学位論文題名

Periodontal ligament cells under intermittent tensile stress regulate mRNA expression of osteoprotegerin and tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 and-2.

(周期的伸展刺激によるヒト歯根膜細胞における osteoprotegerin と tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1,-2 mRNA 発現の調節)

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯根膜は、生理的条件下で咬合や咀嚼による機械的負荷を受けており、歯に加わる圧力の緩衝はその主要な機能である。歯根膜の一方は歯槽骨と接しており、歯根膜と歯槽骨の間には機能的な相互作用があると考えられている。

一般に、骨吸収を担う破骨細胞の分化と機能は、骨芽細胞が産生する receptor activator of nuclear kappa- β ligand (RANKL) ならびに osteoprotegerin (OPG) 等の分子によって調節されていることが知られている。RANKL は、破骨細胞前駆細胞の RANK と結合し、破骨細胞分化を誘導する。一方、可溶性因子である OPG は RANKL に結合することで RANK と RANKL との結合を阻害し、破骨細胞分化を抑制する。歯根膜細胞においても RANKL と OPG の産生が報告されており、これらの分子を介する骨吸収の調節の可能性が示唆されている。また、歯周組織における細胞外基質の代謝は、その分解酵素である matrix metalloproteases (MMPs) と、その抑制因子である tissue inhibitor of metalloproteases (TIMPs) による制御が知られている。

本研究では、ヒト歯根膜細胞培養系を用い、周期的伸展刺激の付与による細胞の RANKL, OPG, TIMP ならびに MMP 等の産生とその制御を調べ、ヒト歯根膜細胞が伸展刺激によって骨吸収系に対してどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

歯科矯正治療による便宜抜歯により得られた小白歯の歯根中央3分の1の部分より歯根膜を回収し、 α -MEM培地を用い、CO₂インキュベーター内で培養した。4継代まで培養した細胞をI型コラ-ゲンで表面処理した可動性のシリコン膜底面を持つ培養用ディッシュに 1×10^5 cells/wellの割合で播種し、その後コンフルエントになるまで3日間、培養した。この細胞を、Flexercell strain unit (Flexcell International Co. McKeesport, PA, USA)を使用して、周期10 cycles/minの伸展力を加え培養を行った。伸展刺激の細胞内情報伝達がどのような分子群を介するかを明らかにするため、種々の細胞内情報伝達系の阻害剤を添加し培養

した。また、伸展刺激と感染との複合作用を明らかにするため、グラム陰性菌の外毒素であるLPSを添加し、同様に細胞への伸展刺激の負荷を行った。

性が考えられた。一方、ヒト歯根膜細胞における伸展刺激によるTIMP-1 mRNA量の増加がタンパク質合成阻害剤によって抑制されたことから、いくつか複数の経路を介して伸展刺激による細胞内情報が伝達されていると考えられた。

LPSの添加によって、歯根膜細胞のOPG mRNA量の伸展刺激による増加が認められなくなったことは、歯根膜細胞における伸展刺激による細胞内情報伝達分子の活性化経路の少なくとも一つをLPSが制御しうることを示すものと思われた。このことは、歯根膜における感染は、機械的刺激の骨に及ぼす作用を制御する可能性を示唆するものと考えられた。

【結論】

伸展刺激の負荷によってヒト歯根膜細胞培養系におけるOPG、TIMP-1ならびに-2のmRNA発現が増加することが明らかとなった。また、この伸展刺激によるこれら分子の発現には複数の細胞内情報伝達系が関与していること、ならびにLPSはその経路を制御しうることが明らかとなった。OPGは破骨細胞分化の抑制、TIMPは細胞外基質の分解抑制を介して歯周組織代謝の調節において機能しうることから、本研究結果で示された伸展刺激によるそれら分子の発現の変化は、伸展刺激に適応するための歯根膜細胞の応答であると考えられ、これらの分子を介して歯根膜の生理的機能が維持されていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 森 田 学
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Periodontal ligament cells under intermittent tensile stress regulate mRNA expression of osteoprotegerin and tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 and-2.

(周期的伸展刺激によるヒト歯根膜細胞における osteoprotegerin と tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1,2 mRNA 発現の調節)

審査は、全審査委員出席のもと、学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

歯根膜は、生理的条件下で咬合や咀嚼による機械的負荷を受けており、歯に加わる圧力の緩衝はその主要な機能である。歯根膜の一方は歯槽骨と接している。骨吸収を担う破骨細胞の分化と機能は、receptor activator of nuclear kappa- β ligand (RANKL) ならびに osteoprotegerin (OPG) 等の分子によって調節されていることが知られている。RANKL は、破骨細胞前駆細胞の RANK と結合し、破骨細胞分化を誘導する。また、歯根膜における細胞外基質の代謝は、その分解酵素である matrix metalloproteases (MMPs) と、その抑制因子である tissue inhibitor of metalloproteases (TIMPs) による調節が知られている。

本研究では、ヒト歯根膜細胞培養系を用い、周期的伸展刺激の付与による細胞の RANKL, OPG, TIMP ならびに MMP 等の産生とその制御を調べ、ヒト歯根膜細胞が、伸展刺激によって骨吸収に対してどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

歯科矯正治療による便宜抜歯により得られた小臼歯より歯根膜を回収し、 α -MEM培地を用い、CO₂インキュベーター内で培養した。4継代まで培養した細胞を 1×10^5 cells/wellの割合で播種しコンフルエントになるまで培養した。この細胞を、Flexercell strain unitを使用し周期10 cycles/minの伸展力を加え培養を行った。伸展刺激の細胞内情報伝達がどのような分子群を介するかを明らかにするため、種々の阻害剤を添加し培養した。また、伸展刺激と感染との複合作用を明らかにするため、グラム陰性菌の外毒素であるLPSを添加し、同様に伸展刺激の負荷を行った。これら伸展刺激を負荷した後、細胞より全RNAの抽出を行い逆転写

後、RT-PCR法ならびにリアルタイム定量PCR法を用いmRNA量を測定した。また培養上清を回収し、ELISA法ならびにEIA法を用いOPGのタンパク量ならびにプロスタグランジン(PG)E2量を測定した。

ヒト歯根膜細胞へ伸展刺激を負荷するとOPG mRNA量は48時間後には増加し120時間後にも持続した。培養上清中のOPGタンパク質の量は、伸展刺激によって約3倍に増加した。LPSを添加し、伸展刺激を加えたところ、OPG mRNA量の増加は認められなかった。またRANKL mRNA量はLPSの添加もしくは無添加に関わらず伸展刺激によって変化しなかった。伸展刺激によるこのOPG mRNAの発現誘導は、インドメタシンもしくはゲニスタチンの添加によって抑制された。培養上清中のPGE2は、伸展刺激によって約3.8倍に増加した。またTIMP-1ならびにTIMP-2 mRNA量は、伸展刺激によって増加した。このTIMP-1 mRNA量の増加はシクロヘキシミドの添加によって抑制された。しかしながら、TIMP-2 mRNA量は、伸展刺激による変化が認められなかった。

これらの結果から、歯根膜細胞は伸展刺激によって破骨細胞分化を調節する可溶性タンパク質の産生を変化させ、骨吸収を制御している可能性が考えられた。すなわち、適度な伸展刺激は、歯根膜細胞の産生するOPGを介して歯槽骨吸収を抑制しTIMPの産生の増加をもたらす細胞外基質の分解を抑制する可能性が考えられた。また、いくつか複数の経路を介して伸展刺激による細胞内情報が伝達されていると考えられたが、OPG産生の増大には、シクロオキシゲナーゼの活性化が関与すると考えられた。さらに、伸展刺激による細胞内情報伝達分子の活性化経路の少なくとも一つをLPSが制御しうることを示すものと思われた。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容について口頭により質疑が行われた。主な質疑項目は、歯根膜細胞採取の方法、歯根膜と歯槽骨の関連、歯根膜における伸展と圧縮の生理的意義、歯根膜におけるPGの受容体について、LPSの作用機構について、使用した歯根膜細胞の採集数等であった。また、本研究の背景となる骨吸収の生化学的機構についてなど多岐にわたる関連事項の試問も行った。学位申請者からは、いずれの質問に対しても適切かつ明快な回答が得られた。更に、今後の研究の方向性についても明確な将来の展望が示された。

本論文は、伸展刺激の負荷によるヒト歯根膜細胞培養系におけるOPG、TIMP-1ならびにTIMP-2のmRNA発現とその制御機構を明らかにした点が評価され、この業績は、今後の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるにふさわしいと認められた。