

〔原著〕 松本歯学 28 : 7 ~ 12, 2002

key words : メカニカルストレス—ヒト歯根膜線維芽細胞—IL-1 β —MMP-1—collagen type-I

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-1 β , MMP-1 (collagenase), collagen type-I の mRNA の発現について

大嶋嘉久, 上松節子, 平岡行博*, 栗原三郎

松本歯科大学 歯科矯正学講座

*松本歯科大学 口腔生化学講座

IL-1 β , MMP-1 and Collagen Type-I mRNA Expression of
Stretched Human Periodontal Ligament Fibroblasts.

YOSHIHISA OSHIMA, SETSUKO UEMATSU, B. YUKIHIRO HIRAOKA* and SABURO KURIHARA

Department of Orthodontics, Matsumoto Dental University School of Dentistry

**Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental University School of Dentistry*

Summary

Continuous stretched tension force was applied to human periodontal ligament fibroblasts to determine the effect of this stimulus on the relative expression of IL-1 β , matrix metalloproteinase (MMP)-1 and collagen type-I mRNA. The steady-state mRNA level for MMP-1 and collagen type-I mRNA were determined, however IL-1 β mRNA was not detected. The results indicate that continuous stretched force in this present study was clinically adapted as orthodontic force but weak to determine the expression of IL-1 β mRNA.

緒 言

歯科矯正学的歯の移動において、歯周組織に存在する細胞には、メカニカルストレスによる局所的な血管および結合組織の圧縮および伸展が生じる。その結果、歯根膜組織ではメカニカルストレスに起因する生体反応が生じ^{1,2)}、それに伴ってIL-1 β などの炎症性のサイトカインが産生される。これらの刺激に対して骨の細胞が応答する結果、骨改造現象が生じることで矯正的歯の移動が成立すると考えられている。物理的的刺激により細

胞内刺激伝達経路が活性化され³⁾、骨改造現象を調節するサイトカインなどの生理活性物質あるいは細胞外基質タンパク質の産生が亢進し、これらが骨形成系細胞あるいは骨吸収系細胞に作用することにより骨改造が進行すると報告されている⁴⁾。Uematsuら⁵⁾は矯正治療患者において歯肉溝滲出液中の炎症性サイトカインの動態について検討し、歯の移動に伴う歯周組織の改造に関与するIL-1 β などの炎症性サイトカインが経時的に変化することを示した。その経時的な変化から、骨改造現象に先立つ歯根膜組織での反応が反映さ

(2002年3月8日受付; 2002年4月24日受理)

*現所属: 松本歯科大学総合歯科医学研究所硬組織疾患制御再建学部門

れている可能性が示唆された。歯根膜の主要な構成細胞である歯根膜線維芽細胞へのメカニカルストレスの影響について、 PGE_2 産生、破骨細胞様細胞の形成および骨吸収活性の上昇⁹⁾ならびにアルカリホスファターゼ活性の上昇⁷⁾が報告されており、骨改変現象に歯根膜線維芽細胞が関与していることが示唆された。また、歯根膜組織中のcollagenについては、生理的状态下の歯根膜では他の結合組織に比べてcollagenの吸収ならびに新生が活発に行われ代謝回転が速く^{7,8)}、持続的加圧下では歯根膜線維芽細胞におけるcollagenの合成が抑制され、加圧刺激除去後はcollagen合成能が回復する⁹⁾ことが明らかになり、加圧刺激下においてcollagenは多様に応答する可能性が示唆された。また、伸展力により歯根膜線維芽細胞のHeat shock proteinの発現が増強されることも報告されている¹⁰⁾。これらの知見より、メカニカルストレスが歯根膜線維芽細胞の機能であるcollagenの吸収、新生に影響を及ぼしている可能性が推測される。collagenの合成と分解はcollagen遺伝子とマトリックス金属プロテアーゼ、MMPs (matrix metalloproteinases) ファミリーの一種であるMMP-1 (間質コラゲナーゼ) 遺伝子の制御下にあり、刺激に対するこれらの遺伝子の発現およびその変化は、矯正学的歯の移動に伴う骨改変機構における歯周組織の変化および歯周疾患の病原論を解明する上で重要と考えられるが、その遺伝子発現の詳細は未だ明確ではない。そこで、本研究は、持続的伸展刺激を加えたヒト歯根膜線維芽細胞でのcollagenの産生・分解の調節機構を分子生物学的に明らかにすることを目的として、メカニカルストレス負荷によるIL-1 β 、MMP-1、collagen type-IのmRNAの発現について検討した。

実験材料および方法

1. ヒト歯根膜線維芽細胞の採取と培養方法

十分なインフォームドコンセントを行い承諾を得た、臨床的に健全な歯周組織と歯髄を有している、12歳の治療開始前の矯正患者より提供された第一小白歯から歯根膜組織片を採取した。Shimizuらの方法¹¹⁾に準じて、この第一小白歯の歯頸部および根尖部を除く歯根中央3分の1部分より他の組織が混入しないように歯根膜組織片を

剥離し、10%牛胎仔血清 (FBS) および抗生物質添加培養液中で静置させ、5% CO_2 、37°Cインキュベーター中で培養した。歯根膜片からout-growthしたほぼ均一な紡錘形を呈している線維芽細胞をコンフルエントな状態となるまで培養してヒト歯根膜線維芽細胞を得た。初代培養で混入の可能性のある上皮系の細胞は、0.05% trypsin-0.02% EDTAを含むPBSの処理時間の調節で継代中に除いていった。5代目のコンフルエントな状態になった培養細胞をPBSおよびtrypsinで処理しその細胞浮遊液を収集し、6 hall plate (Flexercell strain unit) に播種し実験に用いた。

2. 伸展方法

ヒト歯根膜線維芽細胞をフレキシブルな底面を持つ6 hall plate (Flexercell strain unit) にて培養しコンフルエントな状態となった後、伸展刺激を与えた (図1)。本来、Flexercell strain unitは真空ポンプで断続的に培養プレート底部を吸引することにより、培養面に付着した細胞を引き伸ばすものである。しかしながら、矯正的歯の移動における組織学的変化を考慮した場合、培養プレート底部を持ち上げる方向のメカニカルストレスを加えるほうが、より矯正臨床での歯の移動様式の特に牽引側での組織変化に近い条件であると考えられた。そこで、予備実験よりプレートの底部からの力に耐えうる最大限の力で、かつ矯正臨床での犬歯、小白歯部における矯正力と同等の力として荷重を120gと設定した。荷重方法は図1に示すように、球状の台の上に6 hall plateを設

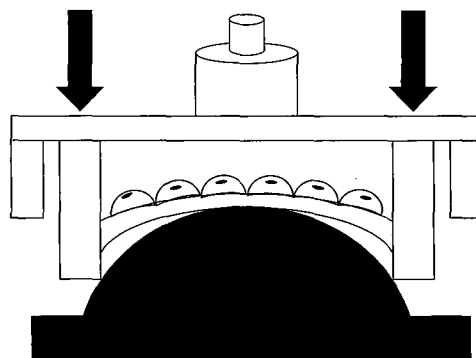


図1 : Mechanical stress system :
This apparatus is constituted with a strain unit to stretch the silicon bottom.

置し荷重を加えた。対照群としては6 well plate上に非荷重のものを設定し、荷重開始2時間後に細胞を回収した。実験群は2時間および24時間荷重し、それぞれ細胞を回収した。

3. Total RNA の採取

RNeasy Midi kit (QIAGEN 社) を用いて、 10^6 cell の培養細胞から Total RNA を精製した。低速回転で細胞を回収し、イソチオシアン酸グアニジンを含む緩衝液中で RNA を溶出させ、RNeasy Midi スピニングカラムを用い Total RNA を精製した。

4. First-strand cDNA の合成

吸光度計にて total RNA 量を測定し、そのうち200 ng を PCR buffer に加えて32 μ l とし、10分間の heat shock の後2分間水中で冷却した。次いで Poly-T を1 μ l (0.6 μ g) 加え Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biothec 社) で37°C, 60分間加温し cDNA を得た。0.5 M の EDTA を0.5 μ l 加え4°C で保存した。

5. Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応: PCR)

PCR は、*in vitro* で特定の DNA 配列を増幅する方法である。この反応は、2本の DNA 鎖、セ

ンス鎖・アンチセンス鎖に相補的な短鎖ヌクレオチド (プライマー) で増幅すべき DNA 配列をはさみ、プライマーの伸長反応は耐熱性 DNA ポリメラーゼによって行う。サイクル数を設定し、温度の周期変化だけで反復すれば、プライマーには含まれた DNA 配列を指数関数的に増幅できる。したがって、30サイクルの PCR によってターゲット DNA を約10億倍増幅することになる。一方、遺伝子発現の研究は mRNA 分子を検出しなければならないが、RNA を直接増幅する方法はないため、逆転写酵素 (Reverse transcriptase) を使用することで mRNA から cDNA を作製し PCR を行う (RT-PCR)。今回の実験では、プライマーは米国立医学図書館 (NLM) の生物工学情報センター (NCBI) DNA データバンクから β -actin, IL-1 β , MMP-1, collagen type-I の塩基配列を引用して作製し (表1)、上記の cDNA を1.5 μ l, センスプライマー1.5 μ l (15 pmol), アンチセンスプライマー1.5 μ l (15 pmol), Super Taq Premix kit (Sawady Technology 社; DNA ポリメラーゼ, dNTPs, Mg²⁺, 緩衝液を含む) 30 μ l を0.5 ml のマイクロチューブに入れ、サーマルサイクラーで PCR 増幅反応 (94°C で30秒, 50°C で30秒, 72°C で30秒, 30サイ

表1: Oligodeoxynucleotide primers used in the PCR.

	PCR 産物の分子量 (bp)
β -actin	
センスプライマー	
5'-CCG CGA GAA GAT GAC CCA GAT CAT GTT-3'	
アンチセンスプライマー	302
5'-GCT TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA-3'	
IL-1 β	
センスプライマー	
5'-GAT CAC TGA ACT GCA CGC-3'	
アンチセンスプライマー	369
5'-CAT CGA CAC CTC CAA GC-3'	
MMP-1	
センスプライマー	
5'-CAT CCA AGC CAT ATA TGG ACG TTC C-3'	
アンチセンスプライマー	611
5'-TCT GGA GAG TCA AAA TTC TCT TCG T-3'	
Collagen type-I	
センスプライマー	
5'-CTG GCA AAG AAG GGG GCA AA-3'	
アンチセンスプライマー	503
5'-CTC ACC AGC ATC ACC ACT C-3'	

クル)を行った。なお、RT-PCR法を行うにあたり、対照としてハウスキープジーンである β -actinを用いた。

6. 電気泳動と写真撮影

各PCR産物7 μ lに色素溶液(0.25%プロモフェノール青, 0.25%キシレンシアノール, 15%フィコール400) 3 μ lを加え、同時に1 kb DNA Ladder (GIBCO, BRL社) 0.3 μ gをDNA分子重量マーカーとして1%アガロースゲルにて泳動後、エチジウムブロミドで染色を施し紫外線照射下にて写真撮影した。

結 果

1. β -actinは、Cont., 2 h., 24 h.においてそれぞれ検出され、その量はほぼ同量であった(図2)。このことより一連の実験過程にほとんど誤差を生じさせなかったものと考えられた。また今回の実験モデルから十分なTotal RNAが採取されたことが確認できた。
2. IL-1 β は、Cont.に発現が見られなかったが、同様に、2 h., 24 h.にも発現は認められなかった。Shimizuら¹¹⁾の使用したプライマーを新たに用いて分析を行ったが同様の結果となり、今回の実験条件下ではIL-1 β を発現しなかったことを示した(図2)。

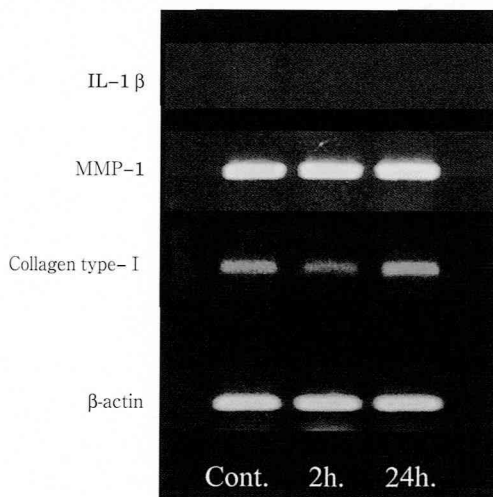


図2 : Expression of mRNA for IL-1 β , MMP-1, collagen type-I, β -actin in human periodontal ligament fibroblast for control, 2 hours and 24 hours as determined by RT-PCR using 30 cycles.

3. MMP-1はCont., 2 h., 24 h., 全ての試料において検出され、その発現量は β -actinと同様に顕著であり、経時的に発現量の変化は認められなかった(図2)。

4. collagen type-IはCont., 2 h., 24 h., すべてに検出されたが、 β -actinやMMP-1に比較して発現量は少なかった(図2)。

考 察

1. 方法について

培養細胞に対して臨床的な矯正力を加えるために、今まで様々な方法が試みられてきた。代表的なものとして、伸張力¹²⁾、静水圧¹³⁾、遠心力¹⁴⁾、ならびに圧迫加重^{15),16)}を利用した方法などがある。しかし、どの方法も装置の複雑さ、費用、加える力の調節方法などにおいて利欠点が認められ、臨床的矯正力の再現という点において多少なりとも問題がある。本研究では、臨床的に適切と考えられる矯正力を簡便に再現する方法として、細胞の底部から直接メカニカルストレスを負荷した。この方法によって持続的な伸展刺激を加えることが可能となり、これは*in vivo*における牽引側の歯根膜細胞に類似した状態と考えられた。予備実験で設定した120 gという負荷も、培養プレートの底面が剥がれることなくまた臨床的見地からも適切な荷重量と考えられた。しかしながら、もっと大きな荷重に耐えうる設計が可能であれば、荷重量の変化による発現の違いに関しても検討できたであろう。今後の課題としてさらに大きな荷重量が可能な実験モデルについても、検討する必要があると考えられた。

2. 結果について

骨芽細胞へのメカニカルストレスの負荷により、IL-1 β やPGE₂の産生が促進し、さらに1 kDa以下や5-20 kDaおよび50-60 kDaのタンパク質の産生が促進されることが報告されている^{17),18)}。また、細胞情報伝達物質としてのサイトカインの役割もRT-PCR法等を用いることで遺伝子レベルにおいて解析されつつあり、Shimizuら¹¹⁾はメカニカルストレス下のヒト歯根膜線維芽細胞におけるIL-1 β mRNAの発現について分析検討を行った結果、培養細胞のyoung, oldによってその発現に違いが出ることを明らかにした。そこで本実験でも、ヒト歯根膜線維芽細胞に

おける IL-1 β の発現に着目して実験を行ったが、その mRNA レベルでの発現を認めることはできなかった。この結果より骨芽細胞と歯根膜細胞でのメカニカルストレスに対する細胞の免疫応答が異なる可能性が示唆された。また、Shimizu らの報告ではメカニカルストレスを加えた young 歯根膜線維芽細胞では IL-1 β の発現が認められたが、同刺激を加えた old 歯根膜線維芽細胞での発現に比べると極めて微弱であった¹¹⁾。Kumar ら¹⁹⁾は old human diploid fibroblasts において IL-1 α および IL-1 β の発現は認められたが young cell では発現しないことを示している¹⁹⁾。この点について Shimizu らは cell type による発現の違いと、組織提供者の年齢について指摘している。すなわち、Shimizu ら¹¹⁾が用いたのは18から23歳の患者から採取された細胞であるのでこれらの歯根膜線維芽細胞はすでに IL-1 β を発現するのに十分な年齢であったと推察している。今回我々が用いた歯根膜線維芽細胞は Shimizu らの young 歯根膜線維芽細胞に相当するものであり、その組織提供者の年齢は12歳であったため、IL-1 β の発現に違いが生じたと考えられる。あるいは、臨床的な矯正歯の移動時のメカニカルストレスに相当すると考えられた今回の荷重に対して、歯根膜線維芽細胞のメカニカルストレス受容体の閾値が高く IL-1 β が発現しなかった可能性も示唆された。

一方、MMP-1 や collagen type-I は、メカニカルストレスの負荷の有無にかかわらず発現していることから、歯根膜線維芽細胞自体の細胞活性は衰えておらず、持続的伸展刺激下においても collagen の吸収・新生という代謝機構は維持されていると考えられた。しかしながら、その発現に有意な差が認められなかったことは、矯正臨床的に妥当と考えられるメカニカルストレス下では、その代謝機構に顕著な変化を示さない可能性も示唆された。

本研究から、ヒト歯根膜線維芽細胞に矯正臨床において適切と考えられる荷重のメカニカルストレスを負荷しても、必ずしも代表的な炎症性サイトカインである IL-1 β が顕著に発現するわけではないが、その持続的伸展刺激下において歯根膜線維芽細胞の代謝機能は維持されていたと推測された。このことは、たとえメカニカルストレスを

加えたとしても、弱い力すなわち矯正学的に適切と考えられる力であれば細胞の代謝機能は維持され、顕著な炎症性の免疫応答反応はおこらない可能性を示唆している。矯正臨床で歯の移動を行う際に、ヒト歯根膜線維芽細胞のメカニカルストレスに対する反応性の違いを生化学的、分子生物学的に解明していくことは重要である。また、より迅速で安全確実な矯正治療の実現の為に、メカニカルストレスの種類とその強さによる細胞性免疫応答反応の違いを検討することは必要と考えられる。今後、実験モデルの設計や条件を変えてヒト歯根膜線維芽細胞のメカニカルストレスによる細胞性の免疫応答反応とその代謝機構について分子生物学的に検討を加えていきたい。

(本研究の一部は、2001年度松本歯科大学特別研究補助金の補助を受けて行った。)

文 献

- 1) Baumrind S and Buck DL (1970) Rate changes in cell replication and protein synthesis in the periodontal ligament incident to tooth movement. *Am J Orthod* **57** : 109-31.
- 2) Ten Cate AR, Deporter DA and Freeman E (1976) The role of fibroblast in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am J Orthod* **69** : 155-68.
- 3) Ngan PW, Crock B, Varghese R, Lanese R, Shanfeld J and Davidovitch Z (1988) Immunohistochemical assessment of the effect of chemical and mechanical stimuli on camp and prostaglandin E level in human gingival fibroblast *in vitro*. *Arch Oral Biol* **33** : 163-74.
- 4) 小澤英浩, 岩久文彦, 江尻貞一, 大御 寛, 小黒一郎, 江亀美幸, 入江一元, 中村浩彰, 山田一尋 (1988) : 骨吸収と骨形成の連鎖機構に関する微細構造学的・組織学的研究 : 「咀嚼システムの基礎的研究」総括班編 咀嚼システムの形成と適応, 203-29, 風人社, 東京.
- 5) Uematsu S, Mogi M and Deguchi T (1996) Interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , epidermal growth factor, and β 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* **75** : 562-7.
- 6) Sato K, Fujii Y, Kasano K, Saji M, Tsushima T and Shizume K (1986) Stimulation of prostaglandin E 2 and bone resorption by recombinant human interleukin 1 alpha in fetal mouse

- bones. *Biochem Biophys Res Commun* **138** : 618-24.
- 7) 斎藤 滋 (1990) ヒト歯根膜線維芽細胞の生化学的研究; ヒト歯周組織由来の線維芽細胞および歯槽骨骨芽細胞の細胞生化学的研究「平成元年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書(課題番号62480383)」。横須賀, 神歯大, 26-37.
 - 8) 矢嶋俊彦 (1983) 歯周組織の改造現象. *細胞* **15** : 409-13.
 - 9) 小林元夫 (1993) 持続的加圧刺激がヒト歯根膜線維芽細胞のタンパク質合成に与える影響について. *日矯歯誌* **52** : 372-8.
 - 10) 岡崎雅子, 清水義之, 千葉美麗, 三谷英夫 (2000) 周期的伸展力によるヒト歯根膜線維芽細胞のストレスタンパク質の発現に関する研究. *東北大歯誌* **19** : 108-15.
 - 11) Shimizu N, Goseki T, Yamaguchi M, Iwasawa T, Takiguchi H and Abiko Y (1997) In vitro cellular aging stimulates interleukin-1 β production in stretched human periodontal-ligament-derived cells. *J Dent Res* **76** : 1367-75.
 - 12) Hasegawa S, Sato S, Suzuki Y and Brunette DM (1985) Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. *Calcif Tissue Int* **37** : 431-6.
 - 13) 相馬俊一 (1989) 成長期のウサギ鼻中隔, 蝶後頭軟骨結合, 下顎頭より分離した軟骨培養細胞の増殖, 分化機能に対する静水圧の影響に関する研究. *阪大歯誌* **34** : 8-25.
 - 14) 小森 成, 鈴木弘之 (1991) ヒト由来骨芽細胞様細胞に対する遠心力負荷の影響に関する研究. *日矯歯誌* **50** : 448-57.
 - 15) 金井鐘秀, 野原廣美, 花田晃治 (1992) 持続的加圧刺激がヒト歯根膜線維芽細胞に及ぼす初期効果について. *日矯歯誌* **51** : 153-63.
 - 16) 安井滋一, 前田 隆, 亀田 剛 (1998) メカニカルストレスに対する骨芽細胞と歯根膜細胞の反応性の違いについて. *歯学* **86**(1) : 64-71.
 - 17) Leung DYM, Glagov S and Mathews MB (1977) A new *in vitro* system for studying cell response to mechanical stimulation : Different effects of cyclic stretching and agitation on smooth muscle cell biosynthesis. *Exp Cell Res* **109** : 285-98.
 - 18) Kawase T, Sato S and Miyake K (1988) Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. *Adv Dent Res* **2** : 234-9.
 - 19) Kumar S, Mills AJ and Baglioni C (1992) Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **89** : 4683-7.