

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

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

藤田 彩乃

Morphology and Orientation of Human Periodontal Ligament Cells

in Response to Cyclic Stretch and Hydrostatic Pressure

Department of Pathophysiology-Periodontal Science,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Ayano FUJITA

(平成 30 年 12 月 14 日受付)

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¹⁾。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²⁾。

しかし、歯科疾患によって咬合関係を喪失すると、歯根膜線維は廃用性萎縮を生じ、歯周組織の機能的構造が失われることが知られている³⁾。すなわち、歯の抜去や歯冠の削合によって咬合機能を喪失させると、対合歯の歯周組織の歯根膜線維は機能的な配列を失って廃用性萎縮を生じ、同時に歯槽骨表層に骨新生が生じることによって、最終的に歯根膜腔の狭窄が起こるとされている。さらに、咬合機能喪失後に咬合関係を回復させた場合には、歯根膜腔が拡大して、歯根膜には線維芽細胞の増加と線維の新生が起こり、その結果として歯周組織の機能的構造が修復されるとも報告されている³⁾。

しかし、咬合という機械刺激が歯周組織に与える影響の詳細の解明には研究の余地

がある。すなわち、機械刺激が破骨細胞の活性化や分化に影響し歯周組織のリモデリングに繋がること⁴⁾、外傷性咬合や矯正治療などによる歯の移動などの生理的閾値を超える機械刺激に対して様々な化学伝達物質を放出し、歯周組織の炎症と破壊を助長すること^{5,6)}、口腔内の歯周病原細菌が生産した病原因子が歯周組織構成細胞の細胞内シグナル伝達経路を活性化して炎症性サイトカイン産生を誘発すること⁷⁾などの分子細胞生物学的な研究成果が出てきている。そのため、歯周病罹患率の高い成人層での矯正治療時では、歯周病原細菌がもたらす宿主細胞の応答を考慮する必要性がある。しかし、歯周炎に罹患した部位では炎症性サイトカインが歯周組織のリモデリングを修飾して複雑化し、機械刺激に対する歯根膜組織応答機構の現在まで理解は非常に困難であった。そこで、臨床前段階での機械刺激による歯根膜組織の知見を創出するためには、機械刺激による歯根膜組織の *in vitro* 構成システムが必要不可欠となる。

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^{8,9)}、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、*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。すなわち、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を観察した。

材料と方法

1. ヒト歯根膜細胞の分離・培養

本人または保護者へのインフォームド・コンセントの下，健康な歯周組織を有する2名のドナー（21歳女性，19歳女性）の第一・第二小臼歯，そして智歯を矯正治療のために便宜抜歯を行い，それに付着する歯根膜組織を採取した（岡山大学研究倫理審査専門委員会：承認番号：研 1609-002）。ドナーには，細胞の提供を受ける前に，使用目的を十分に説明して同意を得た。

線維芽細胞様細胞である歯根膜細胞は Seo らの方法¹⁰⁾にしたがって分離した。歯根膜中央部から採取した歯根膜組織を，2 mg/mL の Collagenase Type I（フナコシ株式会社，東京）と 1 mg/mL の DISPASE®II（三光純薬株式会社，千葉）を体積比 1：1 で混合した溶液内で，37°Cで 60 分間処理を行った。さらに，同液からメッシュサイズ 70 μm の Cell strainer（Corning, Corning, NY, USA）を用いて組織片様の凝集塊を除去した後に，遠心分離（270 \times g，5分間）し，沈殿を 10 cm 培養皿（Corning）に播種した。培地には 10% fetal bovine serum (FBS：Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)と 1% Penicillin-Streptomycin Solution（ \times 100）（PS：和光純薬工業株式会社，大阪）を含有する Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification（ α -MEM：ナカライテスク株式会社，京都）を用い，細胞培養を 37°C，5% CO₂，100%湿度下で 21 日間行い，細胞

のコロニー形成を確認した。上記で得たコロニーを継代し、以後の実験系に用いた、実験には5~9継代目の細胞のみを使用した。

細胞の継代には、最終濃度が0.25% Trypsin (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Canada) と0.5 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich) になるように調整された混合溶液 (Trypsin-EDTA) を用いた。

顕微鏡下で観察を行う際には、10% FBS と1% PS を含有し、フェノールレッド非含有の α -MEM (和光純薬工業株式会社) を用いた。

2. 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、ShellPa Pro (メニコン, 愛知) (図1a) を用いた。pH3 の塩酸で希釈した0.3 mg/mL Cellmatrix® Type I-C (新田ゼラチン, 大阪) 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, メニコン) (図1b) に、上記1の記載にしたがって培養した細胞を 1×10^5 個播種し、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。

3. 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 (図2A) を用いた。

高静水圧負荷装置は高圧ソケット (S-8/8, 理研精機株式会社, 新潟), ハンドポンプ (WP-1B (B), 理研精機株式会社), 水用高圧ナイロンホース (WNH3/8, 理研精機株式会社) から構成されている。ハンドポンプによって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。静水圧が厚さ 0.04 mm のユニパック® (ポリエチレン製, 生産日本社, 東京) に加わることで, 細胞に静水圧刺激が加わる仕様とした (最大 70 MPa まで加圧可能)。0.3 mg/mL Cellmatrix®Type I-C (新田ゼラチン) で 30 分間コーティングしたカバーガラス (No.1, 直径 22 mm, 松浪硝子工業株式会社, 大阪) に, 上記 1 の記載にしたがって培養した細胞を 5×10^4 個播種し, 2 日間培養後, ユニパック® (生産日本社) 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® (生産日本社) 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形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¹⁰⁾を使用した (図 2B)。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。実験サンプルを封入する高圧チャンバーは, 加圧時に生じる歪みに対して可塑的に変形できるようにニッケル合金 (ハステロイ C276) を用いて製作した。チャン

バーには2つの開口部を儲け、ガラス製（BK7）の光学基盤をエポキシ樹脂で固定した。開口数（NA : numerical aperture）は、対物レンズ側が NA=0.60, コンデンサー側は NA=0.55 である。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、セパレーター内へと流入する。静水圧によって厚さ 0.2 mm のテフロン製の膜を変形させることで、高圧力チャンバー内を満たす培地の圧力へと適切に変換される仕様とした（最大 150 MPa まで加圧可能）。これによって高圧力をかけても結像能や倍率にほとんど影響なく、大気圧中とは変わらない解像度で多用な顕微鏡観察像を取得できると報告されている¹⁰⁾。0.3 mg/mL Cellmatrix®Type I-C（新田ゼラチン）で30分間コーティングしたカバーガラス（No.1, 直径 6 mm, 松浪硝子工業株式会社）に、上記1の記載にしたがって培養した細胞を 1×10^4 個播種し、2日間培養後、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

免疫蛍光染色法を用いて伸展刺激によるヒト歯根膜細胞の細胞骨格形態変化の観察を行った。免疫蛍光染色法は、特異的一次抗体と蛍光色素標識の二次抗体を反応させ、励起光を照射することによって検出した。シリコンチャンバー上に播種した培養

細胞を、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（和光純薬工業株式会社）に15分間浸漬固定した後、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffer saline : PBS, 日水製薬株式会社, 東京）で3回浸漬洗浄した。0.2% polyoxyethylene octylphenyl ether (Triton-X100, ナカライテスク) で15分間透過処理し、PBSで溶解した3%ウシ血清アルブミン (BSA : Sigma Aldrich) にて15分間室温下にてブロッキング後、一次抗体として Purified anti- Paxillin Antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA) をPBSで溶解した3% BSA にて1:100の濃度に希釈した溶液を用い、4°Cで一晩反応させた。次に二次抗体である Goat Anti-Mouse IgG Alexa 488 をPBSで溶解した3% BSA にて1:1,000の濃度に希釈した後、室温で1時間反応させた。Actin Red 555 Ready Probes 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加したPBSにて室温にて30分間反応させPBSで3回浸漬洗浄することによりアクチン線維を染色した。Nuc Blue Fixed Cell Ready Probes 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を添加したPBSにて5分間室温にて反応させPBSで3回浸漬洗浄することにより核を染色した。

405/450 nm, 488/520 nm, 561/595 nm (Ex/Em) にフィルターを設定した共焦点顕微鏡 (対物レンズ : 40倍, FV3000, OLYMPUS, 東京) を用いて観察を行った。

6. ライブイメージング, タイムラプス撮影

圧力刺激によるヒト歯根膜細胞の細胞骨格, 核への影響はライブイメージングを用

いて観察した。細胞骨格であるアクチン線維は SiR-Actin (Cytoskeleton, Denver, CO, USA), 核は Nuc Spot Live Cell Nuclear Stains 488 (Biotium, Fremont, CA, USA) を用いた。それぞれの試薬を培養液に 1 : 1,000 の濃度で添加し, カバーガラス上に播種した培養細胞を室温で 30 分間反応させた。その後, 480/535 nm, 535/590 nm (Ex/Em) にフィルターを設定した蛍光顕微鏡 (Ti2, Nikon, 東京) を用いて, 0.1 frame/sec の間隔で連続撮影した。

7. 画像解析

画像解析ソフト Image J (version 1.51, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて, 周期的伸展刺激によるヒト歯根膜細胞の配向性の変化の解析を行った。細胞の長軸方向と伸展刺激方向のなす角度の解析を行った。

静水圧刺激に関しては, 画像解析ソフト Fiji (version 1.0, NIH) を用いて, 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 の結果より, 細胞の形態変化の見られた時点の miRNA 発現解析を行った。伸展刺激においては刺激負荷 6 時間後の RNA を抽出し, 静水圧刺激においては刺激負荷 5 分間後に静置培養 1 時間後の RNA を抽出した。High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて RNA を抽出し, RNA の濃度と純度は, 吸光

度計 (Nano Drop 1000, Thermo Fisher Scientific) を用いて 260 nm と 280 nm の波長での吸光度とその比を用いて測定した。全ての RNA の純度は、260/280 値が 1.8~2.0 の間であることによって確認した。

マイクロアレイの実施は DNA チップ研究所 (東京) に依頼した。miRNA を含んだ total RNA を 100 ng 使用した。Sure Print G3 Human miRNA マイクロアレイ 8×60 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用い、Gene Expression Wash Pack (5188-5327: Agilent Technologies) を用いてハイブリダイゼーションおよび洗浄を行い、Agilent SureScan G4900DA で画像を取り込み、Feature Extraction Software (Agilent Technologies) で蛍光強度を数値化した。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 パーセント以上の変動係数 (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 値が 0.05 以下、Fold Change 値が 2 以上のサンプルのみを用いた。

結果

1. 伸展刺激による配向性への影響

シリコンチャンバー上に播種したヒト歯根膜細胞を伸展率 20%, 伸展頻度 20 回/分で 16 時間刺激を行った。図 4 は周期的伸展刺激を与えたヒト歯根膜細胞の位相差像を示す。コントロール群では細胞はランダムに配向していた (図 3a)。一方, 伸展刺激を与えたものは, 互いに並行方向かつ, 伸展刺激方向に対し斜めに配向した (図 3b)。配向性の変化を時系列で観察を行ったところ (図 4a), 伸展刺激開始 4 時間後から配向性に変化がみられた。角度解析を行ったところ, 伸展開始前は細胞の配向性に偏りは見られなかった。伸展刺激開始 6 時間後では $60^{\circ} \sim 75^{\circ}$ の分布が最も高くなることがわかった (図 4b)。伸展刺激による細胞骨格への影響を調べるため, 免疫染色を行った (図 5, 赤色: アクチン線維, シアン: 核, 緑: パキシリン)。細胞骨格であるアクチン線維は細胞長軸方向と平行に配向した。

2. 静水圧刺激による細胞形態への影響

カバーガラス上に播種したヒト歯根膜細胞に 10 MPa, 20 MPa, 40 MPa の静水圧刺激を 5 分間与えた。また, 静水圧刺激を除去した後, 5 分間の観察を行った (図 6A)。コントロール群では細胞形態に変化は見られなかった。10 MPa 刺激下でも, 細胞の形態変化は見られなかった。20 MPa 刺激下では, 細胞の短軸方向の長さの減少が見

られた。静水圧刺激除去後、細胞の短軸方向の長さの回復が見られた。長さ変化の解析を行ったところ、コントロール群、10 MPa 刺激下では長軸、短軸ともに長さの変化は見られなかった。20 MPa 刺激下は、短軸方向のみ約 70%まで減少し、静水圧刺激除去後は約 100%まで回復した。40 MPa 刺激下は、短軸方向のみ約 70%まで減少し、静水圧刺激除去後は約 90%まで回復した (図 6B,C)。細胞骨格であるアクチン線維に着目したところ、細胞の形態変化がみられた 20 MPa 刺激下でも、線維の崩壊は見られなかった (図 7)。次に核の形状に着目したところ、細胞の形態変化のみられた 20 MPa 刺激下では核の変形が見られなかったが、40 MPa 刺激下では核が収縮するような形態変化が見られた (図 8A)。本研究では核の面積変化を用いて核への静水圧刺激の影響の解析を行った。核の面積変化の解析を行ったところ、コントロール群、20 MPa の刺激下では面積変化は見られなかった。40 MPa 以上の静水圧刺激下では核の面積が約 70%まで減少した (図 8B)。

3. 伸展刺激による miRNA の発現量の変化

細胞の配向性に変化の見られた伸展刺激開始後 6 時間後の遺伝子発現量の変化を miRNA マイクロアレイにて測定した。コントロール群と伸展刺激群とを比較すると、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。(図 9, 表 1)。

4. 静水圧刺激による miRNA の発現量の変化

細胞の形態変化が見られた静水圧刺激開始後 5 分後の遺伝子発現量の変化を miRNA マイクロアレイにて測定した。静水圧刺激を 5 分間与え、1 時間大気圧下で静置培養を行った静水圧刺激群と 1 時間 5 分間大気圧下で静置培養を行ったコントロール群を比較すると、miRNA 発現量に統計的に有意な差はなかった (data not shown)。

考察

本研究では、ヒト歯根膜細胞を用いた *in vitro* 機械刺激負荷制御システムを用いて、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観察した。歯根膜には伸展刺激と圧力刺激が同時に加わっている。しかし、*in vitro* で伸展刺激と圧力刺激を同時に負荷するのは困難であったため、本研究では伸展刺激、圧力刺激それぞれについての影響を検証した。具体的には、*in vitro* 機械刺激負荷制御システムを用いて、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を調べることを目的に本研究を立案した。その結果、以下の二つを結果として得た。ヒト歯根膜細胞は、伸展刺激した場合、6時間後には伸展方向に対して $60^{\circ}\sim 75^{\circ}$ に配向した。また、静水圧刺激した場合、20 MPa 以上で細胞形態の変化を示し、40 MPa 以上で核形態の変化を示した。

ヒト歯根膜細胞は、伸展刺激の開始6時間後、伸展刺激方向に対して $60^{\circ}\sim 75^{\circ}$ に配向し、細胞は互いに並行で波形状に配向していた。一方、血管内皮細胞は、伸展刺激開始20分後に伸展刺激方向に対して垂直に配向するという報告がある¹¹⁾。また、ヒト包皮線維芽細胞は、伸展刺激開始8時間後に伸展刺激方向に対して $60^{\circ}\sim 70^{\circ}$ に配向するという報告がある¹²⁾。このように一軸方向の周期的な伸展刺激によって細胞の配向性に変化が見られるが、細胞種によって刺激に対する配向性の変化に影響がある

ことが示唆される^{13,14)}。生体内での歯根膜線維の走行は $50^{\circ}\sim 70^{\circ}$ であり、波形状に走行しているという報告²⁾がある。以上のことから、本研究に用いた *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。

静水圧刺激の5分後には、生理的圧力範囲である0.1 MPaと10 MPa刺激下では細胞の形態変化は見られなかったが、この範囲を超えた20 MPa以上の刺激下では短軸方向の長さのみ変化が見られた。この現象は、生理的な咬合力の範囲内では細胞の形態的な変化は生じず、生理的な範囲を超えた機械刺激により形態的な変化が生じたと考えられる。ヒト歯根膜細胞は細胞の長軸方向に大きなストレスファイバーを構築しているが、本計測では静水圧刺激によるストレスファイバーの崩壊は観察されなかった。細胞の静水圧刺激による短軸方向のみの収縮は、短軸方向の比較的小さなアクチン線維の崩壊が起因すると考える。また、細胞の形態変化が見られる静水圧刺激下でも核の変形は見られず、40 MPa以上の静水圧刺激下で核の変形がみられた。このことから、40 MPa以上の静水圧刺激が核形態に影響を与えることが示唆された。これまで静水圧下でのヒト歯根膜細胞の細胞形態変化を直接観察した研究はない。通常、核は細胞骨格によって囲まれて、それらの生じる張力によって細胞内では圧縮された形態となっており¹⁵⁾、機械刺激が細胞に加わると、細胞骨格を介して核に伝わると考

えられている^{16,17)}。細胞内部において、核周辺の細胞骨格は核膜表面を直接圧縮しつつ、核膜タンパク質を介して核と強固に結合している。さらに、細胞骨格は細胞内の核の形状や位置を安定化するとともに核膜直下の DNA 分布様態にも影響を与えている可能性がある。核内では核膜の裏打ちタンパクであるラミンが網目構造であるラミナを形成し、核膜とクロマチンを結合している¹⁸⁾。クロマチンは粘弾性に富んでいると考えられている¹⁹⁾。クロマチンは転写活性の低いヘテロクロマチン領域と、転写活性の高いユークロマチン領域とがあり、ヘテロクロマチン領域は比較的変形しにくく、核全体の形態や力学特性に大きな影響を与える可能性が高いと考えられている²⁰⁾。本研究では静水圧刺激によって細胞骨格の崩壊が生じ、核を圧縮していた張力が弱まり、核の変形が生じたと考えられる。

伸展刺激によって発現が有意に変化した miRNA は、調べた 58,338 種類のうち 45 個であった。伸展刺激によって、細胞外マトリクスの遺伝子発現量や骨芽細胞関連因子の遺伝子発現量が増加するという報告がある²¹⁻²³⁾。本研究では、これらの miRNA に有意な変化は検出されなかった。これらの報告と本研究の結果の違いは、伸展刺激の方向や刺激頻度の違いによるものかもしれない。一方、静水圧刺激に発現量に統計的に有意な変化のある miRNA は検出されなかった。圧力刺激のみで炎症性サイトカインの遺伝子発現量とタンパク質産生量が増加するという報告²⁴⁻²⁶⁾があるが、本研究

に用いたシステムでは変化のある miRNA は検出されなかった。これは静水圧刺激負荷時間が 5 分間と短いことや、静水圧刺激除去後の放置時間の差が影響していると考えられる。また、本研究に用いたシステムは、伸展刺激が周期的負荷であるのに対して、静水圧刺激は静的負荷であるため、miRNA の発現量の変化には周期的な静水圧刺激が重要となる可能性が考えられる。

本研究ではヒト歯根膜細胞を用いた *in vitro* 機械刺激負荷制御システムを用い、ヒト歯根膜細胞は静水圧刺激に対し、可逆的に変化することが見られた。しかし、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ため、細胞形態が回復する前に圧力刺激が加わることが考えられる。そのため、今後は周期的静水圧負荷に対する細胞応答の解析が早急に必要であるが、そのためには周期的静水圧負荷システムの開発が望まれる。また、炎症存在下での機械刺激による細胞の形態変化への影響や歯周病に罹患した患者から採取したヒト歯根膜細胞を用いた研究も進めたい。

結論

ヒト歯根膜細胞は、伸展刺激の6時間後に伸展方向に対して $60^{\circ}\sim 75^{\circ}$ に配向し、静水圧刺激の20 MPa以上で細胞形態が変化し、40 MPa以上で核形態をも変化した。このように伸展と圧縮といった機械刺激が、歯根膜に動態的および機能的影響を及ぼす状況の一端がわかった。

謝辞

稿を終えるにあたり，懇篤なる御指導，御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学分野，成瀬恵治教授，森松賢順助教，近畿大学理工学部，西山雅祥准教授に心より感謝いたします。そして主任教授であります岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に謹んで感謝の意を表します。また，様々な面にわたり，終始御指導賜り，貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生理学分野，ならびに歯周病態学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周
病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- ・ 生体医工学シンポジウム 2016 (2016年9月, 北海道, ポスターアワード受賞)
- ・ 第68回日本生理学会中国四国地方会 (2016年11月, 岡山)
- ・ The American Society for Cell Biology 2016 (2016年12月, サンフランシスコ)
- ・ The 9th International Meeting on Biomolecules under Pressure (2017年8月, 京都)
- ・ 第55回日本生物物理学会年会 (2017年9月, 熊本, 第2回日本生物物理学会学生

発表賞受賞)

- ・ The American Society for Cell Biology 2017 (2017年12月, フィラデルフィア)
- ・ The Biophysical Society 2018 (2018年2月, サンフランシスコ)
- ・ 第95回日本生理学会年会 (2018年3月, 香川)
- ・ 第57回日本生体医工学会大会 (2018年6月, 北海道)
- ・ 第56回日本生物物理学会年会 (2018年9月, 岡山)

- The 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (2018年9月, 静岡)
- 第61回日本歯周病学会秋季学術大会 (2018年10月, 大阪)
- 第70回日本生理学会中国四国地方会 (2018年10月, 愛媛)
- 第59回高圧討論会 (2018年11月, 岡山, ポスター賞受賞)
- The American Society for Cell Biology 2018 (2018年12月, サンディエゴ)

参考文献

- 1) 田口章太：歯周炎患者および健常者の咬合圧，咬合接触面積，咬合力に関する研究. 日歯周誌, **25**, 98-116, 1983.
- 2) 黒川博行：成人歯根膜の厚さと線維の走行方向. *Arch. histol. Jpn.*, **1**, 227-230, 1950.
- 3) 小池薫：ラット臼歯歯周組織におよぼす咬合機能喪失と回復の影響－病理組織学のおよび組織軽量学的検討－. 日歯周誌, **38**, 1-19, 1996.
- 4) Wada, N., Maeda, H., Tanabe, K., Tsuda, E., Yano, K., Nakamuta, H. and Akamine, A.. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: The factor is osteoprotegerin/ osteoclastogenesis inhibitory factor. *J. Periodontal Res.*, **36**, 56–63, 2001.
- 5) Garlet, T. P., Coelho, U., Silva, J. S. and Garlet, G. P. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur. J. Oral. Sci.*, **115**, 355–362, 2007.
- 6) Walker C.G., Ito, Y., Dangaria, S., Luan, X. and Diekwisch T. G. H. RANKL, osteopontin, and osteoclast homeostasis in a hyperocclusion mouse model. *Eur. J. Oral Sci.*, **116**, 312–318, 2008.
- 7) Barton, G.M. and Medzhitov, R.: Control of adaptive immune response by Toll-like

- receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, **14**, 380-383, 2002
- 8) Anderson, K.L., and Norton, L.A.: A Device for the application of known simulated orthodontic forces to human cells *in vitro*. *J. Biomechanics.*, **24**, 649-654, 1991.
 - 9) Yousefian, J., Firouzian, F., Shanfeld, J., Ngan, P., Lanese, R. and Davidovitch, Z.: A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, **108**, 402-409, 1995
 - 10) Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y., and Shi, S.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, **364**, 149-155, 2004.
 - 11) Naruse, K., Sai, X., Yokoyama, N. and Sokabe, M.: Uni-axial cyclic stretch induces c-src activation and translocation in human endothelial cells via SA channel activation. *FEBS Lett.*, **441**, 111–115, 1998.
 - 12) Tremblay, D., Chagnon-Lessard, S., Mirzaei, M., Pelling, A. E. and Godin, M.: A microscale anisotropic biaxial cell stretching device for applications in mechanobiology. *Biotechnol. Lett.*, **36**, 657–665, 2014.
 - 13) Nishiyama, M., Kimura, Y., Nishiyama, Y. and Terazima, M.: Pressure-induced changes in the structure and function of the kinesin-microtubule complex. *Biophys. J.*, **96**. 1142-

1150, 2009.

- 14) Neidlinger-Wilke C, Groot, E., Claes L. and Brand R.: Fibroblast orientation to stretch begins within three hours. *J. Orthop Res.*, **20**, 954–956, 2002.
- 15) Nagayama, K. and Matsumoto T.: Contribution of actin filaments and microtubules to quasi-in situ tensile properties and internal force balance of cultured smooth muscle cells on a substrate. *Amer J Physiol Cell Physiol.*, **295**, 1569-1578, 2008.
- 16) Crisp, M., Liu, Q., Roux K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, D. P. and Hodzic, D.: Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol.*, **172**, 41-53, 2006
- 17) Razafsky, D. and Hodzic, D.: Brinking KASH under the SUN: the many faces of nucleocytoplasmic connections. *J Cell Biol.*, **186**, 461-472, 2009.
- 18) Prokocimer, M., Davidovich, M., Nissim-Rafinia, M., Wiesef-Motiuk, N., Bar, D. Z., Barkan, R., Meshorer, E. and Gruenbaum, Y.: Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. *J Cell Mol Med.*, **13**, 1059-1085, 2009.
- 19) Pajeroski, J. D., Dahl, K. N., Zhong, F. L., Sammak, P. J. and Discher, D. E.: Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **104**, 15619-15624, 2007.

- 20) Mazumder, A. and Shivashankar, G. V.: Emergence of a prestressed eukaryotic nucleus during cellular differentiation and development. *JR Soc Interface.*, **7**(Suppl3), S321-S330, 2010.
- 21) Ma, J., Zhao, D., Wu, Y. and Xu, C.: Cyclic stretch induced gene expression of extracellular matrix and adhesion molecules in human periosontal ligament cells. *Arch Oral Biol.*, **60**, 447–455, 2015.
- 22) Yamashiro, K., Myokai, F., Hiratsuka, K., Yamamoto, T., Senoo, K., Arai, H., Nishimura, F., Abiko, Y. and Takashiba, S.: Oligonucleotide array analysis of cyclic tension-responsive genes in human periodontal ligament fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.*, **39**, 910–921, 2007.
- 23) Yang, Y., Yang, Y., Li, X., Cui, L., Fu, M., Rabie, A. B. and Zhang, D.: Functional analysis of core binding factor a1 and its relationship with related genes expressed by human periodontal ligament cells exposed to mechanical stress. *Eur J Orthodont.*, **32**, 698–705, 2010.
- 24) Chien, C. H., Otsuki, S., Chowdhury, S. A., Kobayashi, M., Takahashi, K., Kanda, Y., Kunii, S., Sakagami, H. and Kanegae, H.: Enhancement of cytotoxic activity of sodium fluoride against human periodontal ligament fibroblasts by water pressure. *In Vivo*

(*Brooklyn*)., **20**, 849–856, 2006.

- 25) Nishigaki, M., Yamamoto, T., Ichioka, H., Honjo, K. I., Yamamoto, K., Oseko, F., Kita, M., Mazda, O. and Kanamura, N.: B-Cryptoxanthin regulates bone resorption related-cytokine production in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.*, **58**, 880–886, 2013.
- 26) Yamamoto, T., Kita, M., Kimura, I., Oseko, F., Terauchi, R., Takahashi, K., Kubo, T. and Kanamura, N.: Mechanical stress induces expression of cytokines in human periodontal ligament cells. *Oral Dis.*, **12**, 171–175, 2006.

図の説明

図 1. 伸展刺激装置

a : ShellPa Pro を使用して、伸展率 20%、伸展頻度 20 回/分で伸展刺激を負荷した。

b : ストレッチチャンバーに 0.3 mg/mL Cellmatrix® Type I-C をコーティングし、ヒト歯根膜細胞を播種し a の装置を用いて周期的伸展刺激を負荷した。

図 1. 静水圧刺激装置

A : 静水圧刺激装置。ユニパック® (ポリエチレン製) に細胞を封入し、静水圧負荷装置内に入れ、ハンドポンプを用いて静水圧を負荷した。

B : 高圧顕微鏡。細胞を高圧チャンバー内に入れ、静水圧刺激下での細胞形態をリアルタイムで計測した。: ShellPa Pro を使用して、伸展率 20%、伸展頻度 20 回/分で伸展刺激を負荷した。

図 3. 伸展刺激によるヒト歯根膜細胞の配向性への影響

ヒト歯根膜細胞に伸展刺激 (伸展率 20%、伸展頻度 20 回/分) を 16 時間負荷した。

a はコントロール群、b は伸展刺激群の位相差像を示す。a では細胞はランダムに配向していた。一方、b では互いに並行方向かつ、伸展刺激方向に対し $60^{\circ} \sim 75^{\circ}$ に配向

した。独立した 3 回の実験の典型像である。矢印は伸展刺激方向を，スケールバーは 200 μm を示す。

図 4. 伸展刺激によるヒト歯根膜細胞の配向性への変化解析

伸展刺激（伸展率 20%，伸展頻度 20 回/分）によるヒト歯根膜細胞の配向性の変化を時系列で観察し，Image J を用いて角度解析を行った。

a：伸展刺激による細胞の配向性の変化を観察した位相差像を示す。伸展刺激開始 4 時間後から配向性に変化がみられた。独立した 3 回の実験の典型像であり，矢印は伸展刺激方向を，スケールバーは 200 μm を示す。

b：a の位相差像を Image J を用いて，細胞の長軸方向と伸展刺激方向のなす角度の解析を行った。伸展開始前は細胞の配向性に偏りは見られなかった。伸展刺激開始 6 時間後に $60^{\circ}\sim 75^{\circ}$ の分布が高くなることがわかった。独立した 3 回の実験の解析結果の平均値を示す。

図 5. 伸展刺激によるヒト歯根膜細胞の細胞骨格への影響

ヒト歯根膜細胞に伸展刺激（伸展率 20%，伸展頻度 20 回/分）を 16 時間負荷し，細胞骨格の変化を免疫染色法を用いて調べた。

a はコントロール群, b は伸展刺激群の免疫染色像を示す。細胞骨格であるアクチン線維は細胞長軸方向と平行に配向した。矢印は伸展刺激方向を, スケールバーは 200 μm を示す。赤色 : アクチン線維, シアン : 核, 緑 : パキシリン

図 6. 静水圧刺激によるヒト歯根膜細胞の形態変化への影響

静水圧刺激によるヒト歯根膜細胞の形態変化を調べるため, 高圧顕微鏡を用いてタイムラプス撮影を行った。

A : カバーガラス上に播種したヒト歯根膜細胞を静水圧刺激下で観察した位相差像を示す。10 MPa, 20 MPa, 40 MPa の静水圧刺激を 5 分間与えた。コントロール群は大気圧 (0.1 MPa) を用いた。また, 静水圧刺激を除去した後, 5 分間の観察を行った。

0.1 MPa では細胞形態に変化は見られなかった。10 MPa 刺激下でも, 細胞の形態変化は見られなかった。20 MPa の刺激下では, 細胞の短軸方向の長さの減少が見られた。

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。独立した 3 回の実験の典型像である。スケールバーは 50 μm を示す。

B : 長軸方向, 短軸方向の計測方法を示す。細胞の長軸方向のほぼ中央部分の長さと短軸方向のほぼ中央部分の長さを計測し, 長さ変化の解析に用いた。

C : 静水圧刺激によるヒト歯根膜細胞の形態変化への影響を調べるため, Fiji を用い

て細胞の長軸方向，短軸方向の長さ変化の解析を行った。10 MPa 刺激下では長軸，短軸ともに長さの変化は見られなかった。20 MPa 刺激下では，短軸方向のみ約 70%まで減少し，静水圧刺激除去後は約 100%まで回復した。40 MPa 刺激下では，短軸方向のみ約 70%まで減少し，静水圧刺激除去後は約 90%まで回復した。独立した 3 回の実験の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す。

図 7. 静水圧刺激によるヒト歯根膜細胞の細胞骨格への影響

静水圧刺激のヒト歯根膜細胞の細胞骨格への影響をライブイメージングで観察した。細胞の形態変化がみられた 20 MPa 刺激下でも，細胞骨格であるアクチン線維の崩壊は見られなかった。独立した 3 回の実験の典型像である。スケールバーは 50 μm を示す。

図 8. 静水圧刺激によるヒト歯根膜細胞の核変形への影響

静水圧刺激によるヒト歯根膜細胞の形態変化を調べるため，高圧顕微鏡を用いてライブイメージングで観察した。

A：静水圧刺激のヒト歯根膜細胞の核変形への影響をライブイメージングで観察した。20 MPa 刺激下では核の変形が見られなかった。40 MPa 刺激下で核が収縮するよ

うな形態変形が見られた。独立した 3 回の実験の典型像である。スケールバーは 50 μm を示す。

B: 静水圧刺激による核変形への影響を調べるため, Fiji を用いて核の面積変化の解析を行った。20 MPa 以下の静水圧刺激では面積に変化は見られなかった。40 MPa 以上の静水圧刺激では核の面積が約 70%まで減少した。独立した 3 回の実験を行い, 1 回の実験で 10 細胞の核を解析対象とした。エラーバーは標準偏差を示す。

図 9. 伸展刺激によって発現量に変化のあった miRNA

miRNA マイクロアレイで得られたデータを基に解析ソフト Gene Spring を使用して作成した Scatter Plot を示す。実験で得られたデータの正規化処理後, 20 パーセント以上の発現量, 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 値が 0.05 以下, Fold Change 値が 2 以上のサンプルのみを用いた。独立した 3 回の実験によって得られたサンプルを解析した。

縦軸は伸展刺激群において増減した miRNA 発現量を, 横軸はコントロール群における miRNA 発現量を対数表記で示す。グラフの中心 45°を表す線は Ratio=1 を指

し、上下に平行移動した2本の線は2倍以上の発現を表す。

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。

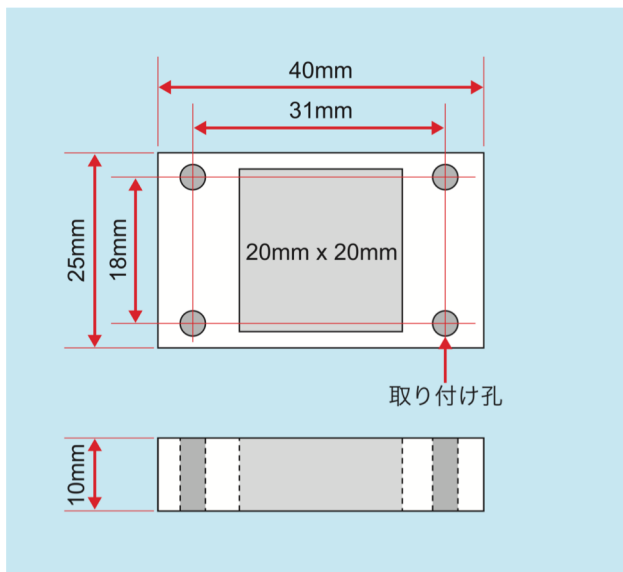
表 1. 伸展刺激によって発現量に変化のあった miRNA

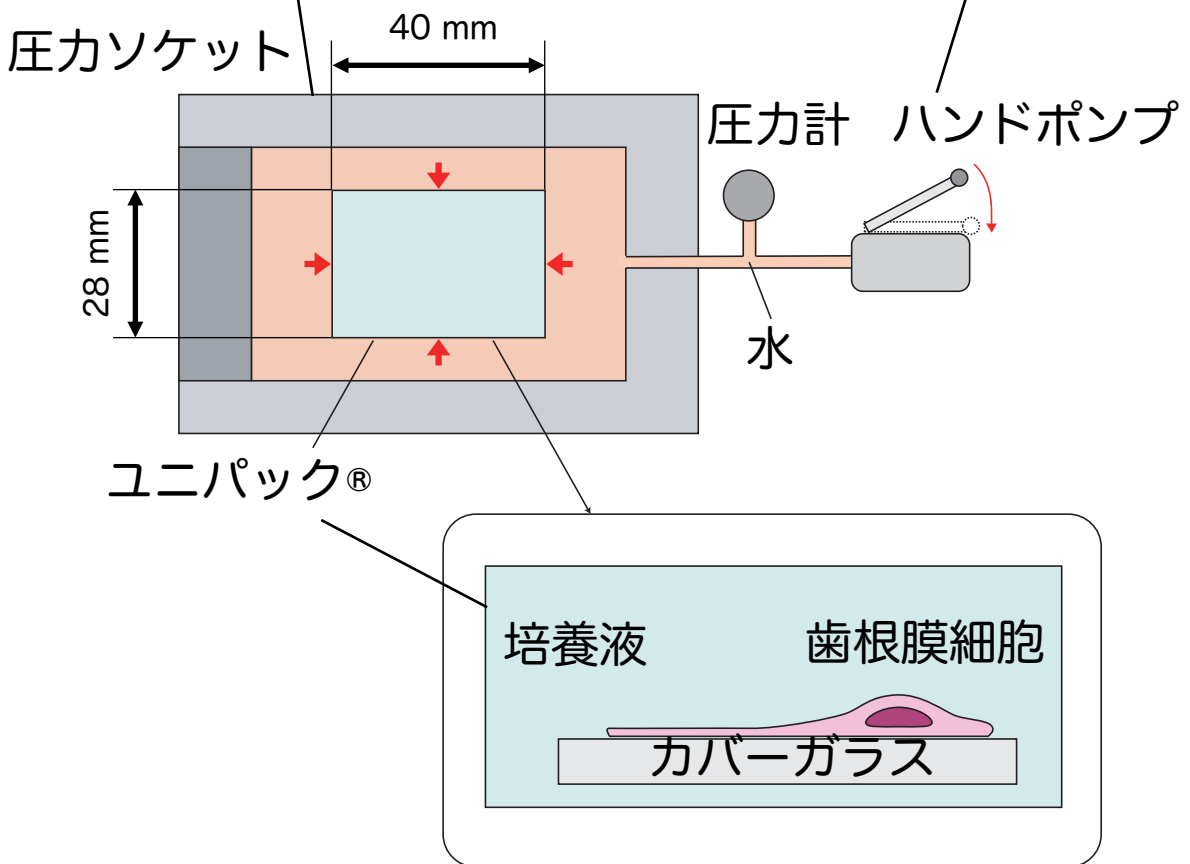
伸展刺激によって発現量に変化のあった miRNA を示す。

a



b





高圧チャンバー

7 mm

セパレーター

圧力計 ハンドポンプ

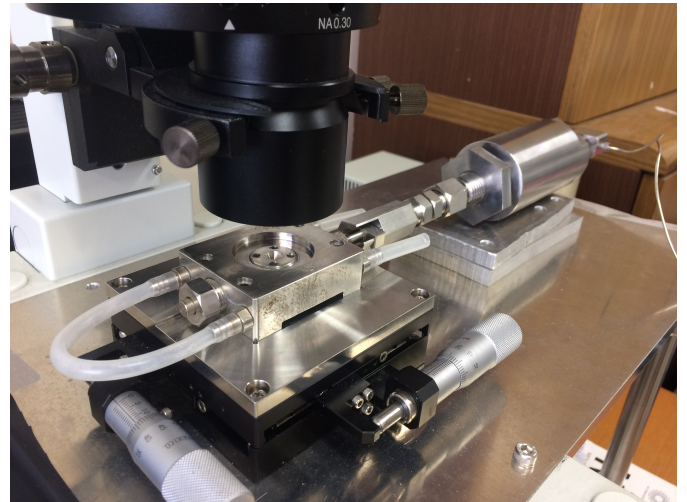
培養液

水

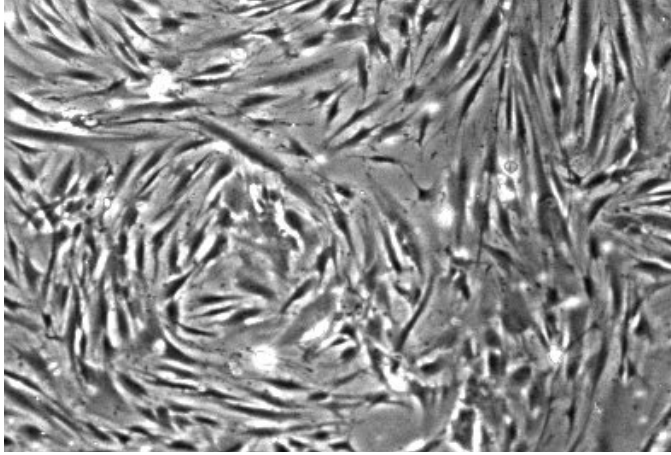
対物レンズ

培養液 歯根膜細胞

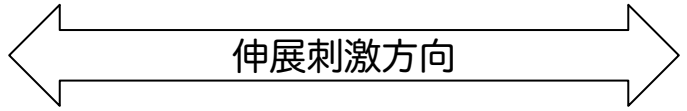
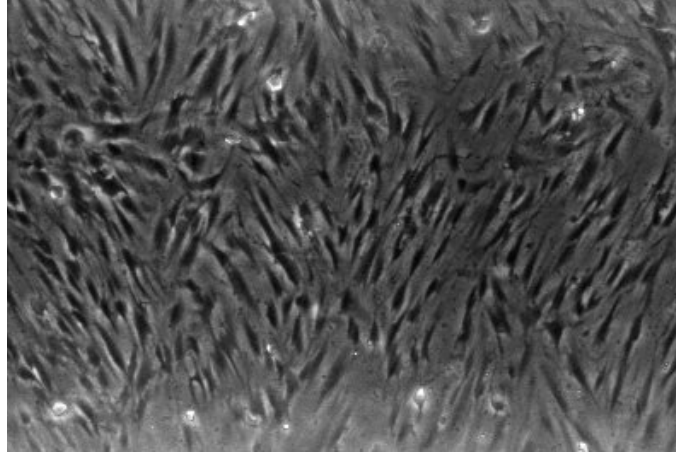
カバーガラス

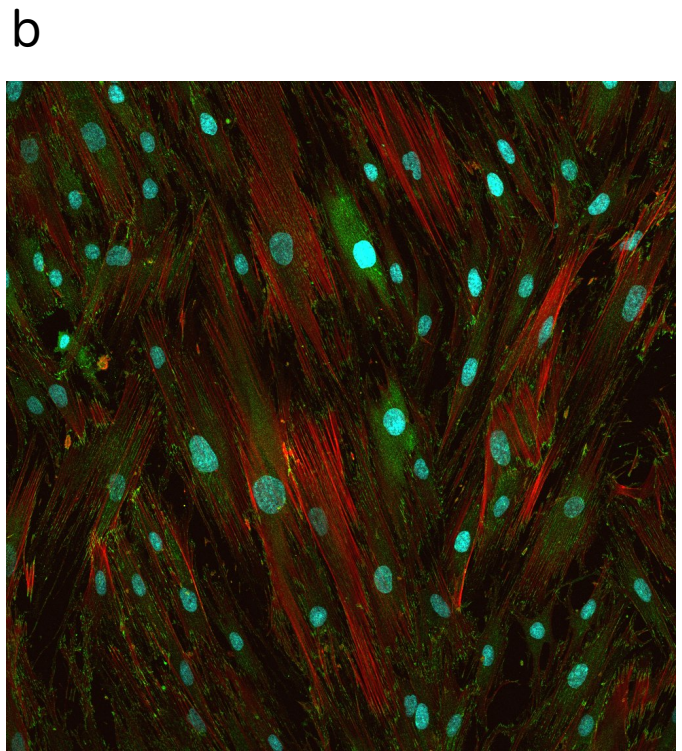
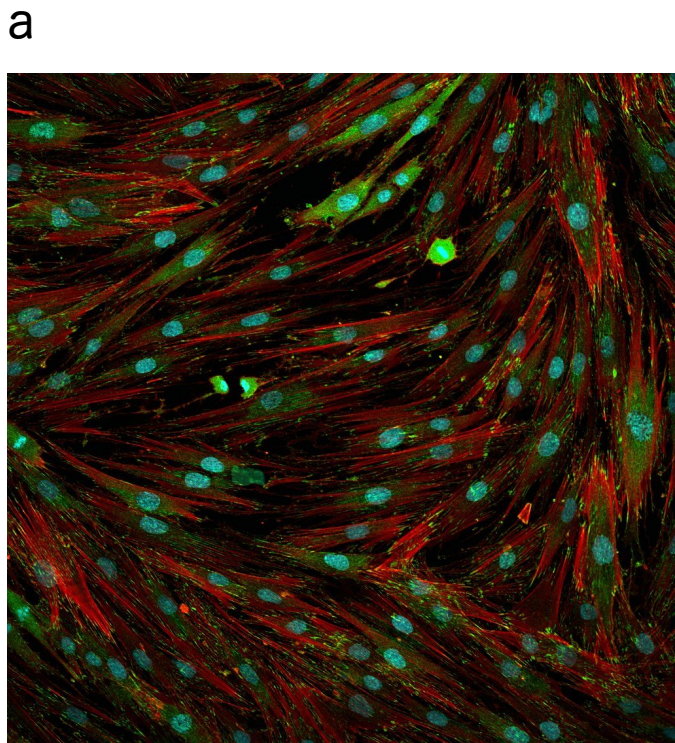


a



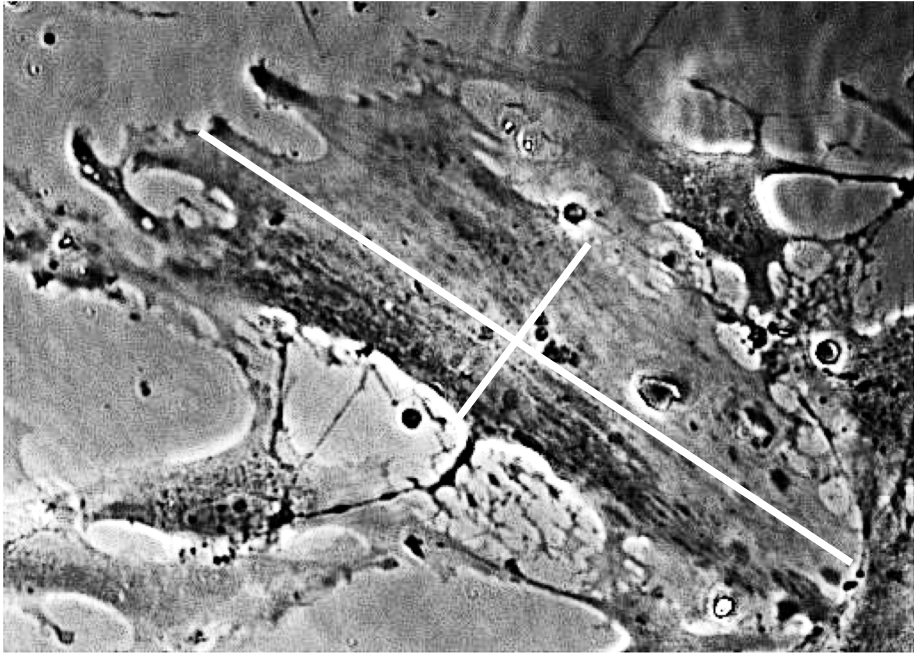
b

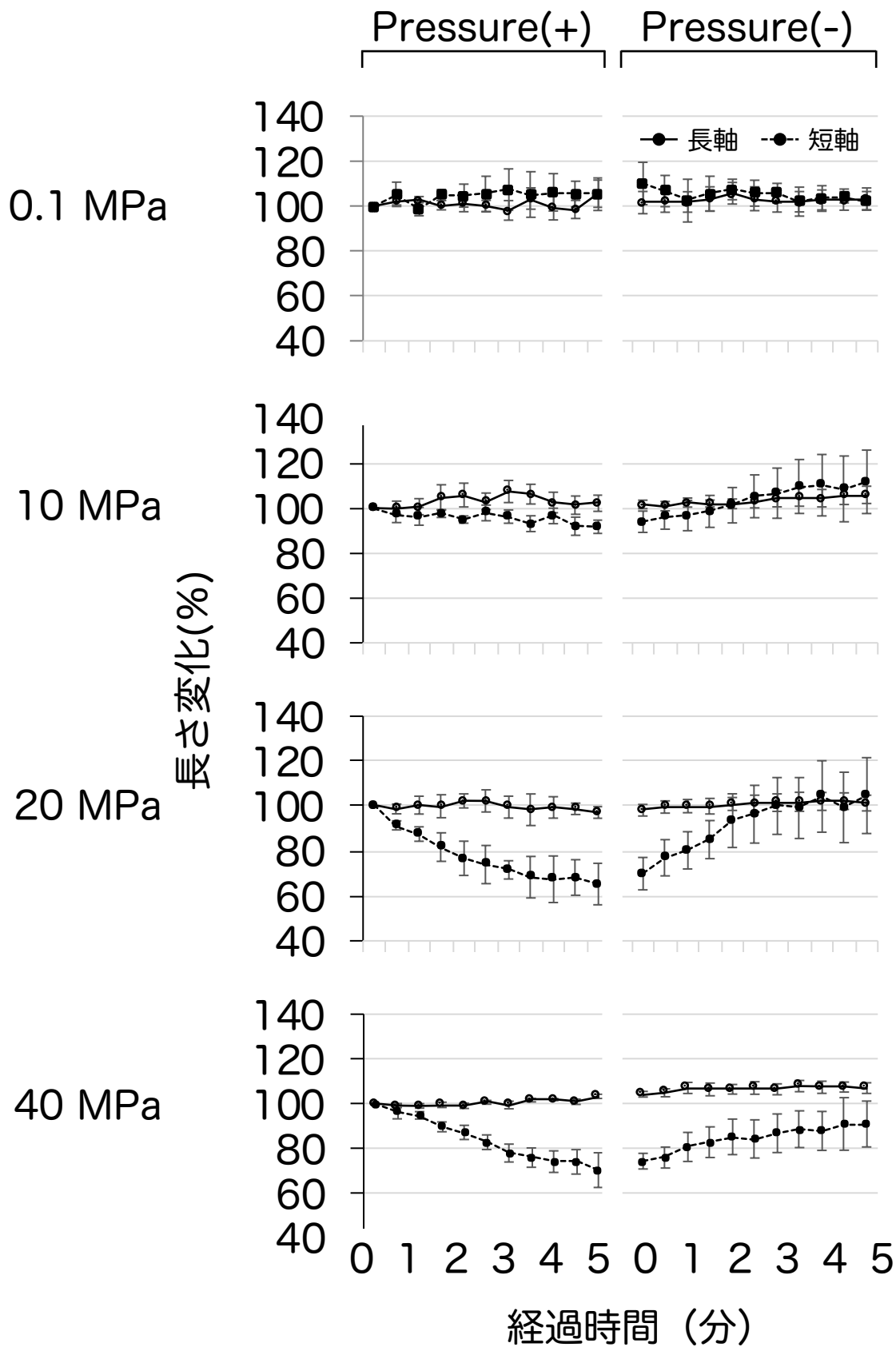




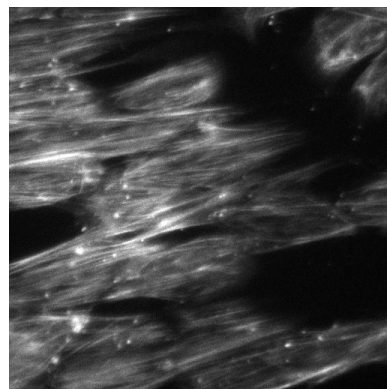
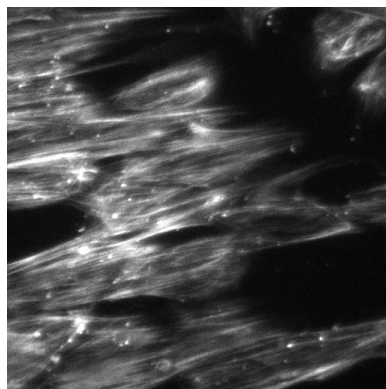
伸展刺激方向

Actin (Alexa 555), Nuclei (DAPI), Paxillin (Alexa 488)

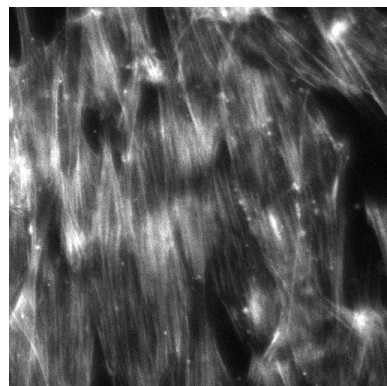
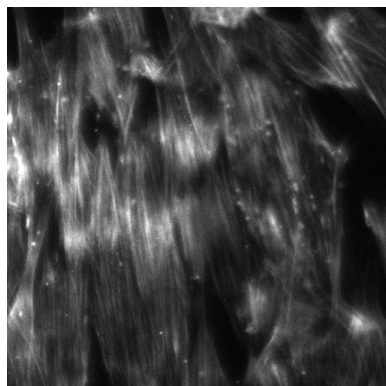




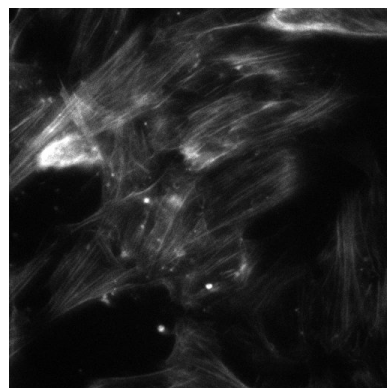
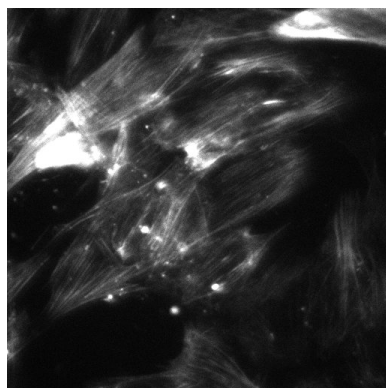
0.1 MPa



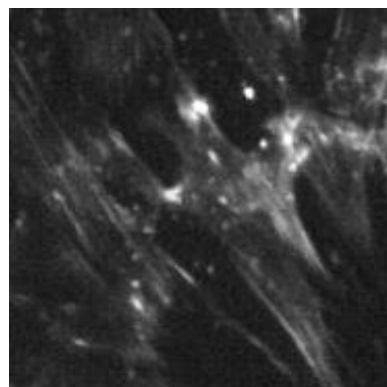
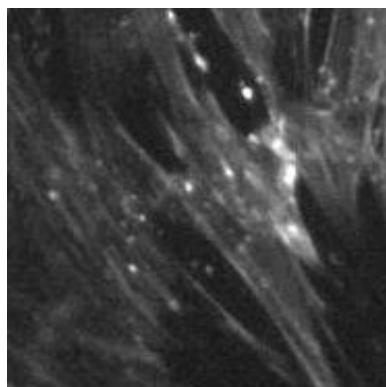
10 MPa



20 MPa



40 MPa



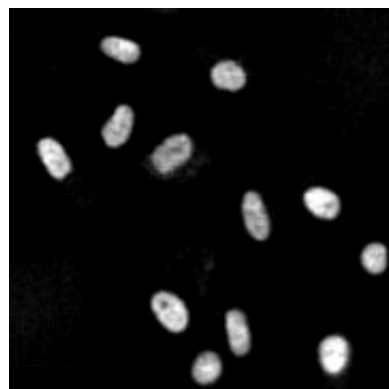
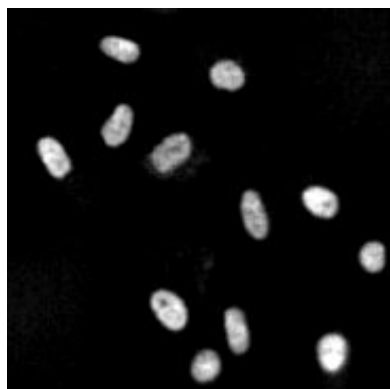
0

5

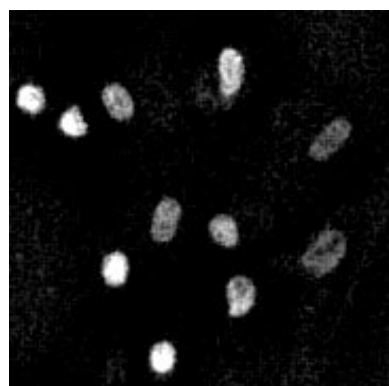
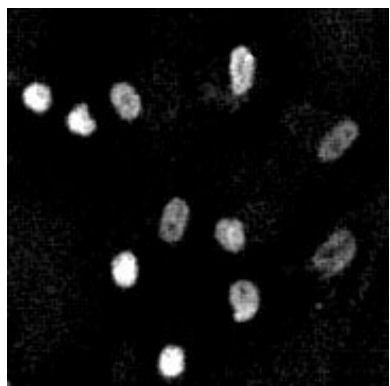


経過時間 (分)

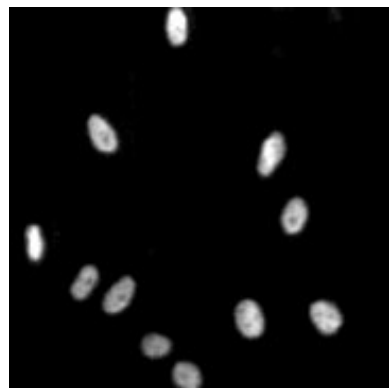
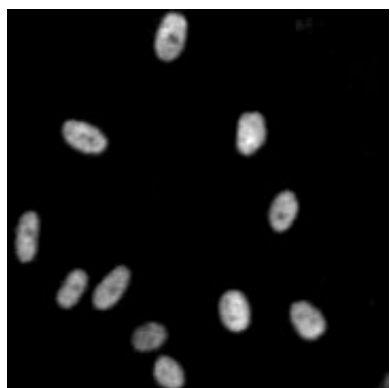
0.1 MPa



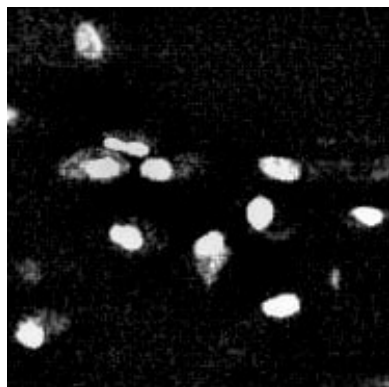
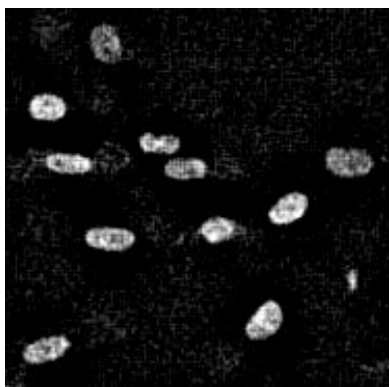
20 MPa



40 MPa



60 MPa

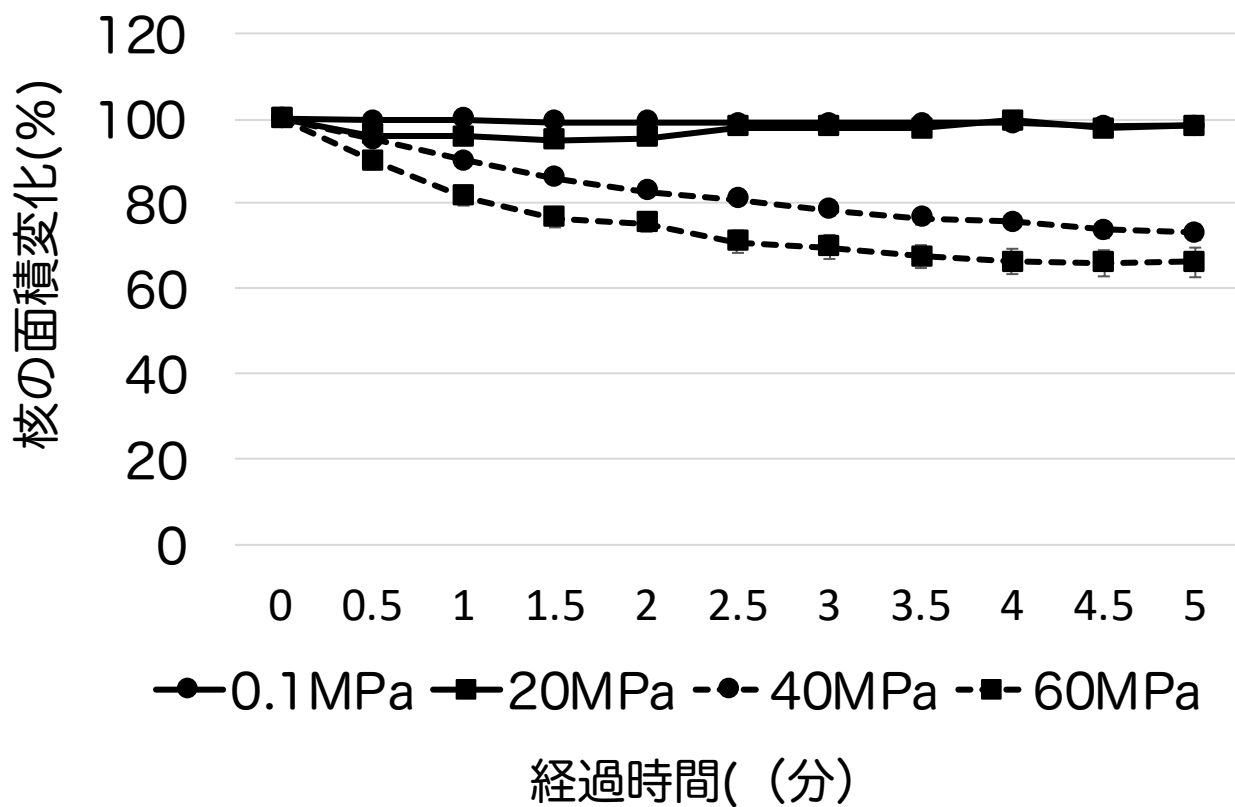


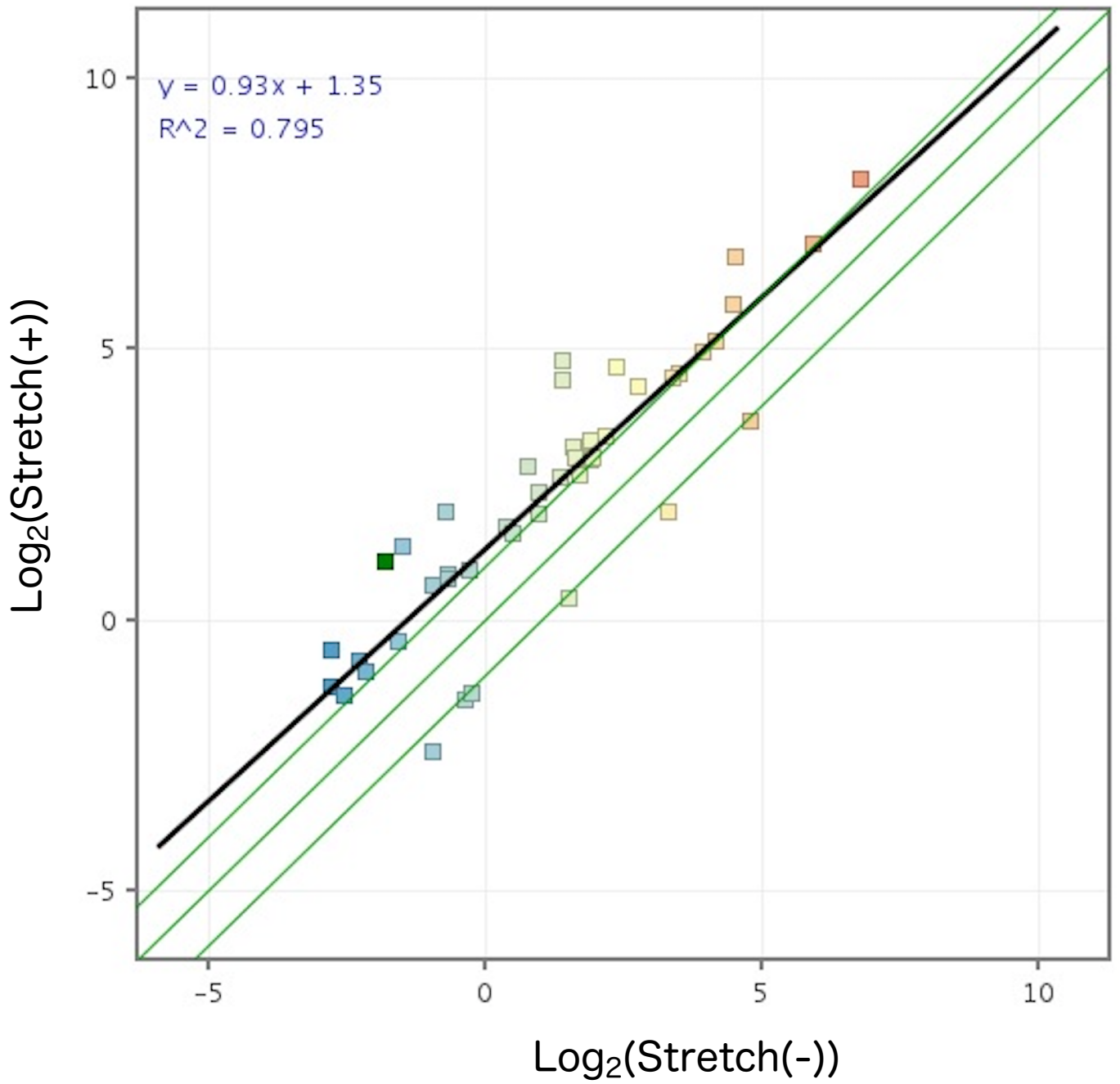
0

5



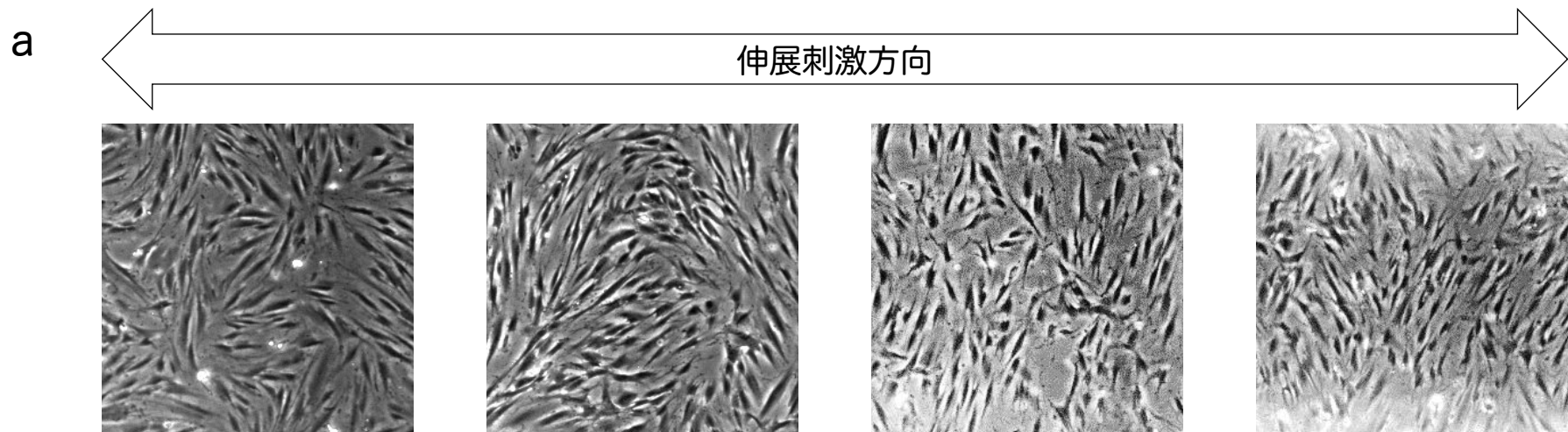
経過時間 (分)





| ProbeName | FC ([stretch] vs [control]) | GeneSymbol |
|----------------|-----------------------------|--------------|
| A_23_P91390 | 11.017608 | THBD |
| A_24_P10137 | 8.531056 | RGCC |
| A_21_P0013154 | 7.7263556 | |
| A_23_P85209 | 7.7007704 | IL13RA2 |
| A_23_P58009 | 6.893159 | C3orf52 |
| A_24_P140608 | 5.1048527 | HBEGF |
| A_32_P202013 | 5.0034356 | FAM196A |
| A_23_P6771 | 4.826655 | LMCD1 |
| A_23_P73097 | 4.3181477 | RGS20 |
| A_23_P206280 | 3.2305298 | GPR56 |
| A_23_P77859 | 3.1277168 | TMEM88 |
| A_23_P61180 | 3.1054373 | PLCXD1 |
| A_21_P0014217 | 3.1002085 | |
| A_24_P942630 | 3.037444 | KDM6B |
| A_24_P125871 | 2.98486 | RIPK4 |
| A_23_P103775 | 2.8091657 | LRRRC8C |
| A_23_P26124 | 2.7558327 | RORA |
| A_24_P261259 | 2.7419186 | PFKFB3 |
| A_23_P13772 | 2.7244964 | TBX3 |
| A_23_P166248 | 2.7008197 | RCAN1 |
| A_23_P202104 | 2.6805706 | PPIF |
| A_23_P383819 | 2.660374 | TBX3 |
| A_32_P59302 | 2.5119288 | HIVEP3 |
| A_23_P216966 | 2.4696155 | PTGS1 |
| A_32_P54503 | 2.4112499 | JHDM1D-AS1 |
| A_23_P334870 | 2.3982484 | TMEM217 |
| A_21_P0005293 | 2.3378887 | |
| A_32_P105549 | 2.32637 | ANXA8L1 |
| A_23_P22134 | 2.228575 | BNC1 |
| A_23_P410965 | 2.2007117 | KIAA1522 |
| A_24_P876408 | 2.1915617 | C11orf95 |
| A_33_P3317580 | 2.1712015 | GFRA2 |
| A_23_P31896 | 2.1637428 | ST3GAL1 |
| A_23_P82868 | 2.138202 | PLAT |
| A_23_P214876 | 2.1132765 | JARID2 |
| A_32_P74409 | 2.0944448 | C11orf96 |
| A_23_P126266 | 2.0703673 | HLX |
| A_24_P38143 | 2.06579 | AHI1 |
| A_23_P137016 | 2.057063 | SAT1 |
| A_24_P941167 | -2.0233696 | APOL6 |
| A_33_P3258346 | -2.0372221 | XAF1 |
| A_23_P218079 | -2.0836608 | SLC38A2 |
| A_24_P20746 | -2.0907383 | PRR16 |
| A_23_P83579 | -2.358245 | ARNT2 |
| A_22_P00006752 | -2.6780512 | LOC101928245 |

表1



0 時間

2 時間

4 時間

6 時間

b

