

In Vitro ヒト歯根膜様組織に対する至適矯正力の探索

研究者氏名：廖 文

所属機関名：大阪歯科大学歯科矯正学講座

要 旨

矯正力を歯根膜に加えることによって、歯根膜が様々な成長因子を分泌し、歯槽骨を吸収する。適正な矯正力は至適矯正力という、それは最大の骨吸収を引き起こす最小な矯正力である。至適矯正力を明らかにすることは、矯正歯科治療の効果を高める上で有意義であると考えられる。われわれは、ヒト歯根膜細胞をポリ乳酸不織布で三次元培養することによって、*In Vitro* 歯根膜様組織を作成した。*In Vitro* 歯根膜様組織に対して負荷をかけた。異なる負荷に対して、走査型顕微鏡写真で、細胞および細胞外マトリックスの形態学的変化が認められなかった。さらに、カスパーゼ-3/7 蛍光染色写真で細胞のアポトーシスの変化も認められなかった。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって負荷および負荷の期間における遺伝子発現の変化が認められた。以上、矯正力は歯根膜で引き起こす反応がシミュレートされたと判断し、*In Vitro* 歯根膜様組織は歯根膜圧迫側の至適矯正力シミュレーションに適するモデルであることを証明した。さらに、現在、歯根膜牽引側モデルの材料として使われるジメチルポリシロキサン（PDMS）膜の疎水性を改良するため、放電プラズマやフィブロネクチンタンパク質による表面処理を行った。その結果、フィブロネクチンタンパク質処理群の表面荒さは最も大きかったか、放電プラズマ処理群の純水表面接着角は最も小さかった。そして、1h と 24h の細胞接着実験では、放電プラズマ処理群および放電プラズマとフィブロネクチンタンパク質の二重処理群において、PDMS の細胞接着性の有意な上昇が認められた。

Key Words 至適矯正力 歯根膜細胞 *In Vitro* シミュレーション

緒 言：

至適矯正力を明らかにすることは、矯正歯科治療の効果を高める上で有意義であると考えられる。われわれはヒト歯根膜細胞を用いて、ポリ乳酸不織布を足場材料とし、歯根膜様組織を *In Vitro* で作製した。本研究では三次元 *In Vitro* 歯根膜様組織を歯根膜圧迫側モデルとして使用し、それに対して負荷をかけることで矯正力をシミュレートし、形態学的な変化と遺伝子発現の解析を行った。その後、歯根膜牽引側モデルとしてすでに使用されている PDMS 膜の疎水性を改良し、それを歯根膜細胞の有効な培養に使えるどうかを確認した。

対象と方法：

三次元 *In Vitro* 歯根膜様組織の足場材料は、溶媒キャスト粒子溶出法で作製した。すなわち、ポリ-L-乳酸をジクロロメタンに溶解させ、塩化ナトリウムと混合し足場材料を作製した。足場材料の厚さは $400 \pm 50 \mu\text{m}$ 、気孔率は 83.3%、気孔サイズは $75\text{--}150 \mu\text{m}$ 、形状は円形、直径は 0.6 cm とした。 1×10^5 個ヒト歯根膜細胞を足場材料上に遠心回転で播種し、14日間培養することによって *In Vitro* 歯根膜様組織を作製した。その後、*In Vitro* 歯根膜様組織にステンレス球を用いて 5、15、25 および 35 g/cm^2 の負荷をかけ、5% C

O₂、37℃の条件で14日間培養した。(図1) 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、細胞および細胞外マトリックスの形態学的変化の評価を行った。さらに、蛍光染色を行い、カスパーゼ-3/7を用いて細胞のアポトーシスについて調べた。その後、トータルRNAを抽出しcDNAを合成し、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて、負荷および負荷の期間における遺伝子発現の変化を調べた。

牽引側モデルとして使用するPDMS膜は、処理方法によって、3つの実験群と1つの対照群に分類した。実験群 (NP) では、Strex社製の放電プラズマ処理機を用いてPDMS膜を処理し、実験群 (NF) では、37 °C の 0.02 mg/ml フィブロネクチン溶液中30分間浸漬し、実験群PFのPDMS膜においては、NP群の様な処理を行った以後、NF群と同様の処理を行った。対照群 (NN群) は非処理群とした。原子力顕微鏡 (AFM) を用いて材料表面の荒さを調べ、純水を用いて材料表面の接着角 (濡れ性) を調べた。その後、 6×10^4 個ヒト歯根膜細胞を256 mm²のPDMS膜に播種し、蛍光染色および細胞数自動計測システムを用いて、播種後1hの細胞接着数を調べ、WST-8細胞記数試薬を用いて、播種後24hの細胞接着数を調べた。

結 果：

三次元 *In Vitro* 歯根膜様組織においては、SEMで負荷後の表面を観察するどころ、細胞および細胞外マトリックスの形態変化が認められなかった。(図2) また、その断面観察にも同様な結果が得られた。(図3) カスパーゼ-3/7蛍光染色では、負荷および負荷の期間が蛍光の強度に影響を及ぼさないことが分かった。(図4) PCRの結果から、7日目と14日目のRANKL遺伝子および14日目BMP-2遺伝子の発現については、15および35g/cm²の負荷が他の負荷と比較して最も高かったものの、Double Peakの傾向を示した。14日目のALP遺伝子とPLAP-1遺伝子の発現については、5g/cm²の負荷で最も高かった。FGF-2およびOPG遺伝子の発現については、負荷とはかかわらず、14日の発見は最も高かった。I型コラーゲンの7日目と14日目の遺伝子発現は、負荷とはかかわらず、1日目および3日目より高かった。(図5)

牽引側モデル実験においては、NF群の表面荒さは2.630nmと最も大きかった。(図6) NP群の純水表面接着角は $6.42 \pm 2.00^\circ$ と最も小さかった。(図7) 播種後の細胞接着量は、1hと24hと関係なく、NPとPF群はNF群より有意に高かったと、全ての実験群は対照群より有意に高かった。(図8、図9)

考 察：

In Vitro ヒト歯根膜様組織に対し矯正力をシミュレートした負荷をかけても、細胞数の形態学的な変化やアポトーシスは認められないことが分かった。一方、負荷および負荷の期間により遺伝子発現の変化を認め、矯正力の生体反応を *In Vitro* でシミュレートすることが示唆された。

牽引側モデル実験においては、放電プラズマ処理や放電プラズマとフィブロネクチンの二重処理は、PDMS膜の歯根膜細胞接着性を増強した。今後、細胞進展実験機を用いて、牽引伸展時PDMS膜からの細胞数の変化および細胞の遺伝子発現を調べ、適切な表面処理方法をさらに絞り込む予定である。

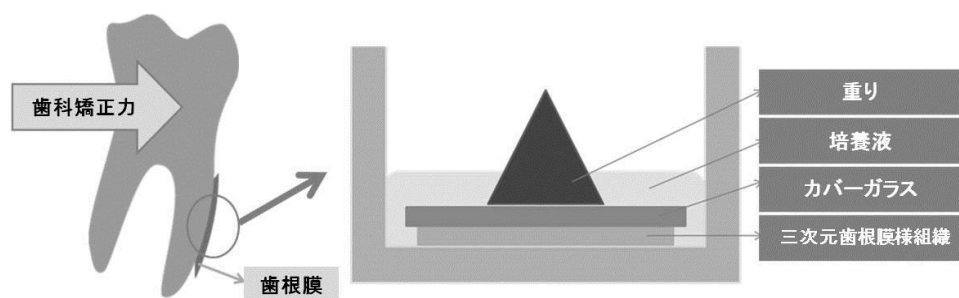


図1

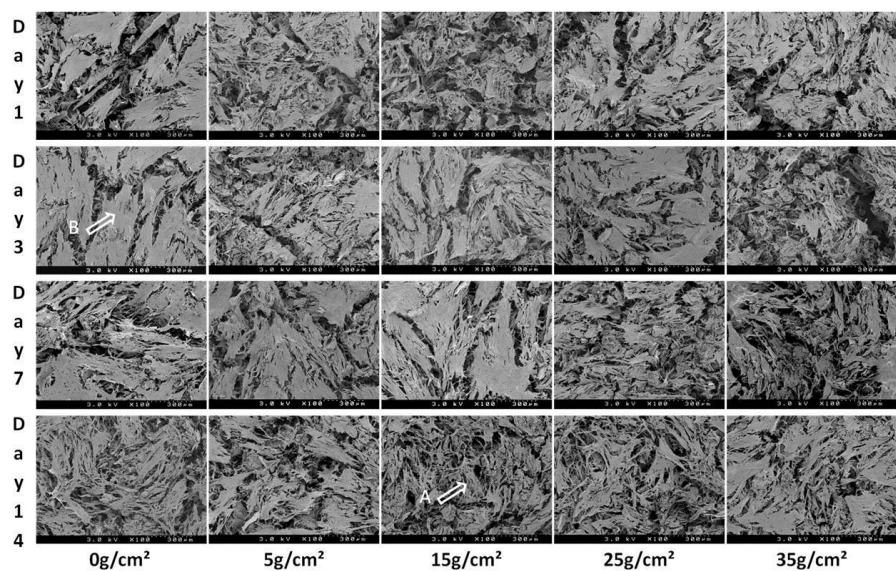


图2

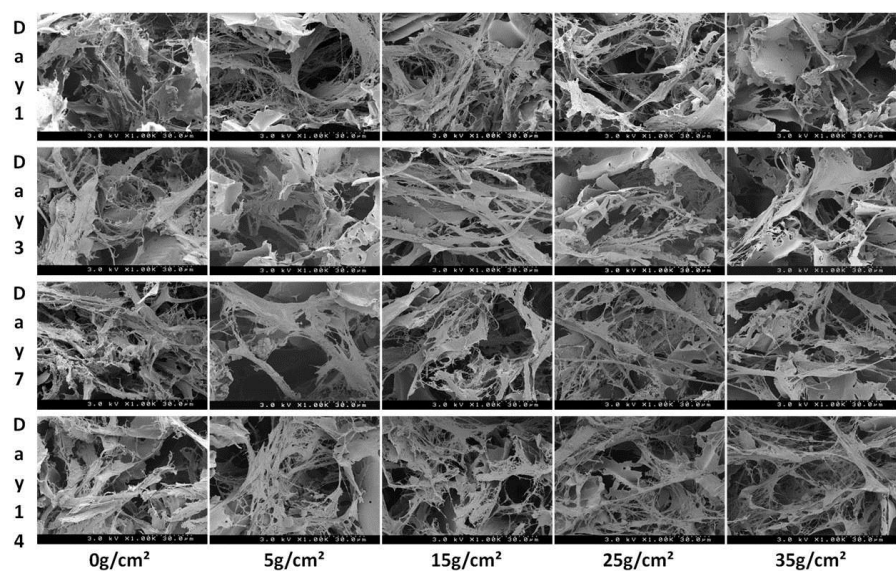


图3

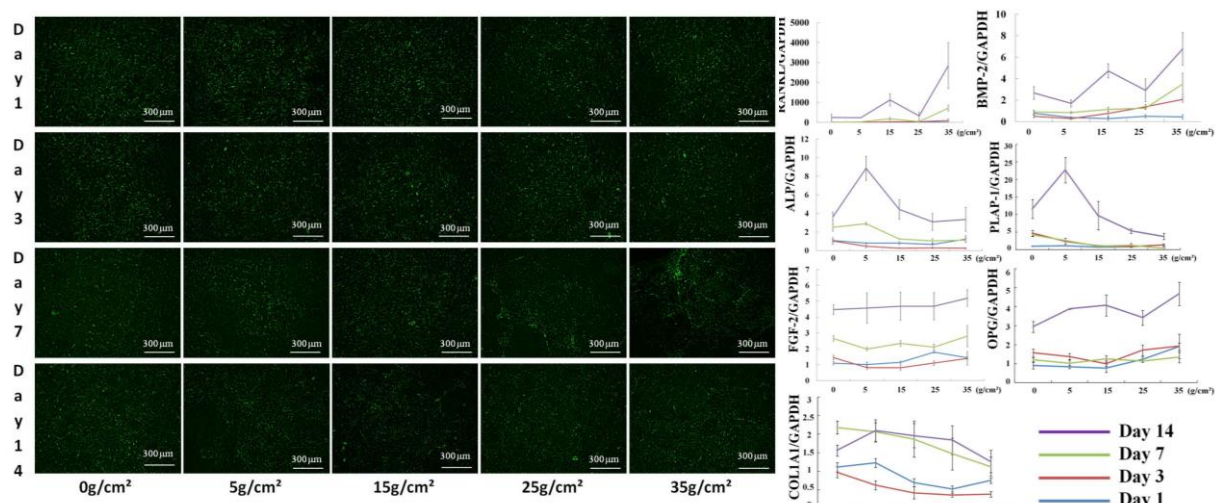


图4

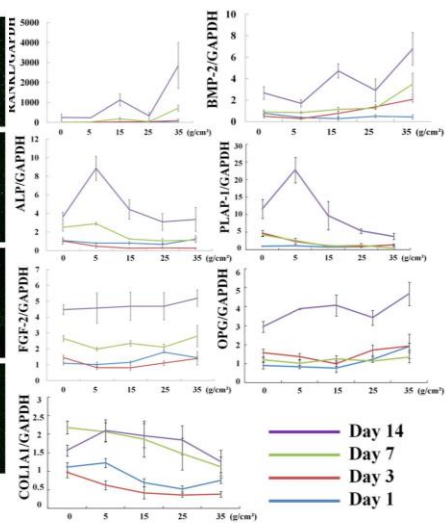


图5

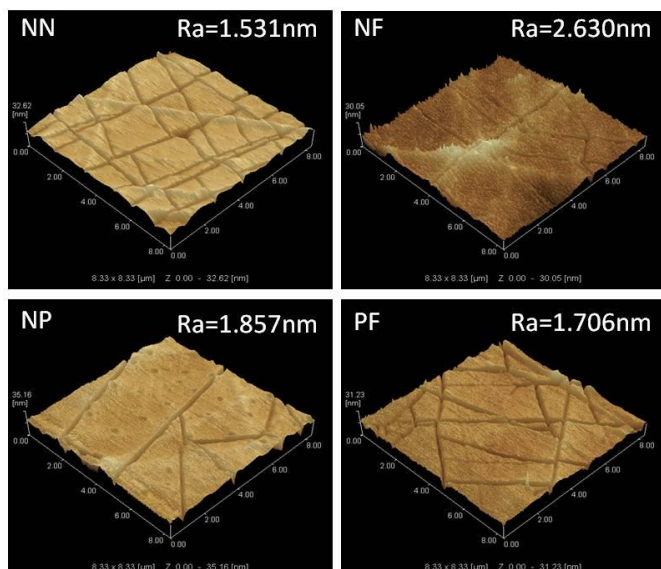


図6

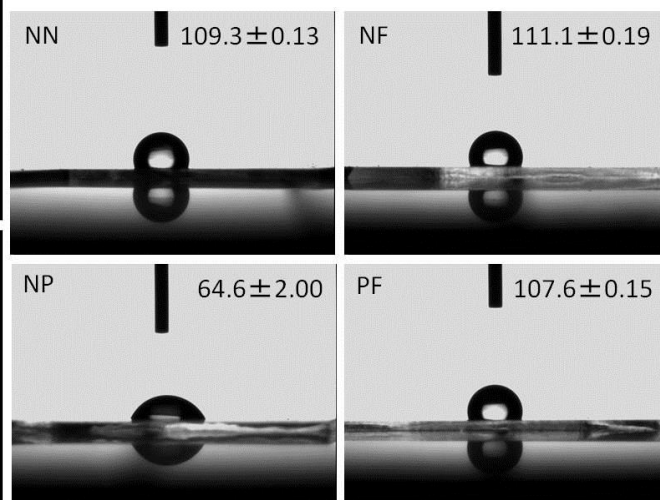


図7

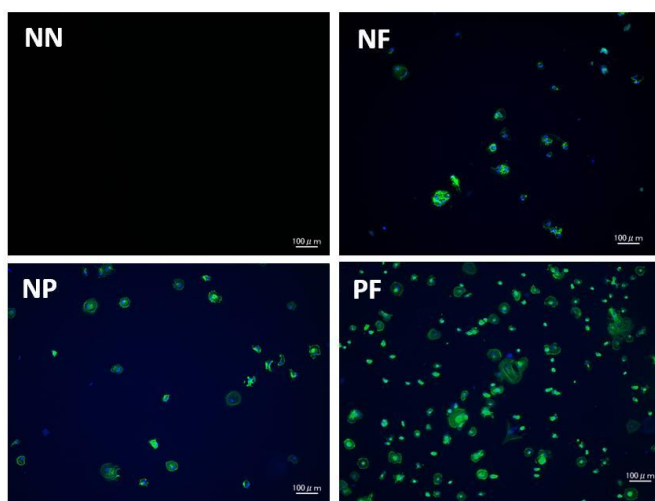


図8

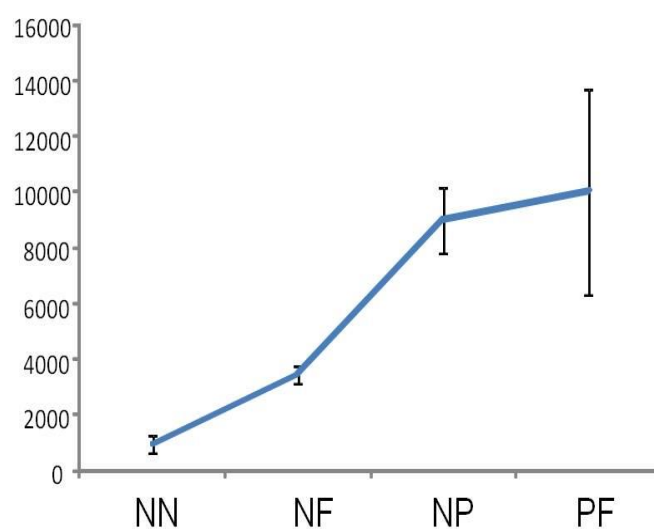


図9

参考文献：

1. Liao W, Okada M, Sakamoto F, Okita N, Inami K, Nishiura A et al. In vitro human periodontal ligament-like tissue formation with porous poly-l-lactide matrix. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(6):3273-80.
2. Okita N, Honda Y, Kishimoto N, Liao W, Azumi E, Hashimoto Y et al. Supplementation of strontium to a chondrogenic medium promotes chondrogenic differentiation of human dedifferentiated fat cells. *Tissue Engineering*. 2015(ja).

注：本研究は、2014年6月29日『近畿東海矯正歯科学会』にて口演発表、
2014年10月16日『The 13th Annual Session Of The Chinese Orthodontic Society』にてポスター発表。

作成日：2015年3月5日