【 183 】

氏名	小 橋 紀 之
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 8 3 号
学位授与の日付	平 成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	持続的進展力によりヒト歯根膜細胞に発現する遺伝子の解析
論文審査委員	教授 渡邊 達夫 教授 高柴 正悟 教授 山本 照子

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯根膜は歯と歯槽骨という 2 つの硬組織の間に介在する軟組織で、生理的条件下で様々な重要な役割を果たしている。矯正的歯の移動においては、歯根膜を構成する種々の細胞が矯正力に対して相互に活発に反応することにより、硬組織である歯槽骨中を歯が移動する。そのため、歯根膜は矯正的歯の移動の中心的な役割を果たすと考えられる。ところが、歯根膜には様々な分化段階の未分化間葉系細胞や、成熟した間葉系細胞等が混在していると考えられているため、矯正的な物理的刺激が生物的反応へと変換されるメカニズムに関しては不明な点が多い。しかし、様々な分化段階の歯根膜細胞のどのような遺伝子が機械的刺激に応答するか広範に検索することにより、歯根膜の機械的刺激受容機構の解明に繋がると考えられる。そこで本研究では、様々な間葉系細胞が存在すると思われるヒト歯根膜片からアウトグロースした初代歯根膜細胞培養系に持続的伸展力を作用させ、cDNA アレイ法を用いて遺伝子発現を広範に検索した。

【材料と方法】

ヒト歯根膜細胞の培養：矯正治療を目的に便宜抜去された第一小臼歯の歯根中央部 1/3 より歯根膜片を採取し、タイプⅠコラーゲンで表面処理されたフレキシブルボトムディッシュに、10%牛胎仔血清（FBS）を含むアルファ変法 Eagle 培地（α-MEM）で 37℃、5％CO_2気相下にて静置培養して細胞をアウトグロースさせた。実験にはコンフルエント後まで培養した初代および継代 3 代目歯根膜細胞を使用した。

持続的伸展力の負荷：プレートのカバーにシャフトをとりつけ、カバーを被せた際に各ウェルのフレキシボトム中央部を 2mm 下方に押すことにより、約 1.3%の持続的伸展力が負荷されるような装置を作製した。

cDNA アレイ解析：持続的伸展力を作用させた後、経時的に細胞から総 RNA を抽出した。この RNA を SMART PCR cDNA Synthesis1 Kit 及び SMART PCR Amplification kit を用いて増幅した後、^{32}P で標識し、human 1.2 Array を用いて cDNA アレイ分析を行った。

定量的 RT-PCR 法：cDNA アレイ分析にて発現差の大きかった遺伝子について、LightCycler にて定量的 RT-PCR を行い、その発現量を定量的に評価した。

ウエスタンブロッティング：持続的伸展力を作用させて経時的に細胞を回収し、タンパクを抽出した。抗 active-p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK)抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

p38MAPK 阻害実験：p38MAPK の特異的阻害剤である SB203580 を 3 代目ヒト歯根膜細胞培

養系に添加した後、持続的伸展力を作用させて経時的に細胞から総 RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて、LightCycler にて定量的 RT-PCR を行い、阻害剤添加群と対照群の遺伝子発現を定量的に比較した。

【結果】

1. 初代ヒト歯根膜細胞培養系を用いた cDNA アレイの結果、持続的伸展力によって発現が増加した遺伝子は、growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153 (GADD153)、interleukin 2 receptor alpha subunit precursor、integrin alpha L、caspase 10、decorin、small inducible cytokine A5、integrin beta 1、transforming growth factor-beta、avian myelocytomatosis viral oncogene homolog、interleukin 6 precursor、teratocarcinoma-derived growth factor 1、cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) などであった。また、減少した遺伝子は、cyclin E2、cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase B、ephrin A4 precursor、inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor、NEK2、matrix metalloproteinase 17、soluble guanylate cyclase alpha 2 subunit、cyclin B1、bcl-2 などであった。
2. cDNA アレイにより、持続的伸展力負荷群と対照群との間の発現差の大きかった遺伝子のうち、細胞周期調節あるいは、アポトーシスなどに関連する遺伝子について、定量的 RT-PCR を行った。持続的伸展力を負荷した初代ヒト歯根膜細胞において、GADD153、caspase10、decorin、p21 の mRNA 発現量が増加し、また、cyclin E2、bcl-2 の mRNA 発現量が低下した。
3. 継代 3 代目ヒト歯根膜細胞においても持続的伸展力を負荷後、経時的に RNA を抽出して定量的 RT-PCR を行ったところ、GADD153 mRNA の発現が増加した。
4. 歯根膜細胞における持続的伸展力のシグナル伝達経路について調べるため、継代 3 代目ヒト歯根膜細胞を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、リン酸化 p38MAPK が増加した。
5. 継代 3 代目ヒト歯根膜細胞において、持続的伸展力により増加した GADD153 mRNA は、p38MAPK 阻害剤により増加がほぼ完全に阻害された。

【考察】

様々な間葉系細胞が存在すると考えられる初代ヒト歯根膜細胞培養系に持続的伸展力を作用させ、cDNA アレイで発現遺伝子を広範に検討した結果、発現が増加した遺伝子は、サイトカインや細胞外基質、接着因子、細胞周期調節あるいは、アポトーシス等に関連する遺伝子であった。一方、発現が減少した遺伝子は、サイトカインや細胞周期調節因子、プロテインキナーゼ等に関する遺伝子であった。このうち、発現差の大きかった細胞周期制御に関連する遺伝子について定量的 RT-PCR で更に詳細に検討した結果、GADD153、p21 mRNA が増加し、cyclin E2 の mRNA が減少することが明らかになった。さらに本研究で作用させた持続的伸展力は、歯根膜細胞において p38MAPK のリン酸化を促進し、SB203580 により GADD153 mRNA の誘導が完全に阻害されたたことから、GADD153 の mRNA 発現の上昇は、p38MAPK 経路を介することが明らかとなった。GADD153、p21、cyclin E2 遺伝子は、細胞周期の G1 期から S 期への進行を制御すると考えられている遺伝子であり、持続的伸展力により歯根膜細胞の細胞周期の進行が抑制される可能性が示唆された。また、GADD153、caspase-10 mRNA の上昇や、bcl-2 mRNA の減少など、アポトーシスに関連する遺伝子も発現に変化が認められ、持続的伸展力により歯根膜細胞にアポトーシスが誘導される可能性も考えられた。

【結論】

初代ヒト歯根膜細胞は持続的伸展力に応答し様々な遺伝子を発現するが、特に細胞周期抑制あるいは、アポトーシス誘導に関与する遺伝子が著しく応答することが明らかになった。

論文審査結果の要旨

矯正的歯の移動において、歯根膜を構成する種々の細胞が矯正力に対して相互に活発に反応することにより、硬組織である歯槽骨の中で歯が移動する。歯根膜には様々な分化段階の未分化間葉系細胞や、成熟した間葉系細胞等が混在していると考えられているため、矯正的な物理的刺激が生物的反応へと変換されるメカニズムに関しては不明な点が多い。しかし、様々な分化段階の歯根膜細胞のどのような遺伝子が機械的刺激に応答するかを検索することは、歯根膜の機械的刺激受容機構の解明に繋がると考えられる。

本研究では、様々な間葉系細胞が存在すると思われるヒト歯根膜片からアウトグロースした初代培養系に持続的伸展力を作用させ、cDNA アレイ法を用いて遺伝子発現を広範に検索した。

その結果、持続的伸展力によって GADD153、caspase10、decorin、p21 の遺伝子の発現が増加した。他方では、cyclin E2、NEK2、cyclin B1、bcl-2 の遺伝子の発現は減少した。このうち、持続的伸展力による GADD153 mRNA 量の増加は、継代 3 代目のヒト歯根膜細胞において、p38MAPK 阻害剤の添加によって、ほぼ完全に阻害された。そのことから、次の考察を行った。: 1) 持続的伸展力は歯根膜細胞の細胞周期の進行を抑制する可能性がある、2) 伸展力は歯根膜細胞にアポトーシスを誘導する可能性がある。

本研究は、ヒト歯根膜の初代培養細胞が持続的伸展力に応答し、特に細胞周期抑制あるいはアポトーシス誘導に関与する遺伝子の発現が著しく増加することを始めて明らかにしたことによって、歯槽骨内での歯の移動のメカニズムの解明に寄与するものである。よって、本申請論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。