

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792320

研究課題名(和文) 歯根膜線維芽細胞による破骨細胞制御機能に及ぼす咀嚼刺激の影響について

研究課題名(英文) Effect of the occlusal stimuli on osteoclastogenesis induced by periodontal fibroblasts.

研究代表者

高橋 智美 (TAKAHASHI, TOMOMI)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・技術専門職員

研究者番号：50399953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、咀嚼刺激が歯根膜線維芽細胞による破骨細胞の制御に及ぼす影響を調べることを目的として、Wistar Ratの左上顎臼歯を抜歯し、3週間後に左右下顎臼歯から、右下顎を咬合側、左下顎を抜歯側として歯根膜線維芽細胞を分離培養した。抜歯側の歯根膜線維芽細胞ではOPGの発現が低下していた。破骨細胞前駆細胞との共存培養では、咬合側に比べて抜歯側で大型の破骨細胞が多く誘導される傾向が認められた。以上のことより、歯根膜線維芽細胞における破骨細胞制御因子の発現は、咬合力の喪失により変動し、破骨細胞の分化・誘導能に咬合力が影響している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to investigate the effect of the occlusal stimuli on osteoclastogenesis induced by periodontal ligament (PDL) cells. PDL cells were isolated from lower molar teeth of Wistar rats which were treated with extraction of upper molar teeth in one side 3 weeks previously. In co-cultures of murine osteoclastic precursors (RAW 264.7) and PDL cells on both occlusal and non-occlusal side, the formation of multinucleated, TRAP positive cells and molecules involved in osteoclast formation were evaluated. The results showed that the number of osteoclasts and the size of cells were significantly augmented in non-occlusal side compared to occlusal side. In addition, OPG expression of PDL cells in non-occlusal side was slightly reduced on Western blotting compared to occlusal side. These findings suggest that the occlusal stimuli on periodontal ligament strongly influence osteoclast differentiation via OPG induced by PDL cells.

研究分野：硬組織解析学

キーワード：歯根膜線維芽細胞 破骨細胞誘導能

1. 研究開始当初の背景

歯根膜組織は、咬合力のようなある一定のメカニカルストレスを与えられることによってその形態的・機能的恒常性を維持している。歯根膜線維芽細胞(以下 PDL 細胞)は、破骨細胞制御因子である RANKL,OPG,OPNなどを発現しており(Bloemen et.al. J.Cell Phys.,2009)、PDL 細胞による破骨細胞性骨吸収の制御が、歯槽骨の改造へ関与していると言われている。このことより、メカニカルストレスは破骨細胞性骨吸収を介して歯槽骨の維持にも影響していると考えられる。

これまでも咬合と歯槽骨吸収について、PDL 細胞による顎骨改造への影響が言われているが、従来の多くは矯正力などをモデルとした急激な負荷による短期的変化を検索したものである。一方、咬合力の減弱および喪失が PDL 細胞による破骨細胞の制御にいかなる影響を与えるのか検索したものはなく、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

「咀嚼刺激が、PDL 細胞による破骨細胞の制御機能にいかなる影響を与えるか」という点に着目し、咬合力喪失を示す実験モデルを作成して、PDL 細胞の破骨細胞制御に関わる因子の発現を検索する。さらに破骨細胞前駆細胞との共存培養を行い、破骨細胞の分化・誘導能について検討する。

3. 研究の方法

(1) 組織学的検索

生後 4 週齢の雄 Wistar Rat をエーテル麻酔下で上顎左側 M1、M2 を抜去した。抜歯後 3 週間後に下顎骨を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリンで 2 日間固定した。10% EDTA にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、4 μ m の薄切標本を作成した。HE 染色および TRAP 染色を施し、歯槽骨および歯根膜組織の形態学的変化について組織学的検索を行った。

(2) PDL 細胞の分離培養

生後 4 週齢の雄 Wistar Rat をエーテル麻酔下で上顎左側 M1、M2 を抜去し、抜歯後 3 週間後に、下顎両側臼歯を採取した。歯根膜組織の付着した抜去歯を、2 mg/ml コラゲナーゼ添加 MEM および 0.1% トリプシン液で処理し、細胞を分離した。集めた細胞を 10% FBS 含有 MEM 培地にて 1 ~ 2 週間培養し、得られた細胞を咬合側(下顎右側)および抜歯側(下顎左側)の PDL 細胞として以下の実験に使用した。

(3) 破骨細胞制御因子の発現

蛍光免疫染色：分離培養した PDL 細胞を PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒド液で固定後、0.3% triton-X 100 で透過処理を行った。1% BSA にてブロッキング後、抗 RANKL 抗体および抗 OPG 抗体を反応させ、二次抗体として蛍光標識抗 rabbit-IgG 抗体を用いた。核染色後、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

ウェスタンブロッティング法：分離培養した PDL 細胞は PBS 洗浄後、NP-40 Lysis Buffer にて可溶化し、遠心後上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液は SDS-PAGE にて展開後、PVDF メンブレンに転写した。抗 RANKL 抗体、抗 OPG 抗体および二次抗体には HRP 標識抗 rabbit-IgG 抗体を用い、SuperSignal West Femto detection kit (Pierce) にて検出を行った。

(4) 共存培養による破骨細胞の誘導

24 well plate に咬合側および抜歯側の PDL 細胞をそれぞれ 10000 cells / well 播種し、同数の破骨細胞前駆細胞(RAW246.7 細胞)を播種した。10 ng/ml sRANKL および 500 ng/ml anti-OPG を添加した FBS 10% 含有 MEM 培地で、2 日おきに培地交換しながら 6 日間共存培養を行った。PBS で洗浄後、ホルマリン固定を行った。TRAP 染色を施し、陽性細胞を観察した。

(5) PDL細胞培養上清を用いた培養

24 well plateに10000 cells / wellでRAW細胞を播種し、咬合側および抜歯側のPDL細胞の培養上清を用いて培養を行った。培養上清は遠心して余分な細胞等を除き、3%FBSと10ng/ml sRANKL、500ng/ml anti-OPGを添加したものを培養液として使用した。培養液を2日おきに交換しながら6日間培養した。PBS洗浄およびホルマリン固定後、TRAP染色を行い、陽性細胞を観察した。

4 . 研究成果

(1) 組織学的検索 (図 1、 2、 3)

下顎M1の歯槽骨において、咬合側に比べて抜歯側の歯根膜腔の狭窄がみられ、歯根膜組織の萎縮性変化がみられた。(図 1、 2) また、舌側歯槽骨頂部において、抜歯側ではTRAP陽性細胞がみられたのに対し、咬合側ではほとんど認められなかった。(図 3)

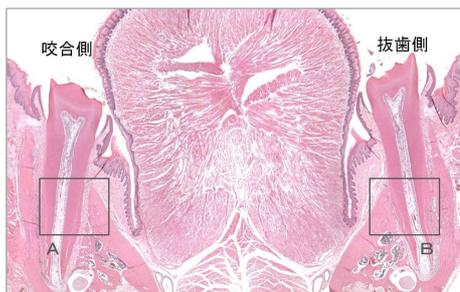


図 1

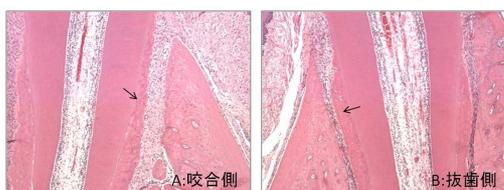


図 2

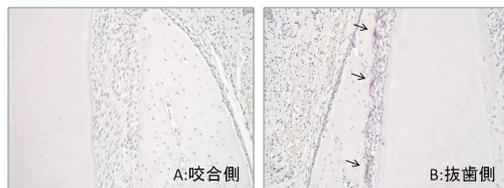


図 3

(2) 破骨細胞制御因子の発現 (図 4、 5)

蛍光免疫染色では、咬合側、抜歯側ともにRANKL および OPG 陽性細胞が多数認められた。 ウェスタンブロッティング法におい

ても RANKL および OPG タンパクの発現が確認され、抜歯側で OPG の発現量が低下している傾向が認められた。

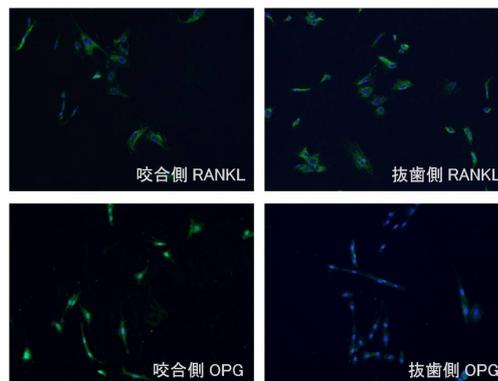


図 4



図 5

(3) 共存培養による破骨細胞の誘導

(図 6、 7、 8)

10ng/ml sRANKL 添加時、および 10ng/ml sRANKL + 500ng/ml anti-OPG 添加時の共存培養では、咬合側、抜歯側ともに TRAP 陽性細胞が認められたが、抜歯側では咬合側に比べ大型の細胞が多くみられた。TRAP 陽性を示す 2 核以上の細胞数および TRAP 陽性細胞の面積を計測した結果では、抜歯側で数が多く、大型の破骨細胞が誘導された。

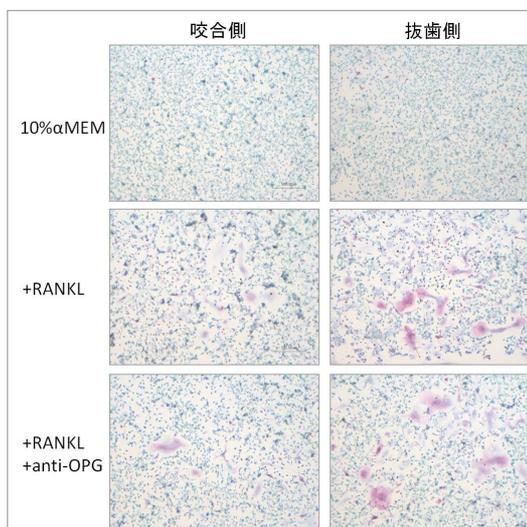


図 6

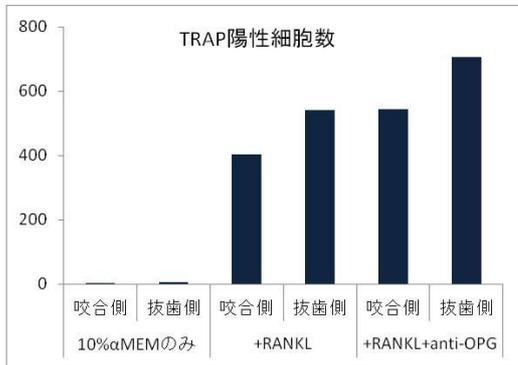


図 7

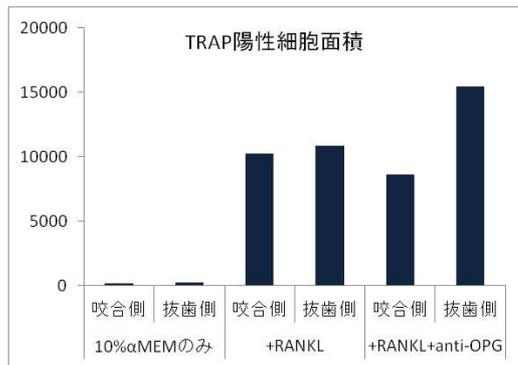


図 8

(4) PDL細胞培養上清を用いた実験

(図9)

10ng/ml sRANKL 添加時、および 10ng/ml sRANKL + 500ng/ml anti-OPG を添加した培養液では、咬合側、抜歯側ともに TRAP 陽性細胞が認められたが、抜歯側では咬合側に比べて TRAP 染色性が強く、大型の細胞が誘導される傾向がみられた。

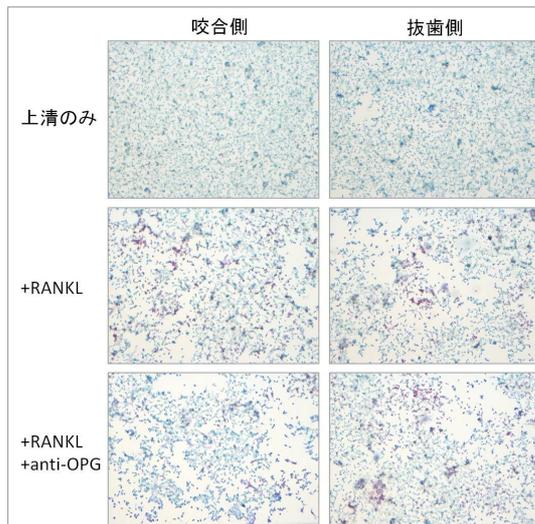


図 9

本研究では、咬合力を喪失した際のPDL細胞について、破骨細胞制御に関わる因子検索および破骨細胞の分化・誘導能について検討を行った。分離培養したPDL細胞は、咬合側に比べて抜歯側でOPGの発現量が低下していた。共存培養および上清を用いた培養による破骨細胞誘導実験については、10ng/ml sRANKL および500ng/ml anti-OPGを添加した際に、咬合側に比べて抜歯側で大型の破骨細胞が多く誘導される傾向が認められた。これは、咬合力を喪失したPDL細胞ではOPGの発現が減少し、さらにanti-OPGを添加することで、破骨細胞制御におけるOPGの作用が著しく低下したために、大型の破骨細胞が誘導されたと考えられた。

以上のことより、PDL細胞における破骨細胞制御因子の発現は、咬合力の喪失により変動することが明らかになり、破骨細胞の分化・誘導能に咬合力が影響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) Akira SAITO, Emiko SAITO, Yasuo UEDA, Yoshihiro SHIBUKAWA, Yoshiyuki HONMA, Tomomi TAKAHASHI, Marioko KIMURA, Yoshinori KUBOKI, Hiroshi KATO. Effect of tunnel structure of beta-TCP on periodontal repair in class furcation defect in dogs. Bioceramics Development and Applications. 査読有、4(1):73, 2014

DOI:10.4172/2090-5025.1000073

(2) Akira SAITO, Emiko SAITO, yoshinori KUBOKI, Marioko KIMURA, Toshinori NAKAJIMA, Funihiko YUGE, Tsuyoshi KATO, Yoshiyuki HONMA, Tomomi TAKAHASHI, Noboru OHATA. Periodontal

regeneration following application of basic fibroblast growth factor-2 in combination with beta tricalcium phosphate in class furcation defect in dogs. Dental Materials Journal. 査読有、32(2):256-262, 2013
DOI:10.4012/dmj.2012-171

(3) Emiko SAITO, Akira SAITO, Yoshinori KUBOKI, Mariko KIMURA, Yoshiyuki HONMA, Tomomi TAKAHASHI, Masamitsu KAWANAMI. Periodontal repair following implantation of beta-tricalcium phosphate with different pore structures in class furcation defects in dogs. Dental Material Journal. 査読有、31(4):681-688, 2012
DOI:10.4012/dmj.2011-259

〔学会発表〕(計2件)

(1) 高橋智美、牛島夏未、滝田裕子、飯塚 正 . 歯根膜線維芽細胞による破骨細胞制御機能に及ぼす咬合力の影響 . 第 56 回歯科基礎医学学会学術大会・総会 2014/09/26 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

(2) 高橋智美、牛島夏未、滝田裕子、飯塚 正 . ラット歯肉由来間葉系幹細胞による硬組織形成について . 第 55 回歯科基礎医学学会学術大会・総会 2013/09/22 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 智美 (TAKAHASHI, Tomomi)
北海道大学・大学院歯学研究科・技術専門
職員

研究者番号 : 50399953