

氏名	藤田 彩乃		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5927号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	周期的伸展刺激と静水圧刺激に対するヒト歯根膜細胞の形態と配向の変化		
論文審査委員	松本 卓也 教授	皆木 省吾 教授	鳥井 康弘 教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【緒言】

歯根膜は、歯槽骨とセメント質の間に存在し、咀嚼や歯ぎしりなどの顎運動や歯の移動などの矯正治療によって常に伸展刺激や圧力刺激などの機械刺激に晒されている。咀嚼の際に歯周組織に加わる機械刺激は10 MPaに及ぶという報告や、最大咬合力は50 MPaに及ぶという報告がある。このような機械刺激が断続的にくり替えされる環境下において、正常な歯根膜線維の走行は部位によって異なっており、歯軸に対し斜走線維が最も急傾斜であり、さらにその傾斜は水平線維、歯槽頂線維の順歯軸に対し50°~70°の角度で走行しており、長軸方向に波形状になっている。

現在までに、咬合力や咬合圧を*in vitro*で再構築した結果は報告されているが、歯根膜への伸展刺激や圧力刺激を細胞レベルで制御し、もたらされる細胞動態を調べた報告は残念ながら少ない。そこで本研究では、ヒト歯根膜細胞を用いた*in vitro*機械刺激制御システムの開発と本計測技術によるヒト歯根膜細胞の機械刺激による細胞動態への影響の解明を目的とした。具体的には伸展刺激によるヒト歯根膜細胞の配向性への影響と、静水圧刺激によるヒト歯根膜細胞の細胞形態への影響についての解明を目的に本研究を立案した。

【材料と方法】

- ヒト歯根膜細胞の分離・培養**：健康なヒト抜去歯から分離・培養した線維芽細胞様細胞である歯根膜細胞を用いた。培養は、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(PS)を含むMinimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α -MEM)を用いて、37℃、5%、CO₂存在下で行った。5~9継代の細胞を実験に用いた(岡山大学研究倫理審査委員会:承認番号:研1609-002)。顕微鏡下で観察を行う際には、10% FBS、1% PSを含有し、フェノールレッド非含有の α -MEMを用いた。
- 伸展刺激**：周期的伸展刺激をヒト歯根膜細胞へ加えるため、を用いた。0.3 mg/mL Cellmatrix[®] Type I-Cで30分間コーティングしたPDMS (polydimethylsiloxane)製のストレッチチャンバー(サイズ:20×20 mm)に、上記1の記載にしたがって培養した細胞を1×10⁵個の濃度で播種し、2日間培養後、周期的伸展刺激(伸展率20%、伸展頻度20回/分)で16時間培養した。なお、コントロールとして、伸展刺激を加えずにストレッチチャンバー上で培養した細胞を用いた。
- 静水圧刺激**：静水圧刺激をヒト歯根膜細胞へ加えるため、高静水圧負荷装置を用いた。高静水圧負荷装置は高圧ソケット(S-8/8)、ハンドポンプ(WP-1B(B))、水用高圧ナイロンホース(WNH3/8)から構成されている。ハンドポンプにより、圧力媒体である蒸留水がポンプから押し出され、高静水圧負荷装

置内へと流入することで、細胞に静水圧刺激が加わる仕様となっている(最大 70 MPa まで加圧可能)。0.3 mg/mL Cellmatrix[®] Type I-C で 30 分間コーティングしたカバーガラス (No.1, 直径 22 mm) に、上記 1 の記載にしたがって培養した細胞を 5×10^4 個の濃度で播種し、2 日間培養後、ユニパック[®] (ポリエチレン製) 内に封入し、高静水圧負荷装置内に留置し、静水圧刺激を 5 分間与えた。なお、コントロールとして、静水圧刺激を加えずにカバーガラス上で培養し、ユニパック[®] に封入した細胞を用いた。

4. **高圧顕微鏡**: 静水圧刺激下のヒト歯根膜細胞の細胞動態をリアルタイムで観察するため、西山らが開発した高圧顕微鏡を使用した。高圧顕微鏡は倒立型顕微鏡に搭載する高圧力チャンバーとセパレーター、および、圧力を加えるハンドポンプから構成されている。上記 3 と同様にカバーガラスに播種した細胞を高圧チャンバー内に封入し、静水圧刺激を 5 分間与えた際の細胞の形態変化を観察した。なお、コントロールとして、静水圧刺激を加えずにカバーガラス上で培養し、高圧チャンバー内で観察した細胞を用いた。
5. **免疫蛍光染色**: ヒト歯根膜細胞に伸展刺激を負荷し、細胞骨格であるアクチン線維と接着斑構成タンパク質であるパキシリン、核を染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。
6. **ライブイメージング, タイムラプス撮影**: ヒト歯根膜細胞に静水圧刺激を負荷し、アクチン線維は SiR-Actin, 核は Nuc Spot Live Cell Nuclear Stains 488 を用いて染色し、0.1 frame/sec の間隔で静水圧刺激 5 分間、静水圧刺激除去後 5 分間、連続撮影した。
7. **画像解析**: 画像解析ソフトを用いて解析を行った。伸展刺激に関しては細胞の長軸方向と伸展刺激方向のなす角の角度解析を行った。静水圧刺激に関しては、細胞の長軸方向と短軸方向の長さの変化、核の面積の変化の解析を行った。
8. **miRNA マイクロアレイ**: 上記 7 の結果にて細胞の形態変化の見られた時点の miRNA 発現解析を行った。伸展刺激に関しては刺激負荷 6 時間後、静水圧刺激に関しては、刺激負荷 5 分後に静置培養 1 時間後に RNA を抽出し解析を行った。マイクロアレイの実施は DNA チップ研究所に依頼し、データ解析には、Gene Spring 解析ソフト (Agilent Technologies) を用いた。実験で得られたデータの正規化処理後、20 パーセント以上発現量、変動係数(標準偏差を平均値で割った値: CV (Coefficient of Variation)) が 50% 以下のフィルタリングを実施した。2 条件(伸展刺激あり, 伸展刺激なし, 静水圧刺激あり, 静水圧刺激なし)をパラメトリックと仮定し、Moderated T-test, Benjamini-Hochberg FDR 法を用いて、P 値 0.05 以下、Fold Change 値 2 以上のサンプルのみ検出した。

【結果】

1. **伸展刺激による配向性への影響**: 伸展刺激を負荷したヒト歯根膜細胞は、刺激負荷会誌 4 時間後から配向性に変化がみられ、互いに平行方向かつ、伸展刺激方向に対し $60^\circ \sim 75^\circ$ に配向した。
2. **静水圧刺激による細胞形態への影響**: 20 MPa 以上の刺激下では、細胞の短軸方向の長さの減少が見られ、静水圧刺激除去後、細胞の短軸方向の長さの増加が見られた。アクチン線維の崩壊は見られなかった。核に関しては、40 MPa 以上の刺激下で核の面積が減少した。
3. **伸展刺激による miRNA の発現量の変化**: 39 個の miRNA の発現量が有意に増加し、6 個の miRNA の発現量が有意に減少した。
4. **静水圧刺激による miRNA の発現量の変化**: miRNA 発現量に統計的に有意な変化は検出されなかった。

【考察】

本研究から、ヒト歯根膜細胞は一軸方向の周期的な伸展刺激によって伸展刺激方向に対し、 $60^\circ \sim 75^\circ$ に配向することが分かった。生体内での歯根膜線維の走行は $50^\circ \sim 70^\circ$ であることから、我々の *in vitro* 機械刺激負荷制御システムは生体内を模擬できていると考える。また、咬合力のような機械刺激が歯周組織の細胞の配向性を制御していることが示唆された。

細胞の形態変化は 20 MPa 以上で生じ、細胞の短軸方向の長さのみ変化が生じることが分かった。これは、ヒト歯根膜細胞が細胞の長軸方向に構築している大きなストレスファイバーは崩壊せず、短軸方向の小さなアクチン線維が崩壊することに起因すると考えられる。また、核の変形は 40 MPa 以上で生じることが分かり、核は 40 MPa 以上の静水圧刺激に感受性があることが示唆された。

生体内では静的な圧力刺激ではなく、周期的な圧力刺激が加わっている。今後は繰り返しの圧力刺激が

負荷可能な装置の開発が望まれる。

【結論】

ヒト歯根膜細胞は伸展方向に対して $60^{\circ}\sim 75^{\circ}$ に配向することで歯を支持することが示唆され、過度な機械刺激は歯根膜組織の破壊を引き起こし、性状変化を引き起こすことが示唆された。

論文審査結果の要旨

歯根膜は、歯槽骨とセメント質の間に存在し、咀嚼や歯ぎしりなどの顎運動や歯の移動などの矯正治療によって、常に伸展刺激や圧力刺激などの機械刺激に晒されている。咀嚼の際に歯周組織に加わる機械刺激は 10 MPa に及ぶという報告や、最大咬合力は 50 MPa に及ぶという報告がある。このような機械刺激が断続的に繰り返される環境下において、正常な歯根膜線維の走行は部位によって異なっており、歯軸に対し斜走線維が最も急傾斜であり、さらにその傾斜は水平線維、歯槽頂線維の順に歯軸に対し 50°~70°の角度で走行しており、長軸方向に波形状になっている。現在までに、咬合力や咬合圧を *in vitro* で再構築した結果は報告されているが、歯根膜への伸展刺激や圧力刺激を細胞レベルで制御し、もたらされる細胞動態を調べた報告は少ない。そこで本研究では、*in vitro* 機械刺激負荷制御システムを用い、機械刺激がヒト歯根膜細胞の形態と配向に及ぼす影響を調べることを目的とした。具体的には伸展刺激によるヒト歯根膜細胞の配向性の変化と、静水圧によるヒト歯根膜細胞の細胞形態の変化の解析を目的に本研究を立案した。

健康なヒト抜去歯から分離・培養したヒト歯根膜細胞に周期的伸展刺激（伸展率 20%、伸展頻度 20 回/分）を加えたところ、刺激負荷開始 4 時間後から配向性に変化がみられ、互いに平行方向かつ、伸展刺激方向に対し 60°~75°に配向した。また、ヒト歯根膜細胞に静水圧刺激を加えたところ、20 MPa 以上の刺激下では、細胞の短軸方向の長さの減少が見られ、静水圧刺激除去後、細胞の短軸方向の長さの増加が見られた。アクチン線維の崩壊は見られなかった。核に関しては、40 MPa 以上の刺激下で核の面積が減少した。細胞の形態変化の見られた時点の miRNA 発現解析を行ったところ、伸展刺激時では 39 個の miRNA の発現量が有意に増加し、6 個の miRNA の発現量が有意に減少した。静水圧刺激時では有意に変化した miRNA は検出されなかった。これらの結果からヒト歯根膜細胞は伸展方向に対して 60°~75°に配向することで歯を支持することが示唆された。

以上のように、本研究は静水圧刺激がヒト歯根膜細胞の細胞形態に及ぼす変化をリアルタイムで観察したものであり、得られた結果は機械刺激によるヒト歯根膜細胞の細胞動態の変化を解明する一助となる。

よって、本審査委員会は、本申請論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。