低酸素状態におけるヒト歯根膜細胞の骨吸収性因子産生

本 平 一 志

明海大学歯学部大学院歯学研究科歯学専攻歯周病学講座

(2003年7月5日受理)

Production of Bone-resorbing Factors by Human Periodontal Ligament Cells Cultured under Hypoxic Conditions

Hitoshi Motohira

Meikai University Graduate School of Dentistry Department of Periodontology

Accepted for publication 5 July 2003

Occlusal trauma causes alveolar bone resorption around the root in healthy periodontal tissue, and occlusal trauma is considered to be a factor that accelerates alveolar bone resorption caused by bacterial infection in periodontitis. In an experimental model of occlusal trauma in beagle dogs, since the occurrence of thrombosis in the microcirculation of the periodontal ligament was demonstrated histopathologically, it was hypothesized that occlusal trauma causes hypoxia in the periodontal ligament. To test this hypothesis, the present study examined the effect of hypoxia on the production of bone-resorbing factors by cultured human periodontal ligament cells. Cultured periodontal ligament cells were divided into 2 groups, a group cultured under hypoxic conditions in 1% O₂ (hypoxia group), and a group cultured under 20% O₂ (normoxia group). The concentrations of bone-resorbing factors, vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), and prostaglandin E₂ (PGE₂) in the cell culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Expression of the mRNAs for the bone-resorbing factors was detected by performing the reverse transcription-polymerase chain reaction. Higher concentrations of VEGF and IL-6 were found in the culture media of the hypoxia group than in the normoxia group ($p < 0.01$), and the expression of the mRNAs for these proteins in the hypoxia group was also higher than in the normoxia group. Expression of IL-1 β was observed in the hypoxia group alone. TNF- α and PGE₂ were undetectable in the culture medium of both the hypoxia group and the normoxia group, whereas COX-2 mRNA was detected in the hypoxia group. However, PGE₂ production became detectable 3 hours after the addition of recombinant human VEGF, even under normoxic conditions. Similarly, PGE₂ became detectable in the culture medium 9 hours after the oxygen level had been increased from hypoxic to normoxic. These results suggest that hypoxia induced by occlusal trauma may stimulate the periodontal ligament to produce bone resorbing factors and result in resorption of alveolar bone. J Jpn Soc periodontol, 45 : 241~251, 2003.

Key words : occlusal trauma, periodontal ligament, alveolar bone resorption, bone-resorbing factors

要旨 : 咬合性外傷を受けた健常な歯周組織では歯根周囲の歯槽骨が吸収し、歯根膜腔の拡大が生じる。また、咬合性外傷は歯周組織の細菌感染に起因する歯槽骨吸収を促進する因子と考えられている。ビーグル犬を用いた実験的咬合性外傷の報告から、歯根膜組織では毛細血管は閉塞し、循環障害が生じていることが病理組織学的に示されている。すなわち咬合性外傷を受けた歯根膜では、酸素供給が低下した状態にあると考えられる。本研究は、低酸素状態がヒト歯根膜細胞の骨吸収性因子産生に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行った。歯根膜細胞を低酸素状態（1% O₂）で培養した群（Hypoxia 群）および通常酸素濃度（20% O₂）で培養した群（Normoxia 群）に分けた。両実験群の培養上清から、骨吸収性因子である血管内皮増殖因子（VEGF）、イン

ターロイキン (IL)-6, IL-1 β , 腫瘍壊死因子- α (TNF- α), およびプロスタグランジン E₂ (PGE₂) の産生量を enzyme-linked immunosorbent assay により測定した。さらに, 各骨吸収性因子の mRNA の発現を reverse transcription-polymerase chain reaction 法により検出した。その結果, Hypoxia 群では, 培養上清中の VEGF および IL-6 の濃度は Normoxia 群に比較して有意に増加し ($p < 0.01$), また両因子の mRNA 発現においても, 同様な傾向が認められた。IL-1 β の発現は Hypoxia 群のみから検出され, TNF- α および PGE₂ は両群から検出されなかったが, PGE₂ の合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 の mRNA は Hypoxia 群から検出された。このため, 通常酸素濃度で recombinant VEGF を添加したところ, 3 時間以降で PGE₂ 産生を認めた。さらに, 低酸素状態から通常酸素濃度に戻す再酸素化を行ったところ, 9 時間以降で PGE₂ 産生の誘導が確認できた。これらの結果から, 咬合性外傷により圧迫され, 低酸素状態に陥った歯根膜組織では骨吸収性因子が産生され, 歯槽骨吸収に関与する可能性が示唆された。

索引用語: 咬合性外傷, 歯根膜, 歯槽骨吸収, 骨吸収性因子

結 言

歯周炎は細菌感染とそれに対する宿主の反応に起因する組織破壊を生じる疾患であるが, その発症と進行には種々の因子が関与していると考えられている¹⁾。中でも過剰な咬合力が歯周組織に加わって生じる咬合性外傷は, 歯周炎組織における歯槽骨吸収を急速に進行させる共同破壊因子として臨床的に重視されている²⁻⁵⁾。過剰な咬合力は健全な歯周組織にも影響を及ぼすと考えられ, 咬合性外傷を受けた組織では歯根周囲に骨吸収が起こり, 歯根膜腔の拡大を生じる。そして, 歯周炎に罹患し, 破壊された歯周組織では, 生理的範囲内の咬合力であっても, それに拮抗できず臨床的に垂直性骨吸収が引き起こされる。ビーグル犬を使用した, 健全な歯周組織に対する実験的咬合性外傷の報告から, 咬合性外傷を受けた歯周組織では歯根膜の毛細血管に圧迫や血栓の形成, 血管自体の消失を認め⁶⁻⁸⁾, 一時的に循環障害を呈した後に血管の再生が起こり, それに伴い骨吸収が顕著に進行することが病理組織学的に示されている⁷⁾。すなわち, 咬合性外傷を受けた歯根膜では貧血により酸素供給が低下した状態にあると考えられる。

これまでに, 培養ヒト歯根膜細胞に直接外力を加えると, 骨代謝に影響を及ぼすインターロイキン (IL)-1 β の産生や, プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の合成に関与するシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の誘導が促進されることは報告されている^{9,10)}。しかしながら, 咬合性外傷により圧迫された歯根膜組織の微小循環障害に起因する低酸素状態が, 歯根膜細胞からの骨吸収性因子産生に及ぼす影響についてはほとんど報告されていない¹¹⁾。低酸素状態におかれたヒト線維芽細胞¹²⁾およびヒト骨芽細胞様細胞¹³⁾からは血管内皮増殖因子 (VEGF) が産生されることが報告されている。VEGF は血管新生の促進因

子として知られているが, 最近になり骨代謝に影響を及ぼす骨吸収性サイトカインとしての役割も認識され始めている¹⁴⁻¹⁶⁾。破骨細胞前駆細胞の分化に必須である macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) 欠損 op/op マウスへの VEGF 投与により VEGF の M-CSF 様作用が認められ^{14,15)}, マウス大腿骨から採取した骨髄由来細胞の培養系に VEGF を添加すると破骨細胞の分化および活性化が促進することも報告されている¹⁶⁾。また, VEGF により血管内皮細胞からの COX-2 産生が亢進することが明らかにされている¹⁷⁾。一方で, マウス心筋細胞を低酸素状態で培養すると, IL-6 産生が亢進することが報告されている¹⁸⁾。IL-6 は骨芽細胞に作用して破骨細胞の分化・活性化を促すといわれている¹⁹⁾。この他に骨吸収性因子としては IL-1 β ²⁰⁾, 腫瘍壊死因子- α (TNF- α)²¹⁾ およびプロスタグランジン E₂ (PGE₂)²²⁾ が破骨細胞に直接作用して分化・活性化させることが明らかにされている。本研究では, 咬合性外傷による歯根膜組織の低酸素状態が歯槽骨代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的として, 低酸素状態で培養したヒト歯根膜細胞からの上記の骨吸収性因子である VEGF, IL-6, IL-1 β , TNF- α および PGE₂ の発現について検討を行った。

材料および方法

1. 歯根膜細胞の分離

明海大学歯学部付属病院に来院し, 矯正学的理由から便宜抜歯が必要だと判断された患者 3 名 (19~23 歳, 女性) からインフォームド・コンセントを得た後, 抜去した健全な第一小臼歯 2 本および第三大臼歯 1 本から Somerman ら²³⁾の方法に準じて歯根膜組織を outgrowth 法により分離・培養を行った。すなわち, 抜去歯を 0.005% アンホテリシン B (Invitrogen Life Technologies, USA)・0.02% カナマイシン (明

治製菓, 東京)・100 units/ml ペニシリン (明治製菓) 含有 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen Life Technologies) 添加 alpha-minimum essential medium (Invitrogen Life Technologies) により洗浄した後に、根尖側 1/3 の根面からメスを使用して歯根膜組織を採取し、約 2 mm 角に裁断した。この組織片をウシ胎児血清で内面を coating した直径 35 mm の dish (Becton Dickinson Labware, USA) に移し、クリーンベンチ内で風乾して付着させた後に前述の培養液中で培養した。組織片周囲に拡散して定着した細胞が単層を形成した後に 0.02% EDTA/0.2% アクチナーゼ溶液 (科研製薬株式会社, 東京) を添加して 37°C で 5 分間作用させて細胞を剥離させて回収した。細胞数算定後、 5×10^5 cells/dish の割合で直径 90 mm の dish (Becton Dickinson Labware) に播種したものを初代歯根膜細胞として、3~5 回、継代培養したものを実験に使用した。なお、本研究に関わる全てのプロトコールは明海大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施された。

2. 細胞培養

歯根膜細胞を低酸素状態で培養した群 (Hypoxia 群)、通常酸素濃度で培養した群 (Normoxia 群) と低酸素状態から通常酸素濃度に戻す、いわゆる再酸素化を行う群 (Reoxygenation 群) を設定した。Hypoxia 群の培養は、パーソナルマルチガスインキュベーター APM-30 D (Astec Co., 福岡) を使用して 1% O_2 , 5% CO_2 , 37°C の条件で行った²⁴⁾。Normoxia 群の培養と Reoxygenation 群の再酸素化は 20% O_2 , 5% CO_2 , 37°C の条件で行った。Hypoxia 群および Normoxia 群の培養時間は 24 時間および 48 時間とした。一方、Reoxygenation 群は 24 時間および 48 時間の低酸素状態に継続してそれぞれ 3~12 時間の再酸素化を行った。

通常酸素濃度での VEGF の添加実験においては recombinant human VEGF 165 (Sigma Chemical Co., USA) 10 ng/ml を添加後 0.5~4 時間培養した。

3. 骨吸収性因子の定量

各実験群の培養上清中の VEGF, IL-6, IL-1 β , PGE₂, TNF- α の濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R & D Systems Inc., USA) を用いて定量した。すなわち、96 穴プレートに各濃度の標準溶液および培養上清を添加し、25°C で 2 時間一次抗体と反応させた後、アルカリフォスファターゼで標識した二次抗体を添加して 1~2 時間反応させた。次に基質 (パラ-ニトロフェニリン酸) を添加して 20 分間反応させた後に第三リン酸ナトリウム溶液を混和して反応を停止させた。そし

て吸光度は Titertek Multiskan plus (Flow Laboratories Inc., USA) を用いて波長 450 nm にて測定した。各濃度の標準溶液から標準曲線を作成し、濃度を算出した。各実験群間の統計処理は Student's t-test により行った。

4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

各条件で培養した歯根膜細胞から Chomczynski ら²⁵⁾の方法に準じて TRIzol Reagent® (Invitrogen Life Technologies) を用いて、acid guanidine phenol chloroform 法に準じて total RNA を抽出した。total RNA より Program Temp Control System PC-700 (Astec Co.) を使用して cDNA を合成した。すなわち、oligo (dT) primer (Invitrogen Life Technologies) を添加して 70°C で反応させた後に Super Script II® (Invitrogen Life Technologies) を添加して 45°C にて 50 分、続いて 70°C にて 15 分間反応させた。

cDNA 溶液から β -actin, VEGF, IL-6, IL-1 β , TNF- α および COX-2 に対する特異的なプライマー^{26~28)} (表 1) を用いて PCR 法により遺伝子断片を増幅した。すなわち、プライマー, Ampli Taq Gold® DNA polymerase (Perkin Elmer Co., USA), PCR バッファー (10 mM Tris-HCl: pH 8.3 および 50 mM KCl), 1.5 mM $MgCl_2$, および 0.2 mM dNTPs を含む溶液を混和して総量を 25 μ l とし、前述の PC-700 を用いて増幅反応を行った²⁹⁾。反応条件は 95°C で 1 分間の熱変性, 1 分間のアニーリングおよび 72°C で 1 分間の伸張反応のサイクルを 35 回行った。ただし、1 サイクル目の熱変性は、Ampli Taq Gold® の活性を高めるため 10 分間行った (表 1)。

PCR 産物は、エチジウムブロマイド (Sigma Chemical Co.) 添加 2% アガロースゲルにて PCR 産物の分離を行い、波長 302 nm の紫外線照射下で Polaroid 667 フィルム (Nippon Polaroid Co., 東京) に感光させ、泳動像を可視化した。サイズマーカーは、100 bp DNA Ladder (Bio Labs, USA) を用いた。

結 果

1. 低酸素による培養ヒト歯根膜細胞からの骨吸収性因子の発現

1) VEGF

まず、低酸素状態による歯根膜細胞の VEGF 産生量に及ぼす影響を明らかにするために、ELISA 法により培養上清中の VEGF 蛋白量の測定を行った (図

表 1 PCR のプライマー設計とアニーリング温度

	Size (bp*)	AT** (°C)	Primer
β -actin	642	58	F : ATGACCCAGATCATGTTTGAG R : AGGAGCAATGATCTTGATCTTCA
VEGF	192	60	F : CATGAACTTCTGCTGTCTTGG R : CTCACCGCCTCGGCTTGTAC
IL-6	198	62	F : ATGTAGCCGCCACACAGA R : ATGGGTGAAAATCATCCTG
IL-1 β	248	62	F : GACACATGGGATAACGAGG R : AATCTGTACCTGTCCTGCGT
COX-2	305	55	F : TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT R : AAGATACTCAGGCAGAGATGATCT

*bp : base pairs **AT : Annealing temperature

図 1 低酸素状態がヒト歯根膜細胞の血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生に及ぼす影響

歯根膜細胞を低酸素状態 (1% O₂) または通常酸素濃度 (20% O₂) で培養 24 時間後および 48 時間後の培養上清中の VEGF 濃度を ELISA 法により測定した。

結果は由来の異なる 3 検体の歯根膜細胞における測定値の平均±SD を示す。

■ : Hypoxia 群 □ : Normoxia 群

** : $p < 0.01$

1)。その結果、培養 24 時間後の VEGF 産生量は Normoxia 群 (0.52 ng/ml) に比較して Hypoxia 群 (4.86 ng/ml) では有意に多かった ($p < 0.01$)。また培養 48 時間後の時点でも Normoxia 群 (1.02 ng/ml) に比較して Hypoxia 群 (7.04 ng/ml) では有意に多かった ($p < 0.01$)。Normoxia 群および Hypoxia 群ともに、培養 24 時間後よりも培養 48 時間後に VEGF 産生量が増加する傾向が認められたが、両者間に有意差は認められなかった。次に各培養条件下における VEGF mRNA 発現量を明らかにするために RT-PCR 法により検討を行った (図 4)。RT-PCR 後の電気泳動像から VEGF mRNA は培養後 24 時間および 48 時間の Normoxia 群からわずかに検出

図 2 低酸素状態が培養ヒト歯根膜細胞のインターロイキン-6 (IL-6) 産生に及ぼす影響

歯根膜細胞を低酸素状態 (1% O₂) または通常酸素濃度 (20% O₂) で培養 24 時間後および 48 時間後の培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法により測定した。

結果は由来の異なる 3 検体の歯根膜細胞における測定値の平均±SD を示す。

■ : Hypoxia 群 □ : Normoxia 群

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

されたが、これらに比較していずれの時点においても Hypoxia 群ではより高い発現強度を示した。また、Hypoxia 群における VEGF mRNA の発現は培養 24 時間後に比較して 48 時間後において増強していた。一方、インターナル・コントロールである β -actin mRNA の発現は各群ではほぼ同程度の発現強度を示した。

2) IL-6

IL-6 はタンパク (図 2) および mRNA (図 4) いずれのレベルでも VEGF と同様の傾向を示した。IL-6 産生量は培養 24 時間後では Normoxia 群 (0.71 ng/ml) に比較して Hypoxia 群 (3.92 ng/

図3 低酸素状態が培養ヒト歯根膜細胞のインターロイキン-1 β (IL-1 β) 産生に及ぼす影響

歯根膜細胞を低酸素状態 (1% O₂) または通常酸素濃度 (20% O₂) で培養 24 時間後および 48 時間後の培養上清中の IL-1 β 濃度を ELISA 法により測定した。

結果は由来の異なる 3 検体の歯根膜細胞における測定値の平均 $\pm$ SD を示す。

■ : Hypoxia 群 □ : Normoxia 群
n.d. : not detectable

ml) で有意に多く ($p < 0.01$), 培養 48 時間後の時点でも Normoxia 群 (1.07 ng/ml) に比較して Hypoxia 群 (6.87 ng/ml) で有意に多かった ($p < 0.01$)。また, Normoxia 群では培養 24 時間後よりも培養 48 時間後に IL-6 産生量が増加する傾向が認められたが, 両者間に有意差は認められなかった。Hypoxia 群においては培養後 24 時間に比較して培養後 48 時間の時点では有意に増加していた ($p < 0.05$)。一方, IL-6 mRNA の発現は各群から検出されたものの培養後 24 時間および 48 時間において Normoxia 群に比較して Hypoxia 群では高い発現強度を示した (図 4)。Hypoxia 群では培養後 24 時間に比較して 48 時間の時点で発現の増強を認めた。

3) IL-1 β

IL-1 β (図 3) の産生は Normoxia 群では培養後 24 時間および 48 時間の時点で検出限界 (3.9 pg/ml) 以下であった。Hypoxia 群では培養 24 時間後の時点では検出限界以下であったが, 培養 48 時間後では検出された (1.1 ng/ml)。これらを反映して, IL-1 β mRNA (図 4) は培養 48 時間後の Hypoxia 群においてのみ検出され, Normoxia 群および培養 24 時間後の Hypoxia 群からは検出されなかった。

4) TNF- α

タンパクレベルでは各実験群で検出限界 (15.6 pg/ml) 以下であった。また mRNA 発現も各群から検出されなかった。

図4 低酸素状態が培養ヒト歯根膜細胞の骨吸収性因子の mRNA 発現に及ぼす影響

歯根膜細胞からの VEGF, IL-6, IL-1 β および COX-2 の mRNA 発現

結果は由来の異なる 3 検体の歯根膜細胞の結果の代表例を示す

レーン 1 : Normoxia 群 (培養 24 時間後)
レーン 2 : Hypoxia 群 (培養 24 時間後)
レーン 3 : Normoxia 群 (培養 48 時間後)
レーン 4 : Hypoxia 群 (培養 48 時間後)

5) PGE₂ および COX-2 mRNA

PGE₂ は Hypoxia 群および Normoxia 群において検出限界 (39 pg/ml) 以下であった。COX-2 mRNA 発現 (図 4) は Normoxia 群からは検出されなかったが Hypoxia 群からは検出された。Hypoxia 群においては, 培養 24 時間後に比較して 48 時間後で発現強度の増強が認められた。

2. 通常酸素濃度における VEGF による PGE₂ および COX-2 誘導作用

20% O₂ 存在下でヒト歯根膜細胞に recombinant human VEGF (10 ng/ml) を添加したところ, 3 時間以降から PGE₂ が検出された (図 5) が, control 群ではいずれの時点においても検出限界以下であった。また, COX-2 mRNA の発現 (図 6) は VEGF 群では添加後 2 時間から検出され, 3 時間で最大の発現強度を示した後に減弱し, 4 時間以降は検出されなかった。また, Control 群においてはいずれの時点においても COX-2 mRNA の発現が検出されなかった。

図5 VEGFが培養ヒト歯根膜細胞からのPGE₂産生に及ぼす影響
recombinant human VEGF (10 ng/ml)を添加して通常酸素濃度
(20% O₂)で培養した歯根膜細胞からのPGE₂産生量
□: VEGFを添加した条件 ●: Control群

図6 VEGFが培養ヒト歯根膜細胞からのCOX-2 mRNA発現に及ぼす影響
recombinant human VEGF (10 ng/ml)を添加・培養した歯根膜細胞からのCOX-2 mRNA発現

3. 低酸素状態で培養後再酸素化した場合のPGE₂産生およびCOX-2 mRNA発現

ヒト歯根膜細胞を24時間および48時間の低酸素状態で培養後再酸素化したところ9時間以降からそれぞれPGE₂が検出された(図7)。また、Hypoxia群およびNormoxia群ではいずれの時点においてもPGE₂産生は認められなかった。一方、COX-2 mRNAの発現(図8)はReoxygenation群では24時間および48時間の低酸素状態から再酸素化した直後から検出されたが、再酸素化後3~6時間の範囲で発現強度の増強を認めた。また、Hypoxia群では24~36時間および48~60時間の範囲でそれぞれほぼ一定強度のCOX-2 mRNAの発現が検出された。しかし、24~36時間の時間帯に比較して48~60時間の時間帯でより強い発現を認めた。また、Normoxia群からはいずれの時点においてもCOX-2 mRNAの発現は認められなかった。

考 察

咬合性外傷を受けた歯周組織では、圧迫による循環障害が生じた後に血管が再生し、それに伴って歯槽骨吸収が生じることが病理組織学的に示されている^{7,8)}。このことから本研究では循環障害に陥った組織における低酸素状態が歯槽骨代謝に及ぼす影響を明らかにするために、歯根膜細胞を低酸素条件下で培養し、破骨細胞前駆細胞の分化・活性化に関与する各種因子の産生量を評価した。これまでに歯根膜細胞において低酸素培養が及ぼす影響を検討した研究はほとんど行われていない¹¹⁾が、間葉系細胞を含め、他の細胞については報告されている^{28,30)}。生体内の末梢部分において循環障害により酸素供給が絶たれた状態では、酸素濃度は1%未満であるといわれている⁷⁾。本研究ではHitchonら²⁴⁾の記述に従い、*in vitro*の低酸素培養実験で広く用いられている条件設定を採用した。すなわち、低酸素濃度(1% O₂)および通常の細胞培養で使用される酸素濃度(20% O₂)にてそれぞれ歯根

図 7 再酸素化が培養ヒト歯根膜細胞からの PGE₂ 産生に及ぼす影響
 24 時間および 48 時間の低酸素状態から再酸素化した培養上清中の PGE₂ 産生量
 □: Reoxygenation 群 △: Hypoxia 群 ●: Normoxia 群

図 8 再酸素化が培養ヒト歯根膜細胞からの COX-2 mRNA 発現に及ぼす影響

膜細胞の培養を行い、これを歯周組織局所で酸素濃度が低下した状態の実験モデルとした。さらに、一時的に循環障害に陥った後に毛細血管の新生により酸素濃度が正常状態に回復した場合を想定して、低酸素状態

からの再酸素化を行う条件について検討を行った。

VEGF は血管新生を促進する成長因子であり、低酸素状態におかれた多くの細胞から産生されることが明らかにされている^{28,30)}。本研究において、低酸素状

態の歯根膜細胞からも VEGF の産生が認められたことから、咬合性外傷を受けた歯根膜組織において VEGF が血管新生を誘導している可能性が示唆された。また、VEGF は骨吸収活性がある一方で、骨芽細胞の分化や走化性を促進する作用もあわせもつことも報告されている^{31,32)}。骨代謝には骨吸収と骨形成の二つの局面があり、VEGF はこれら双方に関与するといわれている。したがって、VEGF は骨芽細胞および幼若破骨細胞に直接的に作用して骨吸収と骨形成の双方に影響し歯槽骨のリモデリングを促していることも考えられる。IL-6 は骨吸収促進作用を有することが知られているが、破骨細胞に直接作用せず骨芽細胞に作用するといわれている¹⁹⁾。骨芽細胞は osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) 系を介して破骨細胞の分化・活性化に関与することが明らかにされており^{33,34)}、IL-6 は骨芽細胞に作用してこの ODF/RANKL-RANK 系を促進して間接的に破骨細胞の誘導を促していると考えられている¹⁹⁾。IL-1 β および TNF- α は幼若破骨細胞に直接作用して細胞同士の融合を促進して多核細胞へと分化させる^{20,21)}。また、IL-1 β は成熟した破骨細胞の活性化にも関与している。Hypoxia 群では IL-6 および IL-1 β の産生も亢進しており、これらの因子は、歯槽骨吸収に関与しているものと考えられる。

これまでに低酸素状態で培養した各種細胞から様々な因子が発現誘導されることが報告されているが^{12,13,18)}、その機序の詳細については明らかではない。現在のところ、真核生物の細胞において酸素分圧の感知に関与している部分はミトコンドリアに存在するという説³⁵⁾と細胞膜上に存在するという説³⁶⁾の二つがある。これらの酸素センサーからのシグナルが VEGF mRNA の転写因子である hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) や IL-1 β 、IL-6 および TNF- α の転写因子である nuclear factor (NF)- κ B³⁷⁾ の活性化を引き起こすといわれている。HIF-1 は近年、単核細胞の食作用を調節するなど、炎症や感染との関与も注目されており³⁸⁾、また HIF-1 は、IL-1 β を作用させたヒト歯肉線維芽細胞および滑膜線維芽細胞から誘導されることが報告されている³⁹⁾。このことから、本研究における Hypoxia 群および Reoxygenation 群における VEGF 産生には、低酸素状態および再酸素化により産生された IL-1 β が関与している可能性も考えられる。

NF- κ B は、IL-1 β 、IL-6 および TNF- α の共通の転写因子であるが、本研究では、IL-6 の産生は培

養 24 時間後および 48 時間後の Hypoxia 群から検出されたが、IL-1 β は培養 48 時間後の Hypoxia 群のみから検出され、TNF- α の産生は Hypoxia 群および Normoxia 群のいずれにおいても認められなかった。一方で、低酸素状態から再酸素化された細胞は、酸化ストレスにより内部の活性酸素が増加した状態にあるとされている³⁷⁾。活性酸素は inhibitor of NF- κ B (I- κ B) の分解を促進し、NF- κ B の活性化を引き起こすといわれる⁴⁰⁾。本研究の予備実験の結果でも、Reoxygenation 群の培養上清では同じ時間培養した Hypoxia 群と比較して、IL-6 および IL-1 β の産生が亢進する傾向が認められた (未発表データ)。

PGE₂ は破骨細胞の分化・活性化に関与する因子である²²⁾。本研究では、培養上清中の PGE₂ は Hypoxia 群および Normoxia 群では検出されなかった。窪田¹¹⁾は、低酸素状態 (10% O₂) においては歯根膜細胞からの PGE₂ 産生がわずかに認められたが、通常酸素濃度で培養した場合に比較して増加を示さなかったと報告している。いずれにしても、低酸素状態が歯根膜細胞からの PGE₂ 産生に及ぼす影響は小さいといえる。しかしながら、Hypoxia 群において PGE₂ の合成酵素である COX-2 の mRNA が検出された。COX-2 はアラキドン酸から PGG₂ への酸化反応を触媒する酵素であり、血管内皮細胞において VEGF により誘導されることが報告されている¹⁷⁾。よって、低酸素状態では、COX-2 mRNA が発現していながら PGE₂ 産生に至らなかった可能性が考えられた。このため、通常酸素濃度における VEGF の PGE₂ 産生および COX-2 mRNA 発現の誘導能を検討した。その結果、VEGF 添加後 3 時間以降で PGE₂ 産生および COX-2 mRNA の発現が検出された。細胞膜リン脂質から phospholipase A₂ の作用を受けて合成されたアラキドン酸は、COX-2 のシクロオキシゲナーゼ反応により PGG₂ となり、COX-2 の hydroperoxidase 反応により PGH₂ となる。この PGH₂ は PGE 合成酵素により PGE₂ になる。低酸素状態に置かれた歯根膜細胞では、PGE₂ 合成経路が部分的に抑制されている可能性がある。低酸素状態では phospholipase A₂ によるアラキドン酸の合成が阻害されている可能性が考えられる。逆にアラキドン酸が合成されていても、細胞内では COX-2 mRNA は発現したもののタンパクレベルでの合成が進んでいない状態、あるいは COX-2 が合成されていても低酸素状態であるために酸化反応を触媒しなかった状態であったことも考えられる。また、COX-2 のシクロオキシゲナーゼ反応系が機能していても、peroxidase 反応系が阻害されている可能性もある。このように、PGE₂ 産生には酸素

濃度が影響すると考えて、再酸素化した場合の PGE_2 産生を検討した。これにより、24 時間および 48 時間の低酸素状態からの再酸素化後 9 時間以降の培養上清から PGE_2 が検出された。RT-PCR の結果から、24 時間の低酸素状態から再酸素化した場合に比較して、48 時間の低酸素状態から再酸素化した場合では、再酸素化後の各時点における COX-2 mRNA の発現は増強している。また、再酸素化 9 時間以降の PGE_2 産生量は、48 時間の低酸素状態から再酸素化した場合では、24 時間の低酸素状態から再酸素化した条件に比較して増加する傾向を認めた。

本研究の結果から、過剰な咬合力が作用して圧迫された歯根膜組織においては、毛細血管に生じる循環障害および引き続いて起こる血管新生に起因する酸素濃度の変化により骨吸収因子の産生が亢進し、歯槽骨代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に御指導、また御校閲を賜りました本学口腔衛生学講座安井利一教授（本学歯周病学講座前兼任教授）に深甚なる謝意を表します。更に、御指導、御鞭撻を賜りました本学歯科薬理学講座坂上 宏教授、口腔病理学講座草間 薫教授に深く感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始御助力、御助言を賜った歯周病学講座の林 丈一朗講師ならびに歯科薬理学講座の田島雅道講師に深謝致します。最後に、本研究の遂行に当たり、種々の御協力を頂きました歯周病学講座員の先生方に深く御礼申し上げます。

本論分の要旨は、第 45 回秋季日本歯周病学会学術大会（2002 年 10 月 25 日）において発表した。

本研究の一部は、明海大学歯学部平成 14 年度宮田研究奨励金（E）の補助を受けて行った。

文 献

- 1) Williams RC : Medical progress. Periodontal disease. *New Engl J Med*, 322 : 373-382, 1990.
- 2) Ericsson I, Lindhe J : Effect of longstanding jiggling on experimental marginal periodontitis in the beagle dog. *J Clin Periodontol*, 9 : 497-503, 1982.
- 3) Ericsson I, Lindhe J : Lack of effect of trauma from occlusion on the recurrence of experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 4 : 115-117, 1977.
- 4) Lindhe J, Svanberg G : Influences of trauma from occlusion on progression of experimental periodontitis in the beagle dog. *J Clin Periodontol*, 1 : 3-14, 1974.
- 5) Polson MA, Zander AH : Effect of periodontal trauma upon intrabony pockets. *J Periodontol*, 54 : 586-591, 1983.
- 6) 石川梧朗, 秋吉正豊 : IV 歯周組織の病変, 口腔病理学 I, 第 1 版, 永末書店, 京都, 305-577, 1989.
- 7) Matsuo M, Tsutomi K, Terada H, Hori T, Takahashi K : The changes in periodontal ligament in the case of thrombus caused by the malocclusal forces. *Microcirculation Annual*, 129-130, 1990.
- 8) 鳥巢秀男 : 咬合性外傷における歯根膜血管網の変化と骨改造との関連について. *神奈川歯学*, 24 : 358-383, 1989.
- 9) Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Ozawa Y, Saito K, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y : Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 β production by human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 29 : 328-333, 1994.
- 10) Shimizu N, Ozawa Y, Yamaguchi M, Goseki T, Ohzeki K, Abiko Y : Induction of COX-2 expression by mechanical tension force in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*, 69 : 670-677, 1998.
- 11) 窪田正宏 : 歯根膜細胞ならびに骨芽細胞の低酸素状態における増殖と機能に関する研究. *口腔病学会誌*, 56 : 473-484, 1989.
- 12) Detmer M, Brown FL, Berse B, Jackman WR, Elicker MB, Dvorak FH, Claffey PK : Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol*, 108 : 263-268, 1997.
- 13) Steinbrech SD, Mehrara JB, Saadeh BP, Greenwald AJ, Spector AJ, Gittes KG, Longaker TM : VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278 : 853-860, 2000.
- 14) Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H : Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med*, 190 : 293-298, 1999.
- 15) Kaku M, Kohno S, Kawata T, Fujita C, Takimasa C, Tsutsui K, Tanne K : Effects of vascular endothelial growth factor on osteoclast induction during tooth movement in mice. *J Dent Res*, 80 : 1880-1883, 2001.
- 16) Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S,

- Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y : Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett*, 473 : 161-164, 2000.
- 17) Tamura M, Sebastian S, Gurates B, Yang S, Fang Z, Bulun S : Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 87 : 3504-3507, 2002.
 - 18) Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Zhang KY, Tani T, Hashimoto T, Yagi H, Miyazaki I, Yamamoto K : Hypoxia, but not reoxygenation, induces interleukin 6 expression through NF- κ B activation. *Transplantation*, 63 : 466-470, 1997.
 - 19) Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findley M David, Martin T John, Hirota H, Taga T, Kishimoto T, Suda T : Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med*, 182 : 1461-1468, 1995.
 - 20) Jimi E, Nakamura I, Duong Le T, Ikebe T, Takahashi N, Rodan G, Suda T : Interleukin 1 induces multinucleation, bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res*, 247 : 84-93, 1999.
 - 21) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin T John, Suda T : Tumor necrosis factor- α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 191 : 275-285, 2000.
 - 22) Kim CH, Kang BS, Lee TK, Park WH, Kim JK, Park YG, Kim HM, Lee YC : IL-1 beta regulates cellular proliferation, prostaglandin E₂ synthesis, plasminogen activator activity, osteocalcin production, and bone resorptive activity of the mouse calvarial bone cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 3 : 395-407, 2002.
 - 23) Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA : A comparative study of human periodontal ligament cells *in vitro*. *J Dent Res*, 67 : 66-70, 1988.
 - 24) Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H : Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL 12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 46 : 2587-2597, 2002.
 - 25) Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 : 156-159, 1987.
 - 26) Atkins JG, Haynes RD, Geary MS, Loric M, Crotti NT, Findlay MD : Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. *Bone*, 26 : 653-661, 2000.
 - 27) Hou LT, Liu CM, Rossomando EF : Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *J Clin Periodontol*, 22 : 162-167, 1995.
 - 28) Tisher E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes CJ, Abraham A : The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 266 : 11947-11954, 1991.
 - 29) Rappolee DA, Wang A, Mark D, Werb Z : Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J Cell Biochem*, 39 : 1-11, 1989.
 - 30) 十川和博 : 概説 : ハイポキシア. 蛋白質核酸酵素, 44 : 2470-2471, 1999.
 - 31) Deckers LM, Karperien M, Bent C, Yamashita T, Papapoulos ES, Lowik C : Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 141 : 1667-1674, 2000.
 - 32) Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther PK, Dehio C, Puhl W, Brenner ER : Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*, 30 : 472-477, 2002.
 - 33) Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa K, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie T, Martin JT, Suda T : Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone*, 25 : 517-523, 1999.
 - 34) Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T : Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol*, 163 : 434-442, 1999.
 - 35) Zhu H, Binn HF : Oxygen sensing and signaling : impact on the regulation of physiologically important genes. *Resp Physiol*, 115 : 239-247, 1999.
 - 36) Acker H, Xue D : Mechanism of oxygen sensing in the carotid body in comparison with other

- oxygen sensing cells. *New Physiol Sci*, 10 : 211-216, 1995.
- 37) 岡本 尚：生体の酸化ストレス応答と転写因子 NF- κ B のシグナル伝達制御. 蛋白質核酸酵素, 44 : 2405-2413, 1999.
- 38) Robert MS : Mastering innate immunity. *Nature Med*, 9 : 512-513, 2003.
- 39) Thornton RD, Lane P, Borghaei RC, Pease EA, Caro J, Mochan E. : Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J*, 350 : 307-312, 2000.
- 40) Baldwin AS : The NF- κ B and I κ B proteins : new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14 : 649-683, 1996.

連絡先：

明海大学歯学部歯周病学講座

〒 350-0283 埼玉県坂戸市けやき台 1-1