

学位論文題名

機械的刺激が歯根膜線維芽細胞に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

緒言

歯根膜は咬合と密接に関係し、歯根膜を構成する線維芽細胞の機能も他の部位のものとは異なっていることが示されている。咬合している歯の歯根膜は、線維の機能的配列が見られるが、咬合を喪失した歯の歯根膜は、コラーゲン線維の減少や線維の微細化といった変化が観察される。歯根膜組織の維持には歯根膜を構成する主要な基質であるI型コラーゲンの産生が重要であり、咬合力の喪失による機械的刺激を受けなくなった歯根膜線維芽細胞のI型コラーゲンの産生が減少することが関与しているものと思われるが、細胞レベルでの機械的刺激に対する反応の詳細は不明である。

インテグリンは $\alpha \cdot \beta$ のサブユニットからなり、活性化されたインテグリンの細胞外ドメインは細胞外基質(ECM)の受容体として機能する。ECMとの結合により細胞内ドメインは細胞骨格タンパクと接着斑を形成し、結合タンパクのリン酸化によって種々の細胞内シグナル伝達を行うことが示されている。

Focal Adhesion Kinase (FAK) はインテグリンの下流にあるアダプタータンパクで、インテグリンからの情報を伝達する上で重要な役割を担っている。

心筋や血管平滑筋といった機械的刺激にさらされている組織の細胞では、刺激応答する際にインテグリンから情報伝達が始まり、その下流の情報伝達経路にMitogen Activating Protein Kinase (MAPK) が関与していることが示唆されている。しかし、咬合圧により恒常的に機械的刺激にさらされている歯根膜線維芽細胞における細胞接着の重要性およびMAPK経路の役割については不明な点が多い。

MAPKの一つであるp38は、炎症やストレスによって活性化されることが知られているが、近年このような炎症反応やストレスへの関与以外にも細胞にとって重要な機能を有していることが明らかとなってきた。

本研究は、ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯根膜線維芽細胞に伸展刺激を加えることによって人工的な咬合力を付加した際のインテグリンを主体とした細胞接着因子の下流にあるFAK, p38とI型コラーゲンの発現の変化について検索し、歯根膜細胞の機能の発現におよぼす機械的ストレスの影響について検討した。

## 方法および結果

矯正治療のため抜去された健全歯根膜より培養した歯根膜線維芽細胞と株化されたヒト歯肉線維芽細胞 (GIN1) を通法に従い培養し、歯根膜線維芽細胞とGIN1をI型コラーゲンでコーティングされたシリコン製の底からなる6穴ディッシュに $1 \times 10^6$ 個まき、伸展刺激を行わない対照群と細胞伸展装置にて伸展培養を行った実験群から細胞を回収し、タンパクを抽出した。抽出した $10 \mu\text{g}$ のタンパクをSDSページ電気泳動後、I型コラーゲン、FAK、p38に対する一次抗体を用いたウェスタンブロットを行った。検出されたバンドはイメージ・アナライザーにより発現量の定量を行った。

ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯根膜線維芽細胞のI型コラーゲンの発現をウェスタンブロットニングにより検索した結果、いずれの細胞も $155\text{kDa}$ のI型プロコラーゲンを発現していた。これらの細胞に伸展刺激を加えると、歯肉線維芽細胞では発現に顕著な差はみられなかったが、歯根膜線維芽細胞では1.8倍となり、その発現が有意に増強した。

次に伸展刺激によってヒト歯根膜線維芽細胞のFAKが活性化するかどうかを抗FAK抗体および活性型を特異的に認識する抗リン酸化FAK抗体を用いたウェスタンブロットニングで確認した。ヒト歯根膜線維芽細胞に伸展刺激を加えることにより、FAKの発現量は変化しなかったが、リン酸化FAKは1.8倍の増加が見られ、伸展刺激によりFAKが活性化することが明らかとなった。

さらに抗p38抗体および活性型p38を特異的に認識する抗リン酸化p38抗体を用いて、伸展刺激がp38の発現および活性の変化に影響を与えるかをウェスタンブロットニングにより検索した。p38の発現は実験群と対照群に顕著な差は見られなかったが、リン酸化p38は対照群に対し実験群で2.4倍に発現が増加し、ヒト歯根膜線維芽細胞においては伸展刺激を加えることにより、p38の活性が上がるということが明らかとなった。

## 考察

歯根膜は歯と骨を結びつけることに加え、咬合時に加わる圧力を緩衝することなど特異的な機能を果たしており、歯根膜を構成する線維芽細胞とコラーゲン線維はこの機能を維持するために機能的に配列し、常にコラーゲンの新生・吸収を行っている。今回の検索により、歯根膜線維芽細胞は歯肉線維芽細胞とは異なり、伸展刺激によりI型コラーゲンの産生が亢進することが明らかになった。歯根膜線維芽細胞は他の部位の線維芽細胞と比較して咬合力という恒常的な刺激を受ける環境にあり、歯根膜の主要な基質であるI型コラーゲンの合成が歯根膜線維芽細胞の受けた機械的刺激により制御されている可能性を強く示唆するものであった。

インテグリンは細胞外基質と結合し、細胞内ドメインを介して情報を細胞内へ伝達し、細胞の移動、増殖、分化などの調節に関わっていると考えられている。FAKはインテグリンとタンパク複合体を形成し、リン酸化されることで活性

化し、細胞内へ情報を伝達することが知られている。本実験の結果は、機械的刺激により活性化されたインテグリンが細胞内のFAKをリン酸化することで活性化したことを示している。

平滑筋細胞や腸上皮では、機械的刺激によってインテグリン-FAKを介しMAPKが活性化することが知られている。MAPKはインテグリンを介して活性化される情報伝達系の一つとして考えられているが、歯根膜細胞での検索は少ない。今回、MAPKの一つであるp38について機械的刺激との関連を検索した。p38は浸透圧や熱といった様々な物理化学的ストレス、または炎症性サイトカインによって活性化されることが知られているが、近年このような炎症反応やストレスへの関与以外にも細胞にとって重要な機能を有していることが明らかになってきた。I型コラーゲンの転写活性化メカニズムの詳細は未だ不明な点が多いが、Sp1はI型コラーゲンのプロモーター領域に結合しコラーゲン合成を促進させることが知られている。歯肉線維芽細胞においてactin binding proteinの一つであるfilamin-Aの発現量が増加する際に、p38と Sp1の相互作用によりfilamin-Aの転写活性化が生じることが報告されている。

今回の検索結果により、機械的刺激によって歯根膜線維芽細胞は歯肉線維芽細胞よりもI型コラーゲンの産生を増加させた。さらに歯根膜線維芽細胞内では機械的刺激によるFAKおよびp38の活性化が明らかとなった。これは機械的刺激がインテグリン-FAKを介した経路により、p38を活性化させ、I型コラーゲンの転写因子に作用し、その結果I型コラーゲンの合成が増加することを示唆するものであった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生  
副 査 教 授 向 後 隆 男  
副 査 教 授 吉 田 重 光  
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

## 学位論文題名

### 機械的刺激が歯根膜線維芽細胞に及ぼす影響

審査は、まず論文提出者に対して参考論文を含めた提出論文の内容の要旨を説明させ、論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文提出者は、ヒト歯根膜線維芽細胞およびヒト歯肉線維芽細胞において、人工的咬合力の負荷を想定して機械的刺激を加え、I型コラーゲンの産生の変化、さらに歯根膜線維芽細胞におけるインテグリンを主体とした細胞接着因子の下流にある FAK、I型コラーゲンの転写因子に関与する可能性がある p38 の活性について検索し、歯根膜細胞の機能の発現におよぼす機械的ストレスの影響について検討した。

#### [材料と方法]

矯正治療のため抜去された健全歯根膜より培養したヒト歯根膜線維芽細胞と、株化されたヒト歯肉線維芽細胞 (GIN1) を I 型コラーゲンでコーティングされたシリコン製の底からなる 6 穴ディッシュに  $1 \times 10^6$  個まき、24 時間培養した。その後、伸展刺激を加えず、さらに 24 時間培養を継続したものを対照群とし、実験群については細胞伸展装置にて伸展率 5%、毎分 30 回の頻度で 24 時間伸展培養を行った。細胞を回収した後、抗ヒト I 型コラーゲン抗体、抗ヒト FAK 抗体、抗ヒトリン酸化 FAK 抗体、抗ヒト p38 抗体、抗ヒトリン酸化 p38 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより各タンパクを可視化し、イメージ・アナライザーにより発現量の比較を行った。

#### [結果と考察]

ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯根膜線維芽細胞の I 型コラーゲンの発現をウエスタンブロッティングにより検索した結果、いずれの細胞も 155kDa の I 型プロコラーゲンを発現していた。これらの細胞に伸展刺激を加えると、歯肉線維芽細胞では発現に顕著な差はみられなかったが、歯根膜線維芽細胞では 1.8 倍となり、その発現が有意に増強した。歯根膜線維芽細胞は咬合力という恒常的な刺激を受ける環境にあり、歯根膜の主要な基質である I 型コラーゲンの合成が歯根膜線維芽細胞の受けた機械的刺激により制御されている可能性を強く示唆するものであった。

次に伸展刺激によってヒト歯根膜線維芽細胞のFAKが活性化するかどうかをウエスタンブロッティングで確認した。ヒト歯根膜線維芽細胞に伸展刺激を加えることによって、FAKの発現量は変化しなかったが、リン酸化FAKは1.8倍の増加が見られ、伸展刺激によりFAKが活性化することが明らかとなった。FAKはインテグリンとタンパク複合体を形成し、細胞内へ情報を伝達することが知られており、機械的刺激により活性化されたインテグリンが細胞内のFAKをリン酸化することで活性化したことを示している。

同様にして伸展刺激がp38の発現および活性の変化に及ぼす影響をウエスタンブロッティングにより検索した。p38の発現は実験群と対照群に顕著な差は見られなかったが、リン酸化p38は対照群に対し実験群で2.4倍に発現が増加し、ヒト歯根膜線維芽細胞においては伸展刺激を加えることにより、p38の活性が上がるということが明らかとなった。p38は炎症反応やストレスへの関与以外にも細胞にとって重要な機能を有していることが明らかになっており、I型コラーゲンの転写活性因子の一つであるSp1と相互作用することが報告されている。

以上の結果は機械的刺激がインテグリン-FAKを介した経路により、p38を活性化させ、I型コラーゲンの転写因子に作用し、その結果I型コラーゲンの合成が増加することを示唆するものであった。

#### [結論]

伸展刺激により、歯肉線維芽細胞では発現量に変化は認められなかったが、歯根膜線維芽細胞は有意にI型コラーゲンの発現が亢進し、その際、FAKが活性化するとともに、p38のリン酸化が認められ、機械的刺激と歯根膜線維芽細胞の機能発現・維持との関連が示唆された。

以上の論述に引き続き実験方法、結果、考察、今後の展望および臨床とのつながりについての質疑応答を行った。

主な質問事項は以下のとおりである。

1. ヒト歯根膜線維芽細胞の培養。
2. 発生学的由来による歯肉線維芽細胞と歯根膜線維芽細胞の相違。
3. I型コラーゲンの合成に関わる経路。
4. FAKからp38への伝達経路。
5. 歯肉線維芽細胞における伸展刺激時のFAKおよびp38の活性化。
6. 本研究の今後の発展性。

論文提出者はいずれにも明快な回答と説明をし、本論文の内容に関係のある事項に対しても明確な知識を有していた。

本研究は機械的刺激とI型コラーゲン産生、およびインテグリン-MAPK系の関与を明らかにした。これは歯根膜組織維持のメカニズムについて、分子生物学的解明の可能性を示唆している。さらに今後の展望に関してもしっかりとした研究立案をもっており、将来性の点においても高く評価されるものであった。よって、学位申請者は博士(歯学)の学位授与にふさわしいものと認めた。