

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792311

研究課題名(和文)加齢が矯正治療による歯肉退縮に与える影響

研究課題名(英文)The effect of aging in alveolar crestal bone loss during orthodontic treatment

研究代表者

馬谷原 琴枝(MAYAHARA, Kotoe)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60440046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：歯科矯正治療は歯槽骨頂や歯肉退縮といった副作用を招くことがあるがその頻度は若年者より成人に高い。歯周組織内の骨代謝能力が加齢に伴って変化していると推測し、様々な年齢のドナーから歯根膜を採取し、歯根膜中の多分化能を持つ未分化間葉系細胞(PDLSC)の割合の加齢との関連性やそのメカニカルストレス(MS)応答性について検討した。

PDLSC数はドナー年齢と相関はなかった。PDLSCはMS負荷によりBMP-2の発現がMS強度に依存して増加し、また強いMS負荷によりCOX-2発現も増加した。このことよりPDLSCにおいてMS負荷が骨リモデリング関連因子発現に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is shown that the alveolar crestal bone loss is high in adults than in young patients during orthodontic treatment. We suspect that the ability of bone remodeling is changed by age. Periodontal ligament tissue (PDL) retains the potential to differentiate into the cells that constitute the PDL. Also, it is reported that the human PDL-derived mesenchymal stem cells (PDLSC) were isolated from normal teeth. In this study we investigate the proportion of PDLSC in cultured PDL cells obtained from various age, and examined the response of mechanical stress. The results indicate that the proportion has not correlation to the donor age. Then the expression of Bone morphogenetic protein-2 was increased by the application of mechanical stress, also the expression of cyclooxygenase-2, which regulates the PGE2 was increased by the application of strong MS. It indicates MS affect the expressions of bone remodeling factors in PDLSC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：骨形成 矯正治療 加齢

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療に伴う副作用として歯槽骨頂吸収やそれとともに歯肉退縮があるが、その頻度は若年者と比較し成人治療患者に多いことが報告されている(Lupi et al, Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1996)。歯の移動は機械的矯正力が歯根膜を介し歯槽骨に伝達され骨リモデリングにおける骨吸収と骨形成により起こると考えられているが、加齢によりその骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、歯の周囲骨歯槽骨頂の吸収が起こると考えられる。これまでに、我々は各年齢のドナーから採取したヒト培養歯根膜細胞に矯正力に類似したメカニカルストレスを負荷すると、強い骨吸収能を有する起炎物質 prostaglandin E₂ (PGE₂)とその律速酵素である cyclooxygenase-2 (COX-2)の産生が亢進され、その産生量は加齢に伴い顕著に増加し、またメカニカルストレスを負荷しない状態においては上記因子発現について加齢による変化はないことを報告した(J Period Res. 2007)。これらのことから機械的矯正力負荷により歯周組織の炎症性反応が加齢に伴い増加し、代謝の分解系への傾きが促進されていると考えられた。しかし加齢が骨形成に関与する因子にどのような影響をもたらすかについては明らかにされていない。そこで本研究では歯根膜細胞のメカニカルストレス負荷による骨形成について、加齢が骨形成に与える影響を検討することとした。骨形成は間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化し、骨が形成されると考えられるが、近年歯根膜の中には骨芽細胞への分化など、多分化能をもつ未分化間葉系細胞が存在する (Phipps et al, 1997) または幹細胞が存在する (Seo et al, Lancet. 2004) ことが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、成人患者の矯正治療における歯槽骨頂吸収、歯肉退縮のメカニズムを明らかにすることを目的とし、加齢による歯根膜組織のメカニカルストレス応答性の違いについて明らかにすることを目標とする。若年から高齢まで様々な年齢のドナーの歯根膜を採取、培養後 FACS にて CD146 陽性細胞群を分取し、CD146 陽性細胞数と陰性細胞数の割合の加齢変化について検討を行う。Flexercell Strain Unit を用い CD146 陽性細胞にメカニカルストレスを負荷し、骨リモデリングのバランスの変化 (骨芽細胞形成と破骨細胞形成のバランスの変化) に対する加齢の影響について検討する。さらに CD146 陽性細胞、CD146 陰性細胞、CD146 陽性細胞を分化させた骨芽細胞へのメカニカルストレス応答性の違いについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 矯正治療の目的で抜歯した 10~50 歳代ドナーから歯根膜採取し、Somerman らの方法 (J Dent Res, 1988) に従い培養、増殖さ

せ歯根膜細胞を得る。

(2) Fluorescence activated cell sorter (FACS) にて間葉系細胞のマーカー (CD146, CD44, CD90)、造血系幹細胞のマーカー (CD45) を用い、歯根膜由来間葉系幹細胞 (CD146 陽性細胞) 群と歯根膜線維芽細胞 (CD146 陰性細胞) 群を分取する。培養ヒト歯根膜細胞における CD146 陽性細胞数と CD146 陰性細胞数の割合と、ドナーの年齢との関連性について検討を行う。

(3) 各ドナーの CD146 陽性細胞、CD146 陰性細胞をそれぞれシリコンゴム底面の Flexercell 培養ディッシュに 5.0×10³ 個 / cm² となるように播種し Flexercell Strain Unit を用い 3%, 9%, 18% の周期的牽引力 (MS) を 48 時間負荷する。MS 負荷 48 時間後の細胞、培養上清を回収し、骨形成因子 (Runx2, Osterix, BMP-2 等)、破骨細胞形成因子 (COX-2, PGE₂, RANKL, OPG, M-CSF) について、遺伝子発現については real-time PCR 法、タンパク発現については Western blot 法、PGE₂ 産生量は ELISA 法にて検討する。

4. 研究成果

(1) 矯正治療の目的で来院したドナー 10 名 (11 歳 ~ 36 歳) の小臼歯を便宜抜歯してヒト歯根膜由来細胞 (hPDL 細胞) を採取した。hPDL 細胞から外生する CD146 陽性細胞の割合は平均 49.1 ± 12.4% であり、ドナーの年齢との相関はなかった (図 1)。

Number	Age	gender	CD146 (%)	Culture time (days)	CD146+ P7 (%)
1	14	M	64.8	60	-
2	35	F	60.6	45	-
3	11	F	36.2	38	-
4	19	M	47.3	61	-
5	36	F	35.9	34	-
6	27	F	33.0	30	-
7	16	F	54.3	31	95.5/84.7
8	13	F	64.0	36	-
9	11	F	46.2	28	92.0
10	21	F	40.1	36	-
Average	20.3 ± 9.4		49.1 ± 12.4	39.9 ± 11.8	90.7 ± 5.5

図 1

また CD146 陽性細胞のうち CD146 発現が強く認められた約 20% の細胞群 (CD146 + 細胞群)、CD146 発現がみられない約 20% の細胞群 (CD146 - 細胞) を分取した。各細胞群の多分化能は CD146 + 細胞群は 146 - 細胞群と比較し有意に高い細胞増殖能を示した。また CD146 + 細胞群は骨芽細胞への分化能が高く (図 2 A アルカリフォスファターゼ活性染色, B Alizarin Red S 染色)、CD146 - 細胞群は軟骨細胞への分化能が高いことが示された (図 3)。

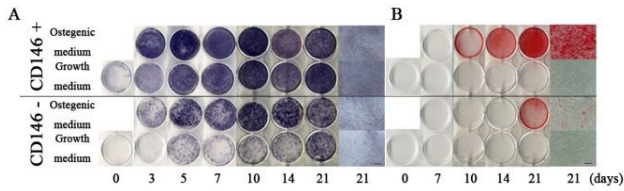


図 2

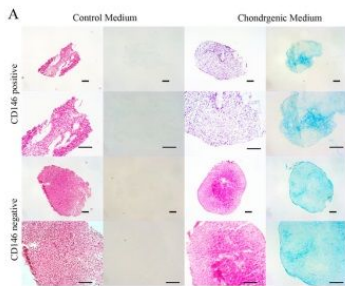
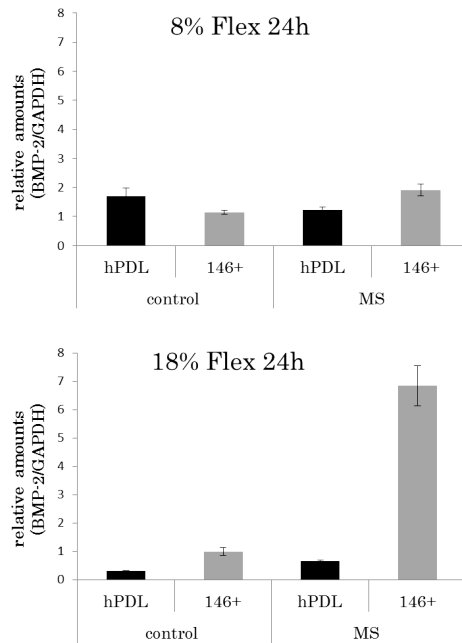
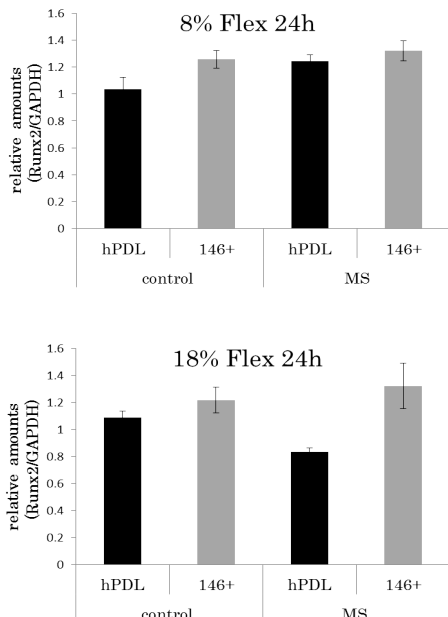


図 3

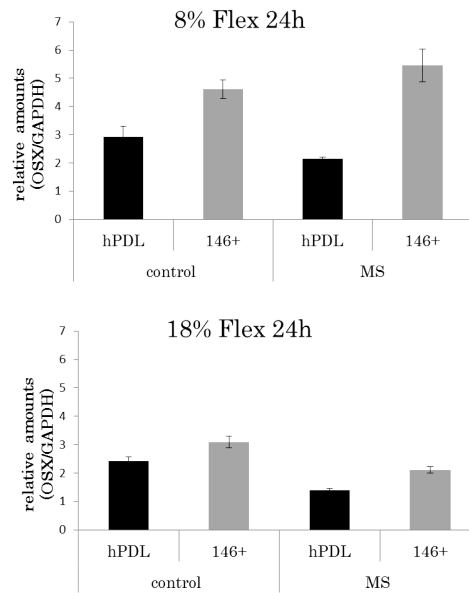
(2) 同一ドナーから得た CD146+ 細胞と hPDL 細胞に 8% および 18% のメカニカルストレスを 24 時間負荷し Runx-2, BMP-2, Osterix および COX-2 遺伝子発現について検討した。

Flexercell 培養ディッシュに播種し培養を行った非刺激群 (コントロール) において CD146+ 細胞群は hPDL 群と比較し Runx-2, Osterix の発現が高かった。

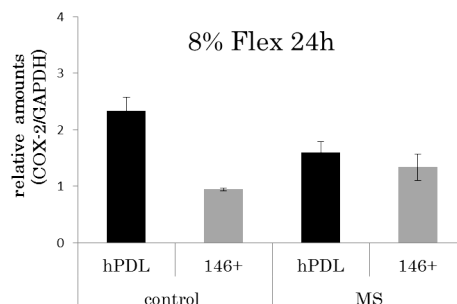
MS 負荷の各遺伝子発現にあたる影響について検討した結果、8% MS 負荷では両細胞群とも Runx-2 発現に変化はなく BMP-2 発現は 146+ 細胞のみ有意に増加した。また 18% MS 負荷により hPDL 細胞群の Runx-2 発現が有意に減少し、一方 CD146+ 細胞群の BMP-2 発現は有意に増加した。

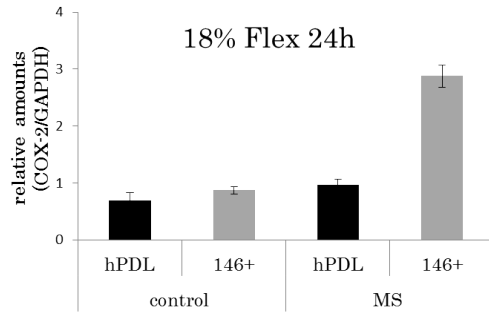


Osterix 発現については CD146+ 細胞群のほうが高く、8% MS 負荷により発現量が増加したが 18% MS 負荷により両細胞群とも発現量が減少した。



また COX-2 の発現は 18% MS 負荷により 146+ 細胞群のみ有意に増加した。





これらの結果より CD146+細胞は hPDL 細胞と MS 応答性が異なり、hPDL 細胞と比較し MS 応答し骨形成関連因子がより産生されることが示唆された。146+細胞は MS に応答し BMP-2 発現を増加し、また MS の強さに依存し発現が増加することが示唆された。しかし、一方で強い MS (18%) 負荷により、PGE₂ の律速酵素 COX-2 発現が増加することより、骨リモデリング調節が変化すると考えられる。今後、骨形成、骨吸収に関連する因子について引き続き検討する必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Saito Y, Watanabe E, Mayahara K, Watanabe N, Morokuma M, Isokawa K, Shimizu N, Honda M CD146/MCAM surface maker for identifying human periodontal ligament derived mesenchymal stem cells. Hard Tissue Biol 22, 115-128, 2013 (査読有り)

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬谷原 琴枝 (MAYAHARA, Kotoe)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：6 0 4 4 0 0 4 6