

歯根膜線維芽細胞に対する遠心力の影響

大久保 裕一郎

松本歯科大学大学院 硬組織疾患制御再建学講座 遺伝子・再生工学ユニット

The effect of centrifugal force in periodontal ligament fibroblasts

YUICHIRO OKUBO

*Molecular and Cellular Engineering Unit, Department of Hard Tissue Research,
Graduate School of Oral Medicine, Matsumoto Dental University*

矯正臨床における歯の移動は、歯根膜 (PDL)、骨および歯肉に対する持続的な機械的力 (メカニカルストレス) の適用によって達成される。それは、① PDL を傷つけること；つまり細胞外マトリックス (ECM) の損傷と、その後の回復へのプロセス、② 矯正力と細胞の相互作用、という2つの異なる事象の生体反応である。メカニカルストレスは圧迫力 (圧迫側) と牽引力 (牽引側) が現れるが、*in vivo* においては2つの力を分離することは不可能である。*in vitro* においてのみ圧迫力と牽引力を区別することができ、*in vitro* での矯正力の検討は生体組織細胞に対する圧迫力あるいは牽引力の直接効果をみることができ、一方、牽引刺激を与える方法は容易に工夫できるものの、圧迫刺激を与えた検討例は多くない¹⁾。

ここに紹介する論文の特徴は、遠心力を矯正力の圧迫モデルとして提唱し、培養ヒト歯根膜線維芽細胞に応用して ECM への影響を幾つかのタンパク質の mRNA 発現で検討したものである。

これに先立つ初期の研究で、Redlich²⁾らは培養イヌ歯肉線維芽細胞を用いて条件検討を行った。培養フラスコに水平ローターで遠心をかけ、トリパンプルーによる排除活性テストで細胞が90%残存する条件を検討したところ、1,000 rpm (167

g)、90分の遠心が効果的であった。この遠心力は33.5 g/cm²に相当し、臨床での矯正力の平均値に近似していた。計算は以下の式による。

$$P = (m \times r \times \text{rpm}^2 \times \pi^2) / (A \times 9.8 \times 900)$$

P = 細胞 1 cm² に対する圧力 kg,

m = 培地の量 (0.005 kg),

r = ローター半径 (0.15 m),

rpm = 1 分間あたりの回転速度 (1000),

A = 培地と細胞間の接触面積 (25 cm²)。

この条件を3代継代培養したヒト歯根膜線維芽細胞に応用し、10, 20, 30, 60, 90, 120分の遠心操作によるI型コラーゲン (Col-1)、マトリックス金属プロテアーゼ-1 (MMP-1)、TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases)-1, TIMP-2 の発現に対する影響を検討した。抽出した総 RNA に対して RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) を施した後、アガロースゲル上でエチジウムブロミドで染色したバンドを定量し、 β -アクチン量に対する相対的発現量を評価した³⁾。また、同様の実験でトロポエラスチン (Elastin) の発現もみた⁴⁾。

上記の条件で遠心力を与えた時、120分間の遠

心操作によって細胞死が20%に²⁻⁴⁾、150分間の遠心操作では同30%に²⁾達したことから、90分までの遠心操作で比較検討した。β-アクチンは、対照群(未処理)と比較して常に一定値を保ち、遠心力の負荷に対してその発現量に何ら影響が認められなかった。一方、MMP-1, Col-1, TIMP-1 & 2, Elastin では遠心力負荷の影響がわずか10分で現れ、30-60分でピークに達し、90分では対照群のレベルに戻っていた。

β-アクチンの発現量を1とした時の各々の分子の相対的な発現量

	遠 心 時 間 (分)			
	10	30	60	90
MMP-1	1.7	2.6	1.6	1
Col-1, TIMP-1 & 2	1.7	1.7	1.7	1
Elastin	2	5	4	1
β-アクチン	1	1	1	1

興味深いことに、MMP-1の発現増加と同時にCol-1, Elastinの発現も増加していた。これは組織のリモデリングを反映した結果と考えられる。また、遠心力負荷の影響は迅速な反応として現れ、ECMの集中的なりモデリングの後に急速に対照群のレベルに移行することを示唆した。この集中的なタンパク質の発現は、イヌを使った著者らによる*in vivo*の実験においてもみられている⁵⁾。

イヌに矯正装置を装着し、1, 2, 3, 7, 14, 28日経過後の歯肉でMMP-1, Col-1の発現をmRNAレベルで分析した。MMP-1は3日目までは何の変化もなかったが、7日目には対照群の20倍の値を示し、14日目には減少したものの15倍の値を保ち、28日目まで続いた。また、負荷を除いた4, 7, 14, 28日後の分析では、4日後で対照群のレベルに戻っていた。一方、Col-1の発現は矯正力負荷中にほとんど変化がなかったが、負荷除去後14日目に発現量が2.5倍と急激な増加を示し、28日後でも同様の値を示した。*in vivo*実験と*in vitro*実験では時間スケールが異なっているが、急激なタンパク質の発現が矯正力に対する応答として現れている。

著者らは、矯正力負荷によるECMの変化を培養細胞で再現しようとして遠心力をかけた。今回観察された歯根膜線維芽細胞でのリモデリングに関わるタンパク分子の迅速な発現応答は、歯根膜の非常に速い代謝回転と関連があるかもしれない。この点、矯正力負荷の実験モデルとして大変魅力的である。一方、臨床における矯正力と同等の圧力を加えていると計算されるにもかかわらず、①持続的な遠心負荷をかけられない、②細胞の反応が非常に短い時間で起きるためMMP-1とCol-1の発現量の相関を検討できない、③半定量で出されたデータには考察の限界がある、などの欠点が指摘できる。詳細な検討は、定量的なデータ分析に待ちたい。今後、確立された実験モデルとして提供されるよう、さらなる検討に期待したい。

文 献

- 1) 大嶋嘉久, 上松節子, 平岡行博, 栗原三郎 (2002) ヒト歯根膜線維芽細胞におけるメカニカルストレスによるIL-1β, MMP-1 (collagenase), collagen type-IのmRNAの発現について. 松本歯学 28: 7-12.
- 2) Redlich M, Palmon A, Zaks B, Geremi E, Rayzman S and Shoshan S (1998) The effect of centrifugal force on the transcription levels of collagen type I and collagenase in cultured canine gingival fibroblasts. Arch Oral Biol 43: 313-6.
- 3) Redlich M, Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Grosskop A, Bar Kana I, Pitaru S and Palmon A (2004) The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and beta-actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res 39: 27-32.
- 4) Redlich M, Asher Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Mussig D, Baumert U, Golan I and Palmon A (2004) Expression of tropoelastin in human periodontal ligament fibroblasts after simulation of orthodontic force. Arch Oral Biol 49: 119-24.
- 5) Redlich M, Reichenberg E, Harari D, Zaks B, Shoshan S and Palmon N (2001) The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type I, and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs. J Dent Res 80: 2080-4.