

ふりがな氏名	りやお うえん 廖 文
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 741 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 6 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Cell survival and gene expression under compressive stress in a three-dimensional <i>in vitro</i> human periodontal ligament-like tissue model (荷重下における三次元 <i>In Vitro</i> ヒト歯根膜様組織の細胞生存と遺伝子発現)
学位論文掲載誌	Cytotechnology 平成 27 年
論文調査委員	主査 松本 尚之 教授 副査 田中 昭男 教授 副査 西川 泰央 教授

### 論文内容要旨

至適矯正力を明らかにすることは、矯正歯科治療の効果を高める上で有意義であると考えられる。われわれはヒト歯根膜細胞を用いて、ポリ乳酸不織布を足場材料とし、歯根膜様組織を *In Vitro* で作製した。本研究では三次元 *In Vitro* 歯根膜様組織に対して負荷をかけることで矯正力をシミュレートし、形態学的な変化と遺伝子発現の解析を行った。

溶媒キャスト粒子溶出法で足場材料を作製することとした。まず、ポリ-L-乳酸をジクロロメタンに溶解させ、塩化ナトリウムと混合し足場材料を作製した。厚さは  $400 \pm 50 \mu\text{m}$ 、気孔率は 83.3%、気孔サイズは  $75\text{-}150 \mu\text{m}$  とした。足場材料の形は円形、直径は 0.6 cm である。  $1 \times 10^5$  個ヒト歯根膜細胞を足場材料上に遠心回転で播種し、14 日間培養することによって *In Vitro* 歯根膜様組織を作製した。その後、*In Vitro* 歯根膜様組織にステンレス球によって 5、15、25 および  $35\text{g}/\text{cm}^2$  の負荷をかけ、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C の条件で 14 日間培養した後、電子顕微鏡 (SEM) を用いて細胞および細胞外マトリックスの形態学的変化の評価を行った。さらに、カスパーゼ-3/7 を用いて蛍光染色をし、細胞のアポトーシスについて調べた。その後、トータル RNA を抽出し cDNA を合成した。また、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて、負荷および負荷の期間における遺伝子発現の変化を調べた。

SEM による評価では、*In Vitro* 歯根膜様組織の細胞および細胞外マトリックスの形態変化が認められなかった。またカスパーゼ-3/7 蛍光染色では、負荷および負荷の期間が蛍光の強度に影響をおよぼさないことが分かった。PCR の結果から、7 日目と 14 日目の RANKL 遺伝子および 14 日目 BMP-2 遺伝子の発現については、15 および  $35\text{g}/\text{cm}^2$  の負荷が他の負荷と比較して最も高かったものの、Double

Peakの傾向を示した。14日目のALP遺伝子とPLAP-1遺伝子の発現については、5g/cm<sup>2</sup>の負荷で最も高かった。FGF-2およびOPG遺伝子の発現については、負荷とはかかわらず、14日の発見は最も高かった。I型コラーゲンの7日目と14日目の遺伝子発現は、負荷にかかわらず、1日目および3日目より高かった。

以上の結果から、*In Vitro* ヒト歯根膜様組織に対し矯正力をシミュレートした負荷をかけても、細胞の形態学的な変化やアポトーシスは認められないことが分かった。一方、負荷および負荷の期間により遺伝子発現の変化を認め、矯正力の生体反応を*In Vitro* でシミュレートすることが示唆された。

## 論文審査結果要旨

本研究では、ポリ-L-乳酸で多孔質不織布を作り、それを足場材料とし、ヒト歯根膜細胞を播種し、培養することによって歯根膜組織をシミュレートする組織様構造、すなわち三次元歯根膜様組織を*In Vitro* で作製した。さらに、三次元*In Vitro* 歯根膜様組織に対して負荷をかけることで矯正力をシミュレートし、形態学的な変化と遺伝子発現の解析を行った。

ポリ-L-乳酸多孔質不織布を溶媒キャスト粒子溶出法で作製した。その手順は、ポリ-L-乳酸をジクロロメタンに溶解させ、塩化ナトリウムと混合し、水洗によって多孔様構造を作成した。その厚さは400 ± 50 μm、気孔率は83.3%、気孔サイズは75-150 μmとした。パンチで不織布を直径0.6 cmの円形に形成し、足場材料として使用した。1 × 10<sup>5</sup>個ヒト歯根膜細胞を足場材料上に遠心力を用いて播種し、14日間培養することによって組織様構造を認め、三次元*In Vitro* 歯根膜様組織になったことを確認した。その後、*In Vitro* 歯根膜様組織にステンレス球を用いて5、15、25および35g/cm<sup>2</sup>の負荷をかけ、5%CO<sub>2</sub>、37°Cの条件で1、3、7および14日間培養した後、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて細胞および細胞外マトリックスの形態学的変化の評価を行った。さらに、カスパーゼ-3/7を用いて蛍光染色をし、細胞のアポトーシスについて観察した。その後、トータルRNAを抽出しcDNAを合成した。また、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて、負荷の大きさおよび負荷の期間における遺伝子発現の変化について評価を行った。

SEMによる評価では、*In Vitro* 歯根膜様組織の細胞および細胞外マトリックスの形態変化が認められなかった。また、カスパーゼ-3/7蛍光染色では、負荷の大きさおよび負荷の期間が蛍光の強度に影響を及ぼさないことが分かった。PCRの結果から、7日目と14日目のRANKL遺伝子発現および14日目のBMP-2遺伝子発現については、15 g/cm<sup>2</sup>および35g/cm<sup>2</sup>の負荷が他の負荷と比較して最も高かったものの、Double Peakの傾向を示した。14日目のALP遺伝子とPLAP-1遺伝子発現については、5g/cm<sup>2</sup>の負荷で最も高かった。FGF-2およびOPG遺伝子発現については、負荷の大きさに関わらず、14日目が最も高かった。I型コラーゲン遺伝子発現については、負荷の大きさに関わらず、7日目と14日目が最も高かった。

以上の結果から、*In Vitro* ヒト歯根膜様組織に対し矯正力をシミュレートした負荷をかけても、細胞の形態学的な変化やアポトーシスは認められないことが分かった。一方、負荷の大きさおよび負荷の期間により遺伝子発現の変化を認め、矯正力の生体反応を*In Vitro* でシミュレートできることが示唆された。

以上のことから、*In Vitro* ヒト歯根膜様組織に荷重を負荷することによって矯正力を*In Vitro* でシミュレートできる可能性を認めた点において、本論文は博士(歯学)の学位を授与するに値すると判定した。