

学 位 論 文 題 名

Cyclic tension force activates nitric oxide production
in cultured human periodontal ligament cells

（ヒト歯根膜由来細胞における機械的応力負荷による NO 産生）

学位論文内容の要旨

近年の研究で、歯根膜細胞の機能が単なる歯槽骨と歯を結ぶ結合組織として働いているだけでなく、様々なサイトカインを産生する多彩な機能を有する細胞であることが判明している。すでに、歯根膜組織の維持や歯槽骨のリモデリングに強く関与していることが明らかにされている。

一酸化窒素(Nitric Oxide, NO) は、多彩な生理活性（血管弛緩作用、抗菌・抗腫瘍作用、神経伝達物質としての作用など）を有する細胞間情報伝達物質であり、さまざまな組織で産生されていることが知られている。これまでの研究から、歯髄や歯周組織において NO 合成酵素 (NO synthase, NOS) が存在していることが報告されている。また、NO が歯髄および歯周組織の機能調節に関与している可能性が示唆されているが、現在のところヒト歯根膜細胞の NO 産生能について定量的に調べた報告は無い。そこで本研究は、in vitro におけるヒト歯根膜由来細胞の NO 産生能ならびに、機械的応力負荷が NO 産生にどのような影響を与えるかを検討した。

方法および結果

実験に用いたヒト歯根膜由来細胞は、矯正治療の目的で抜歯された第一小臼歯の歯根中央部 1/3 より採取した。まず、35mm プレートで 5~10 回継代培養を行った後に、伸展培養用プレート(flex I) に播種し、細胞がコンフルエント(4.0×10^5 cells/ well)に達したのちに実験を行った。ヒト歯根膜由来細胞に機械的応力を負荷する目的で、伸展培養装置(FLEXERCELL STAIN UNIT SYSYSTEM)を用いて伸展培養を行った。伸展条件を 18% elongation 5 秒、relaxation

5 秒と設定し、12 時間後の NO 産生量を測定した。細胞内での NO 産生は NOS を介して行われる。現在、NOS には誘導型 (inducible NOS, iNOS), 常在型 (endothelial constitutive NOS, ecNOS), 神経型 (neuronal NOS, nNOS) の 3 種類のイソフォームが判明している。細胞内で産生した NO は、培養液中に拡散溶解し、酸化物 (NO_2^- , NO_3^-) として安定して蓄積される。実験後に培養液を回収し、酸化窒素分析装置 (ENO-10) を用いて NO_2^- , NO_3^- を測定し、NO 測定量を算定した。静置培養 12 時間後の NO 測定量が 15.25 ± 2.40 nmol/well であったのに対し、伸展培養を行った場合の NO 測定量は、 32.07 ± 8.44 nmol/well であった。伸展培養を行うことで NO 測定量が有意に増加した。しかし、培養液中で細胞から産生した NO が酸化されて生じる経路以外に、空気中にガスとして微量に存在する窒素酸化物が培養液に溶け込む可能性も考えられる。そこで伸展培養によって増加した NO が NOS を介して産生されたものであることを明らかにするために、NOS 阻害剤である N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) を培養液中に投与した。L-NMMA 投与による培養 12 時間後の、NO 測定量は静置培養で 12.98 ± 2.03 nmol/well、伸展培養で 17.76 ± 5.54 nmol/well であった。L-NMMA 投与によりそれぞれの NO 測定量が有意に抑制された。このことから伸展培養による NO 測定量の増加は NOS を介しているものと確認された。

次に伸展培養による機械的応力負荷が NO 産生の誘導因子として働いていることを確認する目的で、ecNOS および iNOS に対する RT-PCR を行った。その結果、伸展培養開始 0 時間、3 時間、および 6 時間で ecNOS の目的とする箇所にバンドが確認された。しかし、iNOS に関しては、いずれの時間においても目的の箇所にバンドを示さなかった。RT-PCR の結果から、伸展培養による機械的応力負荷が ecNOS の mRNA の発現を誘導していることが判明した。

さらに、伸展培養による NO 産生における ecNOS の関与を検索する目的で ecNOS 抗体に対するウエスタンブロッティング、および免疫染色を行った。ウエスタンブロッティングでは、伸展培養開始時には ecNOS タンパクが確認できなかったが、3 時間および 6 時間後には ecNOS タンパクが検出された。このことから、少なくとも伸展培養開始 3 時間後には ecNOS タンパクの合成が活発に行

われていることが確認された。さらに、免疫染色では、静置培養では ecNOS 抗体に対する免疫陽性反応を示さなかったが、伸展培養 12 時間後のヒト歯根膜由来細胞において ecNOS 抗体に対する免疫陽性反応が確認された。また、iNOS 抗体に対する免疫反応は、静置培養および伸展培養の両方において反応は認められなかった。

考察

本研究は、ヒト歯根膜由来細胞が NO 産生能を有していることを初めて明らかにした。また、ヒト歯根膜由来細胞が機械的応力負荷に反応して NO 産生が増加することから、生体の歯根膜組織においても、咬合力などの機械的刺激により NO が産生されている可能性が示唆された。MacIntyre et al.(1991)の報告では、NO が破骨細胞の骨吸収作用を抑制し、骨代謝における調節因子として作用していると報告している。また、Hughes(1995)は、NO が歯根膜の代謝調節因子として作用し、歯周組織の維持に関与している可能性がある」と述べている。今後、歯根膜細胞から産生されていると考えられる NO が実際に歯周組織でどのような役割を果たしているか検討していく必要があると考えられる。

結論

ヒト歯根膜由来細胞は NO 産生能を有しており、また、NO の産生は機械的応力負荷によって増加することが判明した。

ヒト歯根膜由来細胞における NO 産生には ecNOS の発現が関与していることが証明された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Cyclic tension force activates nitric oxide production in cultured human periodontal ligament cells

(ヒト歯根膜由来細胞における機械的応力負荷による NO 産生)

審査は主査、副査全員出席のもとに、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

一酸化窒素 (NO) は、ガス状細胞間情報伝達物質であり、様々な細胞で重要な生理活性物質として働いていることが知られている。これまで口腔領域における NO 関連の報告では、ラットやネコの歯周組織および歯髄に NO 合成酵素 (NOS) が存在していることが組織化学的に明らかになっているのみで、口腔組織の細胞における NO 産生について定量的に調べた報告は皆無である。本研究は、歯周組織での NO 産生を明らかにする目的で、ヒト歯根膜由来細胞を用いて、その NO 産生能ならびに機械的応力負荷が NO 産生にどのような影響を与えるかを検索したものである。

【方法と結果】

実験に用いたヒト歯根膜由来細胞は、矯正治療の目的で抜歯された第一小臼歯の歯根中央部より採取した。初代培養の後に 5～10 回継代培養を行い実験に用いた。また機械的応力を負荷する目的で、伸展培養装置 (Flexercell stain unit system) を用いて伸展培養を行った。伸展条件は、18% elongation 5sec, relaxation 5sec に設定した。細胞で産生された NO は培養液中に放出、窒素酸化物として蓄積される。培養後に培養液を回収し、培養液中の NO 酸化物を酸化窒素分析装置 (ENO-10) を用い測定した。12 時間後の NO 測定値は、静置培養で $15.25 \pm 2.40 \text{ nmol/well}$ であったのに対し、伸展培養では $32.07 \pm 8.44 \text{ nmol/well}$ と、伸展培養により NO 測定値が有意に増加した。そこで伸展培養によって増加した NO が NOS を介して産生されたものであるか否かを明らかにするために、NOS

阻害剤である N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) を培養液中に投与した。L-NMMA 投与による培養 12 時間後の、NO 測定量は静置培養で 12.98 ± 2.03 nmol/well、伸展培養で 17.76 ± 5.54 nmol/well であった。L-NMMA 投与によりそれぞれの NO 測定値が有意に抑制されたことから、伸展培養によって増加した NO が NOS を介したものであることが判明した。さらに、現在知られている 3 種類の NOS (ecNOS、iNOS、nNOS) のうちどのタイプの NOS が、伸展培養条件下での NO 産生に関わっているかを確認する目的で、ecNOS および iNOS に対する RT-PCR を行った。その結果、伸展培養開始 0 時間、3 時間、および 6 時間で ecNOS が出現する箇所にバンドが確認されたが、iNOS に関してはいずれの時間においても目的の箇所にバンドが発現しなかった。RT-PCR の結果から、伸展培養による機械的応力負荷により ecNOS の mRNA が発現していることが判明した。さらに、ecNOS タンパクの発現を検索する目的で ecNOS 抗体に対する Western blotting および免疫染色を行った。Western blotting の結果、伸展培養開始時に確認されなかった ecNOS タンパクが、3 時間および 6 時間後に検出された。この結果から、伸展培養による機械的応力負荷がシグナルとして作用し、少なくとも伸展培養開始後 3 時間以内に ecNOS タンパクの合成が活発に行われることが判明した。また、免疫染色の結果、伸展培養後の細胞において細胞表面全体に ecNOS 抗体に対する免疫陽性反応が確認された。

【考察と結論】

以上の結果から、ヒト歯根膜由来細胞は NO 産生能を有しており、また、NO の産生は機械的応力負荷によって増加することが判明した。また、ヒト歯根膜由来細胞における NO 産生には ecNOS の発現が関与していることが証明された。ヒト歯根膜由来細胞が機械的応力負荷に反応して NO を産生することが明らかになったことから、生体の歯根膜組織においても、咬合力などの機械的刺激により NO が産生されている可能性が示唆された。また、NO が骨代謝における調節因子として作用しているという報告もあり、今後歯根膜細胞から放出されていると考えられる NO の歯周組織における役割を検討してゆく必要があると考えられる。

論文の審査にあたって、学位申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について主査および副査より質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者からそれぞれ適切かつ明快な回答が得られた。また将来の研究の方向性についても具体的に示された。今回の実験方法ならびに結果が歯根膜由来細胞の機能解析に、貴重な情報を提供するものであると高く評価された。以上のことから本学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。