

〔学位論文〕

ヒト歯根膜由来線維芽細胞の伸展刺激に対する
fibrillin-1およびversicanの発現変化

永坂 萌

北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科 口腔構造・機能発育学系 歯科矯正学分野

Effect of stretching stimulus on fibrillin-1 and versican expression
in human periodontal ligament fibroblasts

Moe NAGASAKA

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Key words : Fibrillin-1, Versican, Mechanical stress, Human periodontal ligament fibroblast

緒 言

歯根膜は線維性結合組織であり、絶えず咬合力などの機能にさらされている。この組織の主な細胞外基質の一つである弾性系線維は歯周組織、大動脈、肺、皮膚などに広く分布し、組織に弾性と柔軟性を付与し、組織の反復性復位（伸展と収縮の繰り返し）を可能としている。また、弾性系線維の一つで歯根膜に存在するオキシタラン線維はミクロフィブリルのみからなり、そのミクロフィブリルは主にfibrillin-1から構成されている。歯根膜でのオキシタラン線維は、主線維であるコラーゲン線維に直行するように配列しており、ブリッジの支台歯としての使用などメカニカルストレスの負荷により、また矯正力の負荷により、太くなり増加することが報告されている。一方、プロテオグリカンの一種であるversicanは、線維芽細胞から産生され、脳、軟骨、大動脈、皮膚、腱などに分布し、組織の形態維持、細胞増殖、細胞接着、細胞遊走などの機能に関与している。

近年では、fibrillin-1におけるversicanの結合領域に生じる*FBNI*の変異がMarfan症候群の重症型をもたらしくことも報告されており、結合組織における弾性系線維とversicanの密接な関係が注目されてきている。しかしながら、常に機能にさらされている歯根膜におけるfibrillin-1とversicanの動態変化についての研究は少なく不明な点が多い。

本研究では、歯根膜のメカニカルストレス応答機構を明らかにするために、ヒト歯根膜由来線維芽細胞に伸展刺激を加え、fibrillin-1とversicanの動態変化について免疫組織化学的、分子生物学的に検討した。

実験材料と方法

1. ヒト歯根膜由来線維芽細胞（HPLF）の培養系

細切された歯根膜組織はプラスチックシャーレ上に置き、10%新生仔牛血清を添加したminimum essential medium（MEM：ペニシリン100units/ml、ストレプトマイシン100μg/ml、L-グルタミン含有）中で37℃、5%CO₂環境下にて培養し、HPLFとして単離した。

2. 周期的伸展状態を負荷したHPLF培養

I型コラーゲンをコーティングしたエラスティックシリコンチャンバー上にHPLFを播種した。7日間培養後、伸展幅4%、頻度は1秒間に1往復の設定で37℃、5%CO₂の培養環境下にて7日間伸展刺激を負荷した。

3. Fibrillin-1とversicanの免疫蛍光染色

各HPLFサンプルを、fibrillin-1およびversicanに対する抗体で室温にてそれぞれ60分間反応させ、その後各々に対する二次抗体で40分間反応させた。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

4. Fibrillin-1とversicanのmRNA発現

各HPLFサンプルからtotal RNAを抽出し、RT反応を行い、TaqMan probeによるRT-PCR法を行った。結果は比

受付：平成24年10月1日

較Ct法により相対定量し、統計学的有意差はStudent's t-testを用いて検定した。

5. Small interference RNA (siRNA) 設計と一過性形質転換

ヒトfibrillin-1に対するsiRNAを設計・合成し、HPLFに導入した。siRNAの導入は培養の1日目と4日目に行い、培養7日目にHPLFを回収した。

結 果

1. 周期的伸展刺激負荷によるHPLFのfibrillin-1とversicanの動態変化

伸展培養したHPLFでは、fibrillin-1の緑色蛍光強度は対照群と大きな差異を認めなかったが、網目状構造が大きさを増して観察された。また、versicanの α -domainと β -domainの伸展刺激実験群の蛍光強度は対照群に比べて明らかに増していた。そして周期的伸展刺激の結果、fibrillin-1のmRNAは対照群と比較して3.6倍、versicanのmRNAは6.8倍に増強した。また、V0では対照群に対して17.8倍、V1は9.6倍、V3は8.7倍に増強した。

2. siRNAによるfibrillin-1の発現抑制実験

免疫組織化学的観察では、fibrillin-1とversicanの α -domainと β -domainの蛍光強度は、対照群とscrambled order群との間に差異を認めなかった。一方、実験群ではfibrillin-1とversicanの α -domainと β -domainの凝集は緩くなり、蛍光強度もやや低下していた。また、siRNAの導入7日後にfibrillin-1のmRNA発現は対照群およびscrambled order群の発現の約34%にまで激減した。一方、versicanのmRNA発現には、siRNAの導入は対照群とscrambled order群に影響を与えなかった。

考 察

今回の実験では、免疫組織化学的観察から、fibrillin-1とversicanの α -domainと β -domainが全般的に共局在した。そして、周期的伸展刺激の負荷はversicanの α -

domainと β -domainの蛍光強度を増大させた。このことから、伸展刺激がfibrillin-1よりもversicanの発現を増強させることが示唆され、実際fibrillin-1に比較してversicanのmRNA発現を著しく増強した。従って、伸展刺激を受けて歯根膜由来線維芽細胞は、versicanのもつヒアルロン酸結合能力を介して、大きい保水容量をもつヒアルロンリッチマトリックスにマイクロフィブリル(fibrillin-1)を結合させ、歯根膜組織に弾性を与えると推測される。

一方、versican isoformのmRNA発現の検討では、周期的伸展刺激はV0のmRNA発現を17.8倍に、V1とV3のmRNA発現を約9倍に増強した。これは、伸展刺激によるversicanの発現増強においてV0がその主体をなすと推測される。

さらに、fibrillin-1のmRNA発現抑制により、fibrillin-1と共にversicanの α -domainと β -domainの免疫蛍光強度も減弱した。しかし、fibrillin-1のmRNAの相対的発現は減弱したのに対して、versicanのmRNAの相対的発現に変化はほとんどみられなかった。これに関して、fibrillin-1は弾性系線維におけるversicanのリガンドとして考えられていることから、fibrillin-1からなるマイクロフィブリル束の凝集の低下の結果として、相当の発現をしているversicanがfibrillin-1に結合されていないことが示唆される。従って、fibrillin-1とversicanは歯根膜の特に弾性系線維を構成するうえで極めて密接な関係にあることを示している。

結 論

本研究で、伸展刺激のようなメカニカルストレスに対してヒト歯根膜由来線維芽細胞はfibrillin-1とversicanのような歯根膜に特徴的な形質発現を増強し、咬合荷重などの継続的な機能力は弾性と柔軟性を伴う歯根膜特有の機能を維持するために重要であることが明らかとなった。



永坂 萌

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

平成19年3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成24年3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程修了

平成24年4月 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野
任期制助手