

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792068

研究課題名(和文) 機械的刺激によるコラーゲン翻訳後修飾を介した歯根膜安定化機構

研究課題名(英文) Mechanical Stress Regulates Collagen Crosslinking in Periodontal Ligament

研究代表者

加来 賢 (Kaku, Masaru)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30547542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では機械的刺激が、歯根膜におけるコラーゲン・クロスリンクの生成に及ぼす影響について解析を行った。機械的刺激によりヒト歯根膜由来細胞において、クロスリンクの生成に重要なLysyl Hydroxylase 2 (LH2)遺伝子の発現と、クロスリンクの生成を示すコラーゲン鎖の増加が認められた。ラットを用いた過剰咬合モデルでは、LH2陽性細胞数の増加のみならず、Picrosirius染色によりコラーゲン繊維の増加と成熟を示す所見が得られた。以上の結果より、歯根膜において機械的刺激はコラーゲンの翻訳後修飾を介して組織の維持、安定化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the effects of excessive mechanical loading on the expression of collagen-modifying enzymes and subsequent crosslinking in PDL. Upon mechanical loading, gene expression of LH2, a collagen telopeptide specific Lysyl hydroxylase, was significantly upregulated, while that of COL1A2, encoding type I collagen was not affected. The expression of LH2 in PDL cells was also confirmed on an excessive occlusal loading rat model and expression was limited on the alveolar bone side of PDL in vivo. These results indicate that mechanical loading induces expression of collagen-modifying enzyme and controls subsequent collagen cross-linking, which are important for achieving long-term tissue maintenance and stability of PDL.

研究分野：歯科

科研費の分科・細目：歯科補綴学

キーワード：歯根膜 メカニカルストレス コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

線維性結合組織である歯根膜は、歯槽骨とセメント質との結合・固定を行うばかりでなく、強大な咬合力への緩衝能ならびに機械的刺激の受容器としての役割を果たしている。歯根膜組織の維持に機械的刺激が影響を及ぼしていることは幾多の臨床的知見からも明らかであるが、未だその制御機構については不明な点が多い。

歯根膜を構成する細胞外基質の主成分はI型コラーゲンであり、組織特異的な機械的特性に大きく寄与している。I型コラーゲンの生合成は細胞内外にわたる一連の翻訳後修飾により制御され、コラーゲン分子間の架橋結合(クロスリンク)を形成することにより、組織のテンプレートとしての3次元咬合の構築を可能としている。I型コラーゲンが多く結合性組織における主たる基質成分であるにも関わらず、その機械的特性が異なるのは、組織特異的なコラーゲン修飾酵素の発現により、クロスリンクの構成比が異なるためである事が報告されている。

コラーゲン修飾酵素の中でもリシン水酸化酵素(Lysyl Hydroxylase; LH)のアイソフォームをコードするLH遺伝子はコラーゲン生合成の極初期にコラーゲン分子のテロペプチドに存在する特異的なリシン残基を水酸化する。この反応はクロスリンクの生成経路を軟組織系から硬組織系へ変化させ、組織の機械的性質に影響を及ぼす事が報告されている。申請者らはこれまでに培養骨芽細胞を用いて、LH遺伝子群が各種刺激によって誘導され、コラーゲン・クロスリンクの合成に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。以上のより、歯根膜において機械的刺激がLH遺伝子の発現を誘導し、コラーゲン・クロスリンクの生成経路を制御することにより、歯根膜組織の安定化メカニズムに寄与しているのではないかと、との仮説を得るに至った。しかしながら、歯根膜におけるPLOD遺伝子群の発現によるクロスリンクの生成への直接的な影響については未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機械的刺激が歯根膜のI型コラーゲンの翻訳後修飾に及ぼす影響をリシン水酸化酵素群の発現および組織変化から解析し、関連する因子の機能を解明する事によって歯根膜恒常性維持機構の一端を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1)ヒト歯根膜細胞の採取と培養

歯科矯正に先立って抜歯した小白歯よ

り、Collagenase/Dispase II 溶液を用いて歯根膜細胞を分離回収した後、コラーゲン・ゲル中に播種し、3次元培養を行った。歯根膜細胞の採取にあたっては新潟大学倫理委員会において承認の上、大学規定に基づいて行った(No. 21-R15-09-09)。

(2)遺伝子発現解析

3次元培養下の歯根膜細胞に(0.5, 1.0 or 2.0 g/cm²)の圧縮荷重を専用の装置を用いて12-24時間付与し、totalRNAを回収、逆転写後realtimePCRにて遺伝子解析を行った。解析を行った遺伝子は以下のとおりである。SPP1 (OPN, Osteopontin), COL1A2 (Type I collagen alpha 2 chain), LH1-3 (Lysyl hydroxylase isoform 1-3), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)。

(3)コラーゲン鎖解析

荷重下において7日間培養したコラーゲン・ゲルからSDSサンプルバッファーにてコラーゲンを可溶化し、電気泳動およびCBB染色を用いてコラーゲン鎖の解析を行った。

(4)咬合性外傷モデルと組織解析

8週齢雄性Wistarラットの上顎左側第一臼歯咬合面に1.2mm厚の金属片を接着した(Fig. 1)。3日間の過剰咬合とした後、実験動物を屠殺し、脱灰パラフィン包埋組織標本作製した。半数の実験動物には過剰咬合付与の3日前よりクロスリンクの阻害剤であるβ-aminopropionitrile (BAPN)を毎日体重1Kgあたり10mg腹腔内投与した。上顎左側第一臼歯近心根近心側の歯根膜を観察領域とし、ピクロシリアス染色した標本を偏光顕微鏡下で観察を行った。組織中の細胞動態を解析するために免疫染色を行った。使用した抗体は下記のとおりである。Anti-rabbit FAK(pY397) (31H5L17, Invitrogen), Anti-mouse PCNA (PC10, Cell Signaling Technology), Anti-goat HSP27 (M-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Anti-mouse LH2 (MAB4445, R&D Systems)。歯根膜中の陽性細胞を歯根側、歯槽骨側においてそれぞれ計測し、陽性細胞率を算出した。なお、動物実験は新潟大学動物実験倫理委員会承認の上、規定に従って行った。

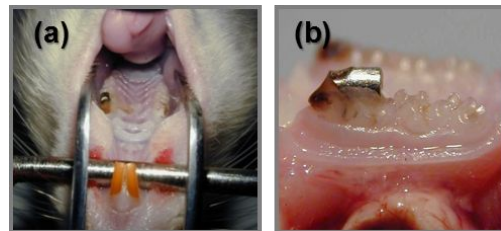
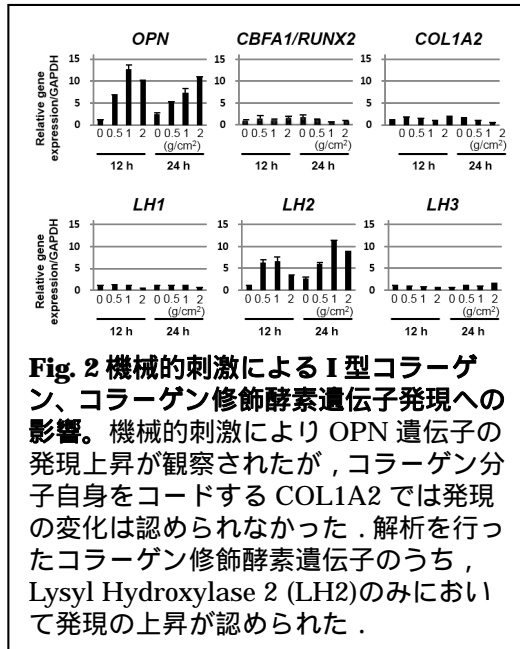


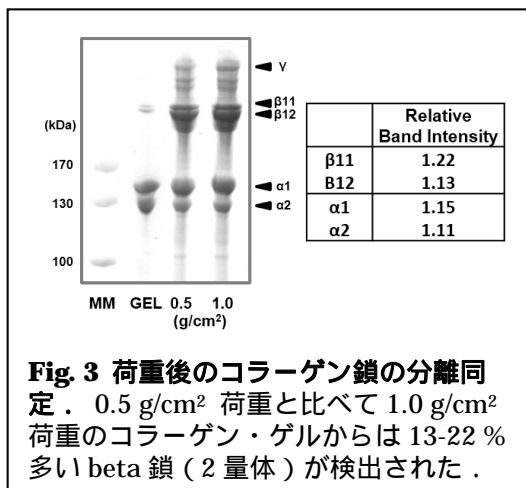
Fig. 1 ラット過剰咬合モデル

4. 研究成果

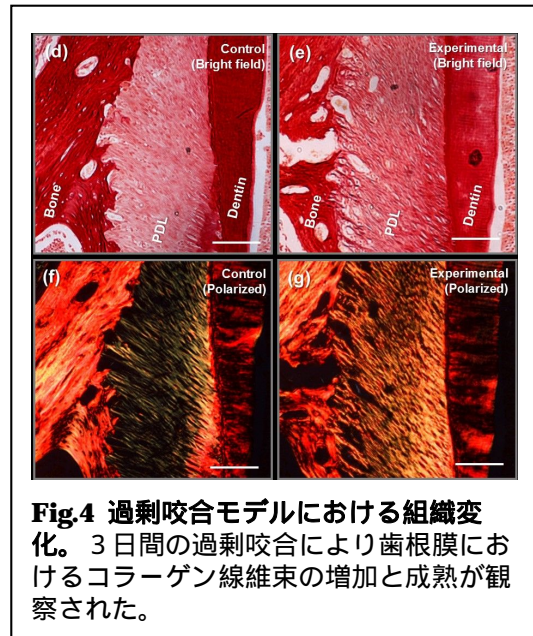
ヒト歯根膜細胞における圧縮荷重 (0-2g/cm²) による遺伝子解析の結果を Fig.2 に示す。機械的刺激によく応答することが知られている OPN の発現上昇が荷重量依存的に認められた。一方、同様に機械的刺激への応答が報告されている CBFA1/RUNX2 については反応が認められなかった。LH 遺伝子群においては LH2 のみに発現上昇が認められたものの、コラーゲン自身をコードする COL1A2 においては変化が認められなかった。



次に 7 日間荷重下にて培養した 3 次元培養からコラーゲン鎖の解析を行った (Fig. 3)。低荷重群 (0.5 g/cm²) と比較して、高荷重群 (1.0 g/cm²) ではコラーゲン鎖の基本単位である alpha 鎖については 11-15 % の増加、クロスリンクの生成を示す 2 量体の beta 鎖は 13-22 % の増加を示していた。

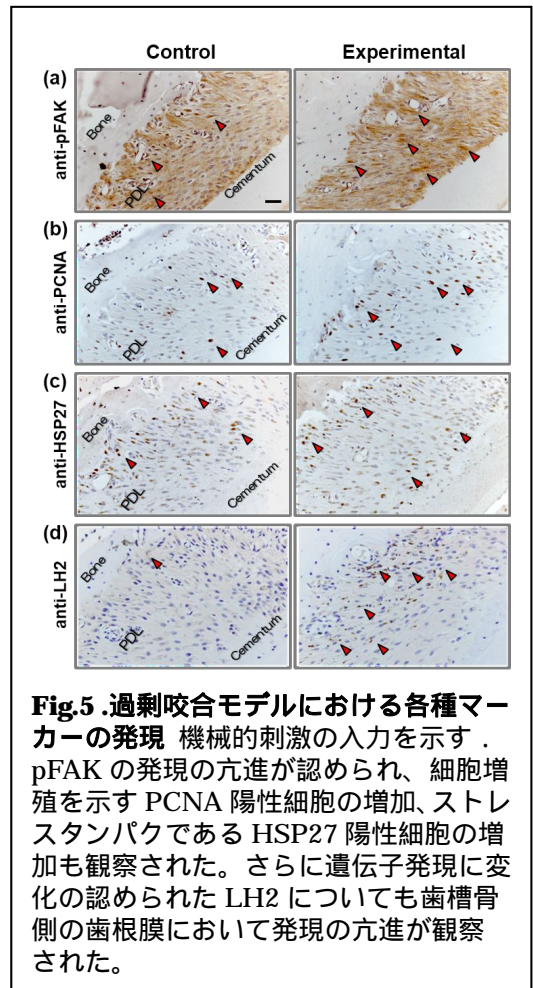


過剰咬合モデルにおける 3 日後の組織標本を Fig.4 に示す。Picosirius 染色した標本を明視野で観察したものが上段、偏光下で観察したものが下段である。偏光下の観察により、



過剰咬合によってコラーゲン繊維の肥厚と成熟が観察された。またクロスリンク阻害薬である BAPN の事前投与により、過剰咬合に寄って誘導されたコラーゲンの成熟は抑制された。

過剰咬合モデルにおける各種マーカーの発現を Fig.5 に示す。機械的刺激の入力を示す pFAK の発現の亢進が認められ、細胞増殖を示



す PCNA 陽性細胞の増加、ストレスタンパクである HSP27 陽性細胞の増加も観察された。さらに遺伝子発現に変化の認められた LH2 についても歯槽骨側の歯根膜において発現細胞数の増加が観察された。

本研究では機械的刺激が、歯根膜におけるコラーゲン・クロスリンクの生成に及ぼす影響について解析を行った。機械的刺激によりヒト歯根膜由来細胞において、クロスリンクの生成に重要な Lysyl Hydroxylase2 (LH2) 遺伝子の発現と、クロスリンクの生成を示すコラーゲン鎖の増加が認められた。ラットを用いた過剰咬合モデルでは、LH2 陽性細胞数の増加のみならず、Picrosirius 染色によりコラーゲン繊維の増加と成熟を示す所見が得られた。以上の結果より、歯根膜において機械的刺激はコラーゲンの翻訳後修飾を介して組織の維持、安定化に寄与している可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Kaku M, Rocabado JMR, Kitami M, Ida T, Uoshima K. Royal jelly affects collagen crosslinking in bone of ovariectomized rats. *Journal of Functional Foods* 2014;7: 398-406. (査読有り)
2. Rosales-Rocabado JM, Kaku M, Kitami M, Akiba Y, Uoshima K. Osteoblastic Differentiation and Mineralization Ability of Periosteum-Derived Cells Compared With Bone Marrow and Calvaria-Derived Cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2014;72: 694.e1-e9. (査読有り)
3. Kaku M, Komatsu Y, Mochida Y, Yamauchi M, Mishina Y, Ko CC. Identification and characterization of neural crest-derived cells in adult periodontal ligament of mice. *Arch Oral Biol* 2012;57: 1668-75. (査読有り)

[学会発表](計 24 件)

1. Kaku M, Asadullah Mohammad Edris, Ida T, Kitami M, Rosales Rocabado JM, Uoshima K, Excessive Occlusal Loading Recruit the CD4-T-cells in Periodontal Ligament, American Association for Dental Research, 2014.3.22, Charlotte, USA
2. Kitami M, Kaku M, Ida T, Uoshima K, Early Behavior of Transplanted cells and Their Activity, American Association for Dental Research, 2014.3.20, Charlotte, USA
3. Ida T, Kaku M, Kitami M, Rosales Rocabado JM, Uoshima K, Effect of Collagen Crosslinks on Osteoblast

Proliferation, Differentiation and Mineralization, American Association for Dental Research, 2014.3.22, Baltimore, USA

4. Ida T, Kaku M, Kitami M, Rosales Rocabado JM, Katsumi Uoshima, Collagen Crosslinks Regulate Osteoblast Activities, International Symposium on Health Through Oral Health Collaborative Education, Research and Practices, 2013.12.20, Krabi, Thailand
5. 井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, Rosales Rocabado JM, 魚島勝美, コラーゲン・クロスリンクが骨芽細胞に及ぼす影響, 日本補綴歯科学会関越支部, 2013.11.30, 栃木
6. Kaku M, Edris AM, Kitami M, Ida T, Rosales Rocabado JM, Uoshima K, Detection and Partial Characterization of Bone Marrow Derived Cells in Periodontal Ligament, American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), 2013.10.5, Baltimore, USA
7. Kitami M, Kaku M, Ida T, Rosales Rocabado JM, Uoshima K, Early Behaviors of Transplanted Cells and the Effect of HSP27 on the Cell Survival, American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), 2013.10.5, Baltimore, USA
8. 加来 賢, 北見恩美, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美, 歯根膜における骨髄由来細胞の局在と幹細胞マーカーの発現, 歯科基礎医学会, 2013.9.22, 岡山
9. 井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, 魚島勝美, 歯根膜におけるプライマリーシリアの発現率と過剰咬合による変化, 歯科基礎医学会, 2013.9.21, 岡山
10. 北見恩美, 加来 賢, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美, 移植細胞の初期動態とストレスタンパク質 HSP27 導入による影響, 歯科基礎医学会, 2013.9.20, 岡山
11. 加来 賢, 野澤恩美, Rosales Rocabado JM, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美, 歯根膜における骨髄由来細胞の局在と幹細胞マーカーの発現, 日本補綴歯科学会, 2013.5.18, 福岡
12. 野澤恩美, 加来 賢, Rosales Rocabado JM, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美, 移植細胞の初期動態と HSP27 の導入による細胞移植法の検討, 日本補綴歯科学会, 2013.5.18, 福岡
13. 井田貴子, 加来 賢, 野澤恩美, Rosales Rocabado JM, 加来咲子, 魚島勝美, 歯根膜の部位によるプライマリーシリア出現率の違いと過剰咬合による変化, 日本補綴歯科学会, 2013.5.18, 福岡
14. 北見恩美, 加来 賢, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美, 移植細胞の初期挙動

- と HSP27 過剰発現骨芽細胞に関する分析, 新潟歯学会, 2013.4.20, 新潟
15. Kaku M, Kitami M, Rosales Rocabado JM, Akiba Y, Uoshima K, Mechanical loading affects the posttranslational modifications of type I collagen in periodontal ligament, Joint Congress of CPS-JPS-KAP, 2013.4.13, Jeju, Korea
 16. Kaku M, Nozawa M, Uoshima K: Detection and Partial Characterization of Femoral Bone Marrow Derived Cells in Periodontal Ligament. The 8th Biennial Meeting of Asian Academy of Prosthodontics, Chennai, TamilNadu, India, December 5-9, 2012,
 17. Nozawa M, Kaku M, Uoshima K: Early Behaviors of Transplanted Cells and the Effect of HSP27 on Osteoblast Survival. The 8th Biennial Meeting of Asian Academy of Prosthodontics, Chennai, India, December 5-9, 2012
 18. Kaku M, JM Rosales Rocabado, Nozawa M, Akiba Y, Uoshima K: Effect of Lathyrogen on Mechanical-Stress Induced Collagen Maturation in PDL. The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Niigata, Japan, December 14-15, 2012, Program Book: 85, 2012
 19. Nozawa M, Kaku M, JM Rosales Rocabado, Akiba Y, Akiba N, Uoshima K: Proliferation and Apoptosis of Cells upon Subperiosteal Transplantation. The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Niigata, Japan, December 14-15, 2012, Program Book: 86, 2012
 20. 加来 賢, 野澤恩美, 秋葉陽介, 魚島勝美, : 機械的刺激によるコラーゲン翻訳後修飾を介した歯根膜組織の安定化機構, 第 22 回日本歯科医学会総会, 大阪, 2012 年 11 月 9-11 日, 日本歯科医学会雑誌 65 (5) 97 頁, 2012
 21. 加来 賢, JM Rosales Rocabado, 野澤恩美, 魚島勝美: ローヤルゼリー摂取による卵巣摘出ラットの骨量, 骨質への影響, 日本補綴歯科学会関東支部平成 24 年度総会・学術大会, 新潟, 2012 年 10 月 14 日, プログラム・抄録集: 12 頁, 2012
 22. 加来 賢, 野澤恩美, 秋葉陽介, 魚島勝美: 機械的刺激に誘導されるコラーゲン修飾酵素が歯根膜組織に及ぼす影響, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 福島, 2012 年 9 月 14-16 日, プログラム・抄録集: 156 頁, 2012
 23. JM Rosales Rocabado, 加来 賢, 野澤恩美, 魚島 勝美, ローヤルゼリーはコラーゲン翻訳後修飾およびクロスリンクを介して骨質の改善に寄与する,

第 121 回日本補綴歯科学会 横浜, 2012 年 5 月 26-27 日, 日本補綴学会誌 121(4):200 頁, 2012

24. 野澤恩美, 加来 賢, JM Rosales Rocabado, 魚島勝美: Heat Shock Protein27 の過剰発現が骨芽細胞の抗アポトーシス能・分化能に及ぼす影響. 第 121 回日本補綴歯科学会 横浜, 2012 年 5 月 27 日, 日本補綴学会誌 121(4):142 頁, 2012

〔図書〕(計 1 件)

1. 魚島勝美, 加来 賢: 歯根膜のメカノバイオロジー補綴臨床別冊 力を診る - 歯列を守る力のマネジメント -, 46-51 頁, 医歯薬出版, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加来 賢 (KAKU Masaru)

新潟大学 / 医歯学系 / 准教授

研究者番号: 30547542