

学位論文題名

Effects of mechanical stress on the expression of type XII collagen mRNA in human periodontal ligament cells

(メカニカル・ストレスによるヒト歯根膜細胞における
XII型コラーゲン mRNA 発現の増大)

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) が歯への機械的な加重に対して適応反応を増すのに不可欠な役割をはたしていることは良く知られている。

歯根膜 (PDL) における主な細胞外基質 (ECM) であるコラーゲンには何種類か確認されているが、その中でも XII 型コラーゲンの発現は最初に我々の研究グループによって報告された。

XII 型コラーゲンが隣接したコラーゲンに対して架橋することによって線維が平行に並ぶことにより機能をなすと言う報告がある。これは XII 型コラーゲンが PDL 再生における特定の分子マーカーとしての役割を果たすかもしれないということを示している。

いくつかの研究において機械的な加重が HPLF における数種の ECM の遺伝子とタンパク質の発現パターンを変えるということが報告されている。

そこで我々は断続的な伸張力を与えた状態で HPLF におけるオステオポンチン (OPN)、オステオネクチン (OSN) とオステオカルシン (OCN) の mRNA 発現レベルを XII 型コラーゲンの mRNA 発現レベルと比較検討した。

【材料と方法】

歯科矯正治療のために抜去された小白歯から得られた HPLF を 4 継代目まで Kawase らの方法により培養後、断続的な伸張力を Flexercell Strain Unit-Model FX-2000A (Flexcell Corporation, USA) を用いて 3 回/分、18%伸張率で 1、3、5、7 日間与えた(stress(+))。また伸張力を与えない細胞群 (stress(-)) をコントロールとして用いた。

実験期間後、stress(+)群と stress(-)群それぞれについて生化学的観察を

行った。生化学的観察は細胞数 (DNA 量) (Cesar らの方法)、ALP 活性 (Kind-King 法)、各種 ECM (I 型コラーゲン, XII 型コラーゲン, OPN, OCN, OSN) の mRNA 発現の割合を測定した。

各種 ECM の mRNA 発現の割合の変化については ISOGEN® (株式会社ニッポンジーン) によって RNA の抽出を行い、抽出された Total RNA について LightCycler™ (Roch Diagnostics, Germany) を使った定量 RT-PCR 法を行った。

【結果】

1～7 日目の stress(-)群に比べ stress(+群)のほうが増加傾向にあるも、stress(+群)と stress(-)群において細胞数に有意な差は認められなかった。

1～7 日目の stress(+群)と stress(-)群において I 型コラーゲンと OPN の mRNA 発現に有意な差は認められなかった。

5、7 日目の XII 型コラーゲンと OCN の mRNA の発現は stress(-)群に比べ stress(+群)が有意に増加したのが観察された。

7 日目において stress(-)群に比べ stress(+群)の方が OSN の mRNA の発現は有意に増加したのが観察された。

5、7 日目において stress(-)群に比べ stress(+群)の方の ALP 活性が有意に増加した。

【考察】

今回の研究では HPLF に対する断続的な伸張力によって、HPLF における XII 型コラーゲン、OCN と OSN の mRNA 発現と ALP 活性が増加するということを証明した。

咬合による機械的な力によって歯根膜細胞は繰り返し伸展されるということを見ると、本実験は vitro における歯根膜細胞の生理学的モデルにできるかもしれない。

以前の報告において I 型コラーゲンの産生が増加したのは細胞に加えられる張力の大きさに起因していることが示唆された。歯根膜細胞に対する 5%の変型 (引っ張り) で I 型コラーゲンの発現は有意な増加を示した。一方、10%の変型 (引っ張り) では、コントロールとの差は見られなかった。我々の結果では断続的な伸張力によって I 型コラーゲンの有意な増加が見られなかった。それは I 型コラーゲンの産生を促進する最適な張力を使用していなかったことを示唆している。これは前述の報告と一致している。PDL の成熟と再生の過程において XII 型コラーゲンの産生と密接に I 型コラーゲンの産生は関係がある。XII 型コラーゲンは PDL の機能的な再生と非常に関係深いものだと考えられ、歯根膜再生のために XII 型コラーゲンを産生しているのかもしれない。

骨芽細胞様特性と関係ある非コラーゲン性マトリクスである OCN と OSN の mRNA 発現と ALP 活性は歯根膜細胞に対する機械的な加重によって増加するという報告がある。一方、これとは逆に ALP 発現が減少したという報告もある。これらは細胞培養条件の違いが結果の不一致を引き起こしているのだと思われる。我々の実験では完全にコンフルエントな状態の細胞を使い ALP 活性の上昇を認めたが、他の実験ではセミコンフルエントな状態の細胞を使った場合 ALP 活性は減少している。いくつかの研究ではメカニカルストレスによる OCN、OSN と ALP の増加は、歯根膜細胞が与えられたストレスの条件下で骨芽細胞様細胞に分化したのだということを示唆していると報告した。

断続的な伸張力に対する細胞における ECM 分泌発現機構は完全には解明されてはいない。最近の報告では Integrin $\alpha_2\beta_1$ (VAL-2) がコラーゲン線維と細胞骨格の間に transmembrane link を形成すると報告されている。さらに最近連続的にストレスをかけられた HPLF での α_6 -integrin の mRNA の発現が増加すると報告された。断続的な伸張力による XII 型コラーゲンの増加のメカニズムを直接的に理解するには、さらなる研究が必要とされる。

【結論】

我々は PDL 細胞に対する断続的な伸張力によって XII 型コラーゲン、ALP 活性、OCN と OSN mRNA 発現の著しい増加が起こるということを証明した。さらに、これらの結果は断続的な伸張力が PDL 細胞の骨芽細胞的な分化と PDL の再生に貢献するかもしれないということを示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 畑 昇

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Effects of mechanical stress on the expression of type XII collagen mRNA in human periodontal ligament cells

(メカニカル・ストレスによるヒト歯根膜細胞における
XII 型コラーゲン mRNA 発現の増大)

審査は、審査委員が一同に会し、申請者から論文についての概要を説明させた後、各審査委員から口頭試問の形式で行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) は、歯への機械的な加重に対して適応反応を増すのに不可欠な役割をはたしていることは良く知られている。歯根膜 (PDL) における主な細胞外基質 (ECM) には主にコラーゲンがあり、その中でも XII 型コラーゲンは最初に我々の研究グループによって報告された。機械的な加重が HPLF における ECM の遺伝子とタンパク質の発現を変えるとはいくつかの報告がある。そこで、我々は HPLF の培養系において断続的な伸張力を与え、XII 型コラーゲンならびにオステオカルシン (OCN)、オステオネクチン (OSN)、オステオポンチン (OPN) の mRNA 発現レベルについて比較検討した。

【材料と方法】

歯科矯正治療のために抜去された小臼歯から得られた HPLF を 4 継代目まで培養後、断続的な伸張力を Flexercell Strain Unit™ を用いて 3 回/分、18%伸張率で 1、3、5、7 日間与えた (stress(+)群)。また伸張力を与えない細胞群 (stress(-)群) をコントロールとした。

伸展刺激後、細胞数 (Cesar らの方法)、ALP 活性 (Kind-King 法)、各種 ECM (XII 型コラーゲン、I 型コラーゲン、OPN、OCN、OSN) の mRNA 発現量の測定 (LightCycler™ を用いた定量 RT-PCR 法) を行った。

【結果と考察】

stress(-)群に比べ stress(+)群のほうが XII 型コラーゲンの mRNA の発現は 3、5、7 日目で、OCN の mRNA の発現は 5、7 日目で、OSN の mRNA の発現は 7 日目で、また ALP 活性は 5、7 日目において有意に増加したのが観察された。細胞数は 1～7 日目において stress(+)群のほうが stress(-)群よりも増加傾向にあるも、両群に有意差は認められなかった。1～7 日目の両群において I 型コラーゲンと OPN の mRNA 発現に有意な差は認められ

なかった。

以上より、本研究で HPLF に対する断続的な伸張力によって、XII 型コラーゲン、OCN と OSN の mRNA 発現ならびに ALP 活性が増加することを示した。

培養歯根膜細胞に対して Flexercell Strain Unit™ を用いて 5% 伸張率の伸張応力を加えると I 型コラーゲンの発現は増加したが、10% 伸張率では変化が無いという報告がある。これは細胞に加えられる伸張応力の大きさに起因していることが示唆されている。我々の結果では断続的な伸張応力によって I 型コラーゲンの mRNA 発現に変化は無かった。これは今回使用した 18% 伸張率が I 型コラーゲンの産生を増加するには強すぎたことによるのかもしれない。PDL の成熟と再生の過程において、XII 型コラーゲンの産生と I 型コラーゲンの産生には密接な関係がある。XII 型コラーゲンは PDL の機能的な再生と非常に関係深いものだと考えられ、歯根膜再生のために XII 型コラーゲンを産生しているのかもしれない。

本実験ではコンフルエントな状態の細胞を使い ALP 活性の上昇を認めたが、これまでの他の報告ではセミコンフルエントな状態の細胞を使った場合 ALP 活性の低下が報告されている。これらは細胞培養条件の違いによると考えられた。

断続的な伸張力に対する細胞における ECM 分泌発現機構は完全には解明されてはいないが、近年 $\alpha_2\beta_1$ integrin がコラーゲン線維と細胞骨格の間に transmembrane link を形成することが報告され、さらに最近連続的に伸張応力をかけられた HPLF での α_6 と β_1 integrin の mRNA の発現が増加することが報告されている。本研究で明らかになった断続的な伸張力による XII 型コラーゲンの増加のメカニズムの詳細を明らかにするためには、さらなる研究が必要とされる。

【結論】

我々は HPLF の培養系において断続的な伸張力によって XII 型コラーゲン、ALP 活性、OCN ならびに OSN mRNA 発現が増加することを見出した。これらの結果は断続的な伸張力が PDL の再生に貢献する可能性を示唆した。

各審査委員が行った主な質問事項は以下の通りである。

- 1) 実験条件（サイクル数、伸張率）の設定の根拠はなにか。
- 2) 本実験で I 型コラーゲン mRNA 発現の増大が認められなかった理由。
- 3) XII 型コラーゲンの機能について。
- 4) 歯根膜におけるコラーゲン線維の修復機構はどのような機構か。
- 5) 本実験で OCN、OSN、OPN それぞれを調べた理由はなぜか。
- 6) 培養状態では用いた細胞はヘテロなのかホモなのか。
- 7) 形態学的な線維芽細胞と骨芽細胞の相違について。
- 8) 今後本実験をどのような形で発展させていくかの展望について。

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答ならびに説明が得られ、さらに今後の研究についても明確な方向性をもってしていると判定した。

審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。