL fibroblasts on 3D culture system with aging.

From these results, though the difference of 8-OHdG which is an indicator of aging was not observed, the relative amounts of the mRNA expression of cytokines were similar to the expression tendencies between the time of other compressions and the time of 1/4 compression, but there was a higher tendency at the time of 1/4 compression. It has been suggested that when mechanical compression is added to PDL fibroblasts in an experimental system that is assumed as in vivo, and we believe it is effective to move teeth in orthodontic treatment when the tooth was pushed by a distance of a quarter of the width of PDL.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学矯正・小児系歯学

キーワード：歯根膜線維芽細胞 三次元立体培養 至適矯正力

1. 研究開始当初の背景

矯正力とは持続的な機械ストレスであり、それによりもたらされる種々の細胞が産生するサイトカインは、骨代謝および免疫に対して、非常に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。申請者も、ラット上顎第1臼歯に歯列拡大装置を装着した持続的機械的ストレス負荷モデルを作製し、骨吸収のある圧迫側歯根膜線維芽細胞における骨免疫関連サイトカインである、RANKL の発現と歯槽骨における破骨細胞数の増大を、酵素・免疫組織化学的染色的検索から明らかにし、矯正力が骨代謝と免疫の両者に関与する可能性を強く示唆している。(Kim T. *et al.*, Archives of Oral Biology, 52(3): 244-250, 2007.) 現在、破骨細胞の分化を誘導する TNF-、活性を誘導する IL1-、RANKL の Antagonist である OPG 等の検索を行っている。また、今までの歯根膜線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験系は、シャーレに培養した細胞(2次元、平面)に機械的ストレスを負荷したモデルしかなく、実際の歯根膜は立体構造を呈し *in vivo* に即したモデルを構築するために今回、3次元立体培養歯根膜線維芽細胞を作製し矯正力(持続的機械的ストレス)を負荷するモデルを考案した。

2. 研究の目的

近年、矯正治療を行う患者の高齢化が進んでいるが、歯移動時に使用する矯正力は年齢問わずほぼ同じシステムを用いて治療を行っている。しかし、加齢に伴い歯を支える支持組織の一つである歯根膜線維芽細胞は、老化と細胞死によって細胞数が減少し生理機能の低下が進んでいると考えられる。そこで今回、加齢に伴った種々の3次元立体培養歯根膜線維芽細胞に矯正力を加え、効率的に破骨細胞を誘導できる至適矯正力を導き出すことを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞採取方法

北海道大学歯科診療センターに来院し、北海道大学大学院倫理委員会にて承認された実験趣旨に同意を得た各年代の患者から便宜抜去された健全な第一小臼歯より採取した歯根膜を採取培養し、実験には5継代目の細胞を使用した。

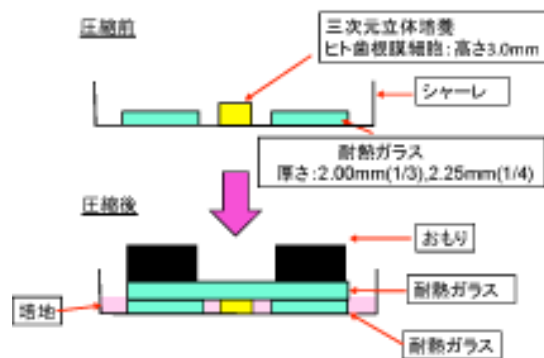
(2)三次元立体培養歯根膜線維芽細胞の作製方法

培養細胞を培養時と同様の培地を用いて 5×3mm のコラーゲンスポンジ 1 個当に、1×10⁷ 個の細胞含有培地 50 μl をピペットにてゆっくり滴下して細胞充填を行った。35mm カルチャーディッシュで培養液を 2 日毎に交換し 1 週間培養を行って作製した。

(3) 矯正力(持続的機械的ストレス)の負荷 矯正力(持続的機械的ストレス)として圧

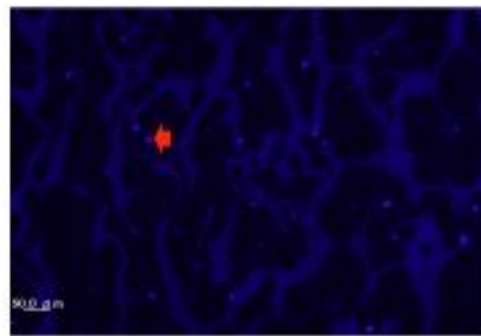
縮力を用いた。1/2、1/3、1/4 の圧縮力を負荷するため 1.5mm、2.0mm、2.25mm の耐熱ガラスを特注(NITTO 社製)した。100mm シャーレ内に 1/2 圧縮時には 1.5mm、1/3 圧縮時には 2mm、1/4 圧縮時には 2.25mm の耐熱ガラス 2 枚の間に高さ 3mm のコラーゲンスポンジを置き、その上に耐熱ガラスと重りを載せて圧縮力を負荷させた。作用時間は、0、1、3、6、12、24 時間とし、持続的に作用させた。

三次元立体培養ヒト歯根膜細胞の圧縮方法



(4)核染色

ヒト歯根膜線維芽細胞を充填したコラーゲンスポンジの細胞充填状態を確認するために、凍結切片を作製し DAPI にて核染色を行った。



(5)realtime-PCR

ホモジナイズしたコラーゲンスポンジから RNeasy Mini Kit(50) (QIAGEN,TOKYO) を用いて RNA 抽出を行った。さらに High Capacity RNA-to-cDNA Kit (AB Applied Biosystems,USA) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。realtime-PCR は Step One Plus™ (Applied Biosystems) を用いて増幅産物を定量した。mRNA の発現量は、-actin の mRNA の発現量を用いて標準化し、老化の指標である 8-OHdG また、骨免疫関連サイトカインである RANKL、OPG、TNF-、IL1-、VEGF および FGF2 を検索した。

(6)統計学的分析

control 群と圧縮力を作用させた群の 2 群間における統計処理には Paired t-test を用い、有意水準を $P < 0.01$ とした。

4. 研究成果

(1) Control, 1/2, 1/3 および 1/4 圧縮前の細胞の充填状態に違いが認められなかったが、1/4、1/3 圧縮後の歯根膜細胞の充填状態は、コントロールと比べ同程度であったが、1/2 圧縮時、細胞が観察されなかった。

(2) 三次元立体歯根膜繊維芽細胞において老化の指標である 8-OHdG の違いは観察されなかったが、種々の矯正力(持続的機械的ストレス)を加えた時、骨免疫関連サイトカインの発現増加が認められた。しかし、矯正力の増加に比例してサイトカイン発現増加が認められたのではなく、今回の実験において三次元立体歯根膜繊維芽細胞を 1/4 圧迫した矯正力を加えた時にサイトカイン発現のピークを認めた。総じて、in vivo に近い実験系を確立して歯根膜繊維芽細胞に機械的圧縮を加えることができた。今回、作製した三次元立体歯根膜繊維芽細胞を歯根膜と考えるならば、歯根膜繊維芽細胞が破骨細胞分化および創傷治癒に関するサイトカインを産出し、骨および支持組織リモデリングの一端を担っている可能性も示唆された。以上のことより、矯正治療において歯根膜幅の 1/4 の移動を断続的に行って歯を移動させることが効率的であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

羽二生 芽理, 金 壮律, 佐藤 嘉晃, 飯田順一郎

三次元立体培養ヒト歯根膜線維芽細胞を用いた最適矯正力に関する検討

北海道歯学雑誌 . 34(2): 52-60, 2014.

査読 (有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

羽二生 芽理, 金 壮律, 佐藤嘉晃, 飯田順一郎

三次元立体培養ヒト歯根膜細胞の機械的圧縮時における破骨細胞形成に関するサイトカインの発現

第 72 回日本矯正歯科学会大会、平成 25 年 10 月 7~9 日 キッセイ文化ホール (松本)

Takenori Kim, Meri Haniu, Yoshiaki Sato, Junichiro Iida

Expression of Cytokines after compressive load on human periodontal ligament fibroblasts

91th General Session & Exhibition of the IADR, Convention center, Seattle, USA May 20-23, 2013

Takenori Kim, Meri Haniu, Fumio Saito, Yoshiaki Sato, Junichiro Iida

An investigation of optimal orthodontic force for periodontal ligament fibroblasts

90th General Session & Exhibition of the IADR, Convention center, Iguacu falls, Brazil June 20-23, 2012

Takenori Kim, Meri Haniu, Yoshiaki SATO, Junichiro Iida

An investigation of optimal orthodontic force for human periodontal ligament fibroblasts

44th Annual Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists, Convention center, Seoul, Korea, November 3-5, 2011

〔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

金井 壮律 (KANAI, Takenori)

北海道大学大学院・歯学研究科・助教

研究者番号： 20344517

(2) 研究分担者

飯田 順一郎 (IIDA, Junichirou)

北海道大学大学院・歯学研究科・教授

研究者番号： 90151232

北村 哲也 (KITAMURA, Tetuya)

北海道大学大学院・歯学研究科・助教

研究者番号： 00451451

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：