

| | |
|-----------|---|
| Title | Expressions of RANKL and OPG mRNA on Rat Periodontal Ligament Cells Following Heavy Mechanical Stress |
| Author(s) | 成瀬, 晋一 |
| Journal | 歯科学報, 111(1): 106-107 |
| URL | http://hdl.handle.net/10130/2322 |
| Right | |

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | なる 成 瀬 晋 一 (愛知県) |
| 学位の種類 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 第1842号(甲第1113号) |
| 学位授与の日付 | 平成21年3月31日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位論文題目 | Expressions of RANKL and OPG mRNA on Rat Periodontal Ligament Cells Following Heavy Mechanical Stress |
| 掲載雑誌名 | 日本外傷歯学会雑誌 第5巻 1号 10~17頁 2009年 |
| 論文審査委員 | (主査) 井上 孝教授 (副査) 山田 了教授 末石 研二教授 下野 正基教授 |

論文内容の要旨

1. 研究目的

歯根膜はセメント質と歯槽骨の間に存在し、咬合時や咀嚼時に生じるメカニカルストレスに対する緩衝作用として働いている。外傷性咬合や強い矯正力は歯根膜の恒常性を破壊し、歯槽骨や歯根の吸収、あるいはアンキローシスなどを引き起こすことが知られている。これらの事象には破骨細胞が関与している。破骨細胞の分化制御には Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) や osteoprotegerin (OPG) が関与し、歯牙移動に関して弱い力では歯根膜から RANKL と OPG が発現し恒常性が維持されることが報告されている。また、外傷性咬合などの強い力に対する歯根膜の反応について *in vivo* における報告では外傷性咬合が RANKL の発現を促し、破骨細胞の活性化の一因となるとの報告がある。しかし歯根膜線維芽細胞において強い力に対する RANKL, OPG の発現を検索したものはない。本論文は強いメカニカルストレスとして遠心力を用い、培養歯根膜細胞が産生する破骨細胞分化に関与する因子について分子生物学的な検討を報告したものである。

2. 研究方法

体重約100gの Sprague-Dawley 系、雄性ラットの上顎門歯より採取した歯根膜を初代培養し、増殖した線維芽細胞様細胞を実験に使用した。3継代後の細胞 5×10^4 個を35mm 培養皿上に播種し、 α -MEM に10%FBS および0.6%Gentamicin を加えた培養液で37℃、5%CO₂条件下にて2日間培養した。その後、遠心機(Hitachi: CT6D)にて4800rpm の遠心力を20分間付与した。遠心力を付与しないものを対照群とした。その後、細胞数の変化、細胞接着の動態と RANKL と OPG の発現をみるために蛍光免疫染色および定量 RT-PCR (7500Fast Real-time PCR system, Applied Biosystems) を行った。観察期間は遠心力付与後1, 2, 3および5日後とした。

3. 研究成績および結論

細胞数は実験群、対照群とも経時的に増殖していたが、両群に有意差は認められなかった。FAK, vinculin 蛍光免疫染色は両群に陽性反応を示し両群に差は見られなかった。RANKL, OPG 蛍光免疫染色は実験群において対照群に比べ強い陽性反応が観察された。RT-PCR について RANKL mRNA の発現は1, 2, 3および5日後で実験群は対照群に比べ有意差を持って高い値を示した。OPG mRNA の発現は2日後で実験群において対照群に比べ有意差を持って高い値を示した。

以上の結果より、培養歯根膜細胞は強い力に対し早期には OPG の発現により破骨細胞の分化を抑制させるものの RANKL を発現させ破骨細胞の分化を促進することが示唆された。

論文審査の要旨

歯根膜にメカニカルストレスを加え、破骨細胞の分化を制御している Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) や osteoprotegerin (OPG) を検索した研究は数多くなされている。しかし、*in vitro* にて歯根膜線維芽細胞に焦点を当て、強い力に対する RANKL と OPG の発現を検索したものはない。本論文は強いメカニカルストレスとして遠心力を用い、歯根膜細胞における破骨細胞分化に関与する因子について分子生物学的に検討したものである。

本審査委員会は、平成21年2月24日に行われ、まず成瀬晋一大学院生から論文内容の説明がなされた。その後、各審査委員より 1) 実験で上顎門歯を使用した理由、2) 実験で使用した遠心力の大きさは、臨床ではどのような力に相当するか、3) 歯根膜継代の理由と培養した歯根膜細胞の主体がどんな細胞か、4) RT-PCR の結果で対照群の RANKL は経日的になぜ発現が上昇したか、5) 力の大小に対する OPG の発現の違い、6) 遠心力が細胞にどのようにかかるか、などについて質疑が行われた。これらの内容について、1) 強い咬合力を仮定した場合、臼歯の方が適するが、ラットの臼歯から採取できる歯根膜組織の量が少ないため、培養に適する量の歯根膜組織を持つ門歯を用いた。2) 本実験での遠心力を換算すると、力の大きさは矯正における急速拡大に相当する。3) *in vitro* の実験で必要量の細胞を得るために、培養と継代を行ったが、継代を多く重ねると細胞の性質が変化するため、本実験では3継代目の細胞を使用した。本実験では歯根膜線維芽細胞様細胞を使用した。4) 過去の報告でも *in vitro* にて対照群で RANKL の発現に変化があるという結果を得ており、原因は明らかではないが歯根膜は恒常的に RANKL を発現し、生理的な骨改造に関与していると考えられる。5) 強い力では核の形態が変化し、核内 DNA に影響を与えるため OPG の発現が上昇し、弱い力では核の形態に変化を与えるには至らないと考える。6) 細胞に対し遠心機の回転中心から培養皿の底面方向に回転半径、質量、回転数に比例した力が加わり、細胞内圧はそれと反対方向にかかるが無視できるほど小さい、とおおむね妥当な回答が得られた。さらに考察、論文の追加、用語、結論の変更など多くの修正すべき点が指摘され、訂正、追加が行われた。

その結果、本研究で得られた結果は、今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。