

1. 研究課題名：メカニカルストレスにより分化誘導されたヒト歯根膜細胞における EGF および EGF-R の役割
2. 研究機関：長崎大学アイソトープ総合センター
3. 研究者：松田尚樹
4. 共同研究者：横山兼久（科学技術振興事業団・長崎研究室）  
竹下哲史（長崎大学医学部・原研放射）  
渡邊正己（長崎大学薬学部・放射線生命科学）
5. 研究期間：平成7年～平成9年
6. 要約

歯牙と歯槽骨の中間に位置する歯根膜は、常に咬合圧によるメカニカルストレスを受けている軟組織である。歯根膜の細胞は骨芽細胞とセメント芽細胞に分化することのできる多能性細胞と考えられており、その分化制御には上皮増殖因子（EGF、epidermal growth factor）およびその受容体（EGF-R）が関与していることが知られているが、この細胞のメカニカルストレスに対する応答性については明らかでない。本研究では、培養歯根膜細胞に *in vitro* で機械的伸張ストレスを加え、細胞の増殖、分化、および EGF と EGF-R の役割について検討した。

Flexercell cell-strain unit を用いてヒト歯根膜細胞に伸張率 9%および 18%、6 回/分の伸張反復ストレス（cyclic stretch）を加えたところ、ストレス負荷 4 日以降において、骨性分化のマーカであるアルカリ性フォスファターゼ（ALP）活性、およびオステオカルシン（OCN）mRNA 発現が上昇した。その逆に、細胞増殖性は抑制された。これらのメカニカルストレスの作用は、EGF（10 ng/ml）存在下で完全に消失した。その一方、メカニカルストレスにより EGF-R タンパク量は減少した。また、EGF と結合後の EGF-R の自己リン酸化タンパクは、メカニカルストレスによりむしろ増加した。

以上の結果より、メカニカルストレスは歯根膜細胞の分化を誘導すること、さらに、メカニカルストレスと EGF/EGF-R の相互作用が、骨芽細胞とセメント芽細胞の供給源としての歯根膜細胞を制御している可能性が示唆された。

## 7. 研究目的

歯根膜は歯牙と歯槽骨の中間に位置し、この両者を強固に結合させ構造的安定性を保つ重要な組織である。この歯根膜の細胞は、骨芽細胞とセメント芽細胞に分化することのできる多能性細胞と考えられている<sup>1-3)</sup>。事実、アルカリ性フォスファターゼ（ALP）活性が高いこと<sup>4-6)</sup>や、オステオポンチン、SPARC（secreted protein, acidic and rich in cycteine）など骨マトリクスタンパクの遺伝子が発現していること<sup>7)</sup>など、培養歯根膜細胞は骨性細胞としての性質を示す。また、骨芽細胞と同様に、歯根膜細胞も合成グルココルチコイドであるデキサメサゾン（Dex）に応答して分化することが、ALP 活性の上昇<sup>8)</sup>、オステオポンチン遺伝子発現の上昇<sup>7)</sup>、および石灰化ノズル形成<sup>7,9)</sup>により示されている。

歯根膜細胞の形質維持と分化の制御機構は明らかでない。本研究を始める以前、我々が Dex によるラット歯根膜細胞の分化誘導における細胞増殖因子の役割を調べたところ、上皮

増殖因子 (EGF) は分化誘導を阻害するとともに、細胞膜上の EGF 受容体 (EGF-R) を増加させた。一方、分化にともない EGF-R タンパクの量が遺伝子発現レベルで抑制されていた。したがって、EGF/EGF-R は、歯根膜細胞の分化のネガティブな調節因子として働き、それによって歯根膜細胞形質を安定に維持しているものと考えられた<sup>8)</sup>。ラットを用いた動物レベルでの実験も同様の結果を示したが、次にヒト由来歯根膜細胞を用い、Dex によらず生理的な条件で分化する環境における EGF/EGF-R の役割を明らかにする必要である<sup>10)</sup>。

歯根膜細胞は咬合圧によるメカニカルストレスを生理的に常に受けている。また、矯正力に応答して、歯根膜と歯槽骨は構造変化を起こす。これらの所見は、歯根膜細胞がメカニカルストレスに応答して増殖あるいは分化する可能性を示唆するものである。これまでに、張力 (tension force)<sup>11)</sup>、圧力 (compression)<sup>12)</sup>、削ぎ応力 (shear stress)<sup>13)</sup> に応答して細胞の基本的機能を変化させることが、多くの細胞で報告されている。骨芽細胞を用いた研究では、ALP、オステオポンチン、オステオネクチンなどの骨分化マーカータンパクが増加することが知られている<sup>14-16)</sup>。それに対して、歯根膜細胞のメカニカルストレスに対する応答性についての知見は乏しく、伸張ストレスによって増殖が促進されるという報告<sup>17,18)</sup>があるのみである。先に述べたように、我々は歯根膜細胞の分化制御に EGF/EGF-R が重要な役割を演じていることを示してきたが、メカニカルストレスに対して、この EGF/EGF-R がどのように応答するのか興味を持たれるところである。そこで本研究では、メカニカルストレスに対する歯根膜細胞の増殖、分化の応答、および EGF/EGF-R の役割を明らかにすることを目的として、培養ヒト歯根膜細胞に機械的伸張ストレスを負荷し、増殖および分化の変化、EGF の作用、さらに EGF-R タンパクの量およびリン酸化についての検討を行った。

## 8. 材料と方法

### 8-1. 細胞培養

矯正治療のため抜去した歯周組織の健全な第 3 大臼歯に付着残存していた歯根膜片をメスで削り取り、細切した後、あらかじめ牛胎児血清 (FBS, Intergen Co., Purchase, NY) でコートしたシャーレに explant し、非必須アミノ酸、ビタミン類、ピルビン酸ナトリウム (Gibco Laboratories, Grand Island, NY)、および抗生物質混液 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を添加した DMEM (Gibco) /15%FBS で初代培養を開始した。約 2 週間で遊出した細胞を、0.05%トリプシン-0.53mMEDTA (Gibco) で集め、細胞浮遊液としてシャーレに植え直し、DMEM/10%FBS で培養した。以後はコンフルエントに達するたびに 1:4 の split ratio で継代を行ない、実験には継代数 3 から 7 の細胞を用いた。

### 8-2. メカニカルストレス

本研究では、メカニカルストレスのモデルとして、機械的伸張ストレスを用いた。底面が伸縮可能な Type I コラーゲンコートシリコン膜よりなる 6 穴プレート (径 25mm, FLEX-I, Flexcell International Corp., McKeesport, PA) 上で細胞を培養し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養細胞伸縮装置 (Flexercell Strain Unit Model FX-2000)<sup>11)</sup>を用いて、細胞に伸縮反復ストレスを加えた (Fig. 1)。対照としては、シリコン膜が伸縮できないようプラスチック

ク底面がある 6 穴プレート (FLEX-II) で培養した細胞を用いた。

本装置では伸縮率および伸縮回数を設定することができるが、培養面の伸縮率が均一でないという欠点がある。すなわち、伸縮は周辺部で最大、中心部で最小となる。そこで本研究では、位置に関わらず培養面上のすべての細胞の応答をまとめて検出することとし、周辺部の伸縮率が 9% (Flexcell 社によれば培養面全体では-5~9%に分布)、および 18% (同、-4~18%)、伸縮回数は 5 秒間伸張、5 秒間弛緩の繰り返し (6 cycles per minute) となるように条件を設定した。

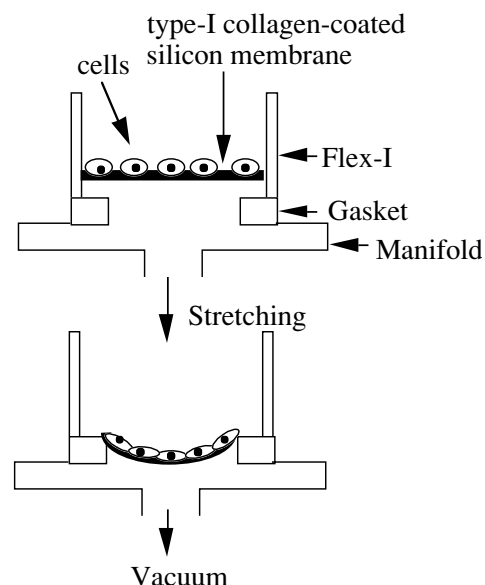


Fig. 1 FLEX-Iプレートの断面図。

### 8-3. 細胞増殖性

FLEX-I/II に  $2.5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  個の細胞を植え、DMEM/10% FBS で 24 時間培養後、新鮮な培養液に交換しメカニカルストレスを加えた。ストレス負荷開始後 1、3、5 日にトリプシン EDTA で細胞を回収し細胞数を計測した。

### 8-4. アクチンストレスファイバーの観察

メカニカルストレス負荷 5 日後の細胞を PBS で 2 度洗い、10%中性ホルマリン緩衝液 (和光純薬工業、大阪) で 30 分間固定した後、FLEX-I プレートの底部を抜き出し、20mmx20mm の正方形に切断した。アクチンは 33nM rhodamine phalloidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) で 30 分染色し、レーザースキャン顕微鏡 (LSM410、Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した (excitation 543nm、emission 590nm)。

### 8-5. アルカリ性フォスファターゼ活性

骨性分化の初期マーカーの一つとして、アルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性を調べた<sup>8)</sup>。FLEX-I/II に  $1 \times 10^5$  個の細胞を植え、コンフルエントに達するまで培養した後、培養液を mineralizing medium (DMEM/1%FBS, 10  $\mu$ g/ml アスコルビン酸, 10mM  $\beta$ -グリセロリン酸) (和光) に交換した。また実験によってはデキサメサゾン (Dex, 和光) を最終濃度で 10nM 加えた。培養液交換の翌日よりメカニカルストレスを加え、1、3、5 日間培養後、細胞を 0.1% Triton X-100 (Sigma) /PBS で溶解し、さらに超音波で破砕した後の遠心上清中の ALP 活性を、*p*-nitrophenylphosphate (和光) を基質として測定した。

また ALP 活性部位の染色には、細胞 10%中性ホルマリン緩衝液で 15 分間固定した後、0.1mg/ml Naphtol AS MX-PO<sub>4</sub> (同仁化学, 熊本)、0.4% *N,N*-dimethylformamide (和光)、0.1M Tris-HCl pH 8.3 よりなる基質混液と 45 分間反応させた後、蒸留水、次いで 0.5M HCl で洗浄し、0.25% alcian blue 8GX (Sigma) /0.1M HCl で染色した。

## 8-6. オステオカルシン mRNA の発現

骨成分化の後期マーカーとして、オステオカルシン (OCN) mRNA 発現を RT-PCR 法により調べた。前項と同様の条件でメカニカルストレスを負荷した細胞の全 RNA を、Chomczynski and Sacchi の方法<sup>19)</sup>により分離し、この全 RNA 1  $\mu$ g を鋳型として、random 9mers 50pmol/ $\mu$ l および 10mM dNTP mixture 存在下 AMV reverse transcriptase XL 5U/ml による逆転写反応を 30 分、55 $^{\circ}$ C で行ない、1st strand cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、20pmol のプライマーセットおよび Taq polymerase により 30 サイクルの PCR 反応を行なった。反応条件およびプライマー配列は下記の通りである。

Denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 1 分、Annealing; 55 $^{\circ}$ C, 2 分 30 秒、Extension; 72 $^{\circ}$ C, 1 分 30 秒、  
Forward; 5'-ATGAGAGCCCTCAGACTCCTC-3'、  
Reverse; 5'-CGGGCCGTAGAAGCGCCGATA-3'。

得られた PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線下で写真撮影をした。すべての試薬は Takara Biomedicals (Shiga) のものを用いた。

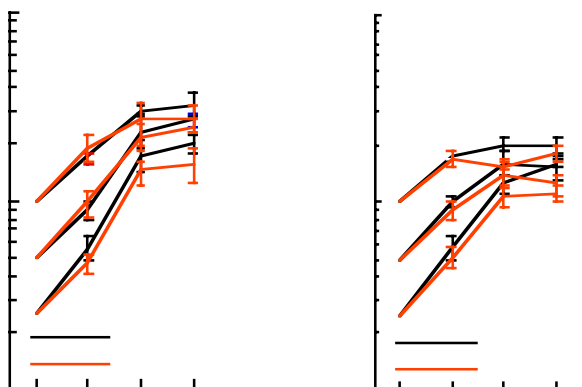
## 8-7. ウェスタンブロット

EGF-R タンパクおよびリン酸化 EGF-R タンパクの検出はウェスタンブロット法で行なった。EGF-R タンパクを検出する実験では、メカニカルストレスを 4 日間負荷した細胞を、細胞溶解用バッファー (1% Triton X-100, 10%グリセロール, 1mM PMSF, 20mM HEPES, pH 7.4) で溶解した。15  $\mu$ g のタンパクを 5% SDS-PAGE で分離した後、polyvinylidene fluoride 膜 (Millipore Corp., Bedford, MA) にトランスファーした。3%スキムミルク (Difco Laboratories, Detroit, MI) でブロッキング後、一次抗体には polyclonal sheep anti-human EGF-R antibody (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、二次抗体には peroxidase-conjugated antishoop Ig antibody (Chemicon International, Temecula, CA) を用いた反応を行った。リン酸化 EGF-R を検出する実験では、メカニカルストレスを 4 日間負荷した細胞を 10ng/ml ヒト・リコンビナント EGF (Upstate) で 5 分または 15 分存在下で培養した後、細胞を溶解し、SDS-PAGE、トランスファー、およびブロッキングを行なった。一次抗体には antiphosphotyrosine monoclonal antibody clone 4G10 (Upstate)、二次抗体には biotinylated anti-mouse Ig (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) を用い、ALP-streptavidin conjugate により可視化させた。得られた結果をイメージスキャナーによりコンピュータに取り込んだ画像をもとに、NIH Image 1.56 を用いて定量化した。

## 9. 結果

### 9-1. 細胞の増殖と形態変化

Fig. 2 に細胞増殖曲線を示す。コントロール (メカニカルストレス非負荷) の細胞では培養 4 日後まで対数的に増殖し、以後増殖率が低下した。ストレスを負荷した細胞も対数増殖を示したが、細胞数はコントロールよりも少ない傾向が見られた。この傾向は、伸張率や細



胞の植え込み濃度によって変化するものではなかった。

メカニカルストレス負荷により死細胞やアポトーシスを起こした細胞は見られなかったが、負荷 5 日後には、観察に用いた試料 (20mmx20mm) の外周より約 0.5mm 以内に位置する細胞 (試料全面積の 10%に相当) が伸張の方向と垂直に向きを変え並んでいた (Fig. 3)。コントロールの細胞では、そのような細胞の整列は見られなかった。



周辺部

中央部

周辺部

## 9-2 . 細胞の分化

コンフルエントな歯根膜細胞を mineralizing medium 中で培養すると、骨性分化の初期マーカーである ALP 活性は培養 4 日後まではほぼ一定値 (90U/mg protein) を保ち、6 日後には 180U まで上昇した (Fig. 4AB)。Dex (10 nM) 存在下で培養された細胞では、培養 2 日後ですでに 170U を示し、その後 ALP 活性はさらに上昇した。すなわち本研究で用いたヒト歯根膜細胞は、ラット歯根膜細胞における従来の報告<sup>8)</sup>と同様に、Dex により骨性分化が誘導された。ここで伸長率 9%のメカニカルストレスを加えたところ、培養 4 日目には ALP 活性が 150U まで上昇し、さらに 6 日目には Dex 処理細胞と同程度の活性 (250U) まで達した。さらに Dex 存在下でメカニカルストレスを負荷した場合、ALP 活性はさらに 380U にまで上昇した (Fig. 4A)。伸長率 18%のメカニカルストレスによっても同様に ALP 活性は上昇したが、細胞の応答は速く培養 4 日後にはすでにピークに達した (Fig. 4B)。

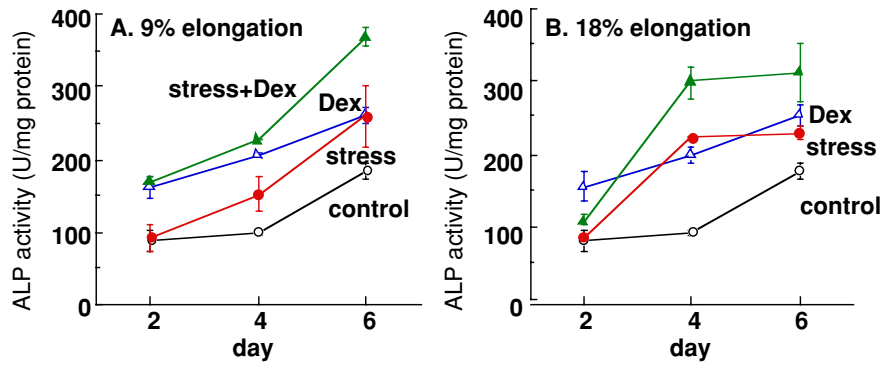


Fig.4 メカニカルストレスおよび Dex による歯根膜細胞の ALP 活性の変化

分散分析 (ANOVA) により Fig.3 の結果を統計解析したところ、処理 2、4、6 日目において Dex 処理群と非処理群の間で、また 4、6 日目においてメカニカルストレス負荷群と非負荷群の間で有意差が見られた。また 4 日目においては、伸張度 9%と 18%の間でも有意差が得られた (Table 1)。

Table 1 Fig.3 のデータの ANOVA 解析 (\*\*p<0.01)

day 2	SS	df	MS	F
between	28081	5	5616	8.23 **
error	12281	18	682	
total	40362	23		
<hr/>				
Dex (+) vs (-)	20895	1	23445	34.36 **
Stretch (+) vs (-)	329	1	329	0.48
9% vs 18%	0	1	0	0.00
<hr/>				
day 4	SS	df	MS	F
between	39114	5	7823	22.92 **
error	6145	18	341	
total	45258	23		
<hr/>				
Dex (+) vs (-)	43902	1	23445	68.68 **
Stretch (+) vs (-)	31170	1	31170	91.31 **
9% vs 18%	12639	1	12639	37.02 **
<hr/>				
day 6	SS	df	MS	F
between	69371	5	13874	12.48 **
residual	20003	18	1111	
total	89374	23		
<hr/>				
Dex (+) vs (-)	48191	1	23445	21.10 **
Stretch (+) vs (-)	28822	1	28822	25.94 **
9% vs 18%	1080	1	1080	0.97

次に、ALP 活性の上昇を細胞染色法により確認した。Fig. 5 には、培養底面の中心から約 0.6mm 離れた部分の細胞の ALP 染色像を示す。コントロールと比較して、Dex 処理細胞およびメカニカルストレス（伸張度 18%、細胞の位置では約 3%）負荷細胞では、培養 6 日後に濃染する ALP 陽性細胞が多く確認された。さらにメカニカルストレスと Dex の併用により、ALP 陽性細胞は顕著に増加した。

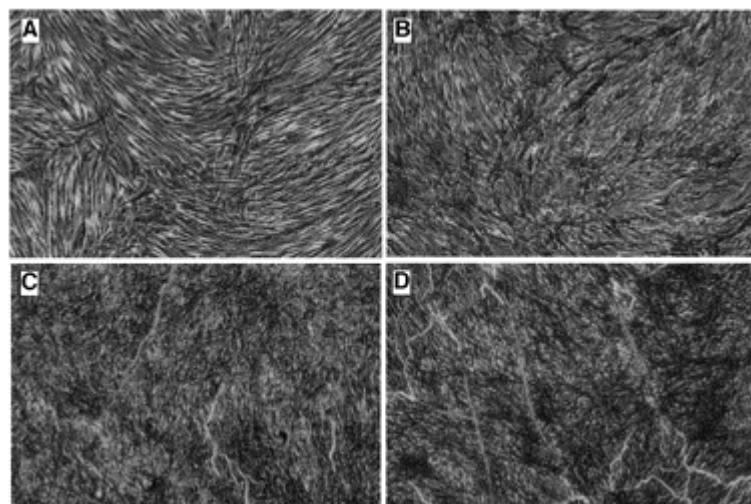


Fig.5 細胞の ALP 染色像  
 A コントロール  
 B Dex (10nM)  
 C 機械的伸張ストレス (18%)  
 D Dex+伸張ストレス

骨性分化の後期マーカーであるオステオカルシンの mRNA 発現は、コントロールでは培養開始 6 日後までの間でわずかに上昇したのみであった。それに対してメカニカルストレス負荷 6 日後では、強い発現が見られた (Fig. 6)。以上の ALP 活性、ALP 染色、オステオカルシン遺伝子発現、の結果より、機械的伸張ストレスは歯根膜細胞の分化を誘導することが明らかとなった。

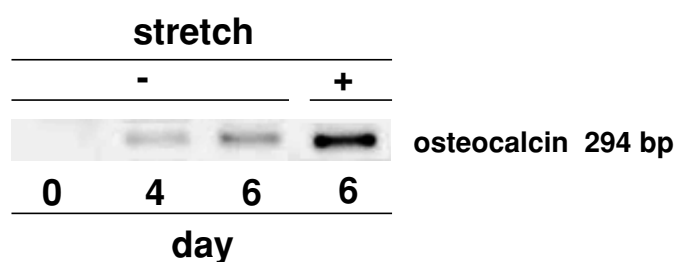


Fig.6 メカニカルストレスによるオステオカルシン遺伝子の発現

### 9-3 . EGF の作用

Fig. 7 には EGF (10 ~ 100ng/ml) 存在下で培養 4 日目の細胞数を示す。EGF により明らかに細胞数は増加し、細胞増殖の促進が認められた。さらに EGF はメカニカルストレスによって減少した細胞数 ( $1.5 \times 10^5$ /dish) をコントロール ( $1.8 \times 10^5$ /dish) まで戻した。

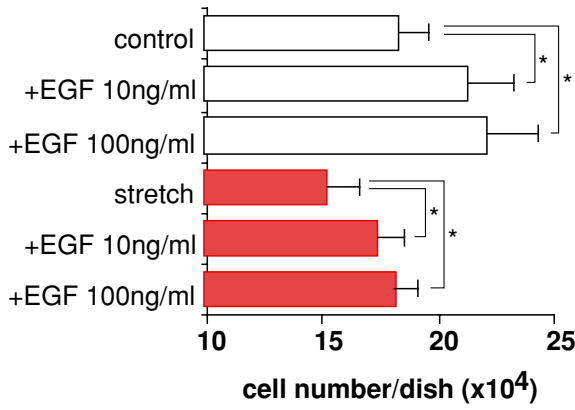


Fig.7 EGFによる細胞増殖の促進  
(\*p<0.05, ANOVA)

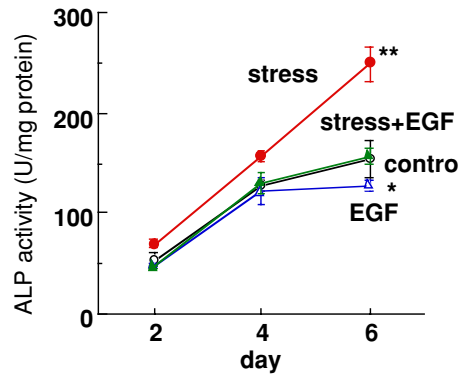


Fig.8 EGFによるメカニカルストレス誘導分化の抑制  
(\*p<0.05, \*\*p<0.01, ANOVA)

一方、分化に関しては、EGF存在下で歯根膜細胞のALP活性は培養6日目ですでにコントロールより減少したのみであった。ところがメカニカルストレス負荷により上昇したALP活性を、ほぼコントロールのレベルにまで抑制した(Fig. 8)。以上より、EGFはメカニカルストレスの作用に対して、増殖、分化のいずれにおいても拮抗的に働くことが示された。

#### 9-4. EGF-Rタンパク量の変化

抗EGF-R抗体を用いたウエスタン・ブロットにより、170kDaのEGF-Rタンパクが検出された(Fig. 9, lane 1)。Dex処理細胞、およびメカニカルストレス負荷細胞の培養4日目におけるEGF-Rタンパク量は、それぞれコントロールに対して72±6%、および40±9%に減少していた(lane 2, 3)。さらに、Dex処理とメカニカルストレス負荷の併用では、36±10%まで減少した。したがって、歯根膜細胞上のEGF-Rは、誘導因子の違いに関わらず、分化によって減少することが明らかとなった。

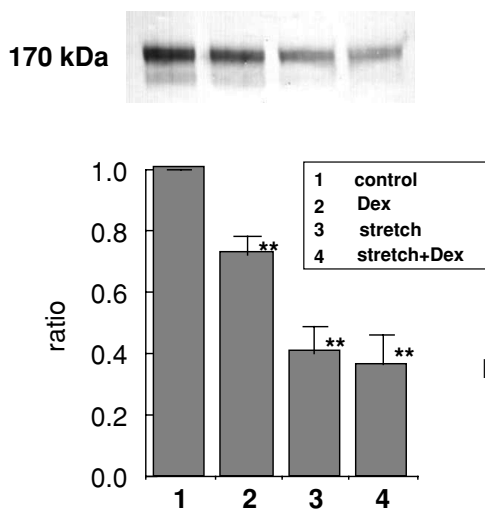


Fig.9 EGF-Rタンパクのウエスタン・ブロットによる検出  
(\*\*p<0.01, ANOVA)



## 9-5 . EGF-R タンパクの自己リン酸化

EGF-R タンパクの減少は、EGF との結合を起点として伝達される情報量の減少につながり、結果的に細胞の EGF に対する応答性を低下させるはずである。EGF-R はチロシンキナーゼ活性を有し、EGF と結合することによる情報伝達の初期の反応として自己リン酸化を起こすことが知られている<sup>21)</sup>。歯根膜細胞を EGF で刺激した後のチロシンリン酸化タンパクを anti-phosphotyrosine antibody を用いたウエスタン・ブロットによって検出したところ、刺激後 5 分後に EGF-R に相当する 170kDa の位置に太いバンドが出現した。そこで Dex 存在下で 4 日間培養された細胞を用いて同様の実験を行ったところ、EGF-R タンパクの減少に対応して、EGF 刺激後リン酸化された EGF-R も減少していた。一方メカニカルストレスを 4 日間加えられた後の細胞では、EGF-R タンパクは Dex よりも多く減少していたにもかかわらず、リン酸化 EGF-R タンパクはわずかに抑制されたのみであった (Fig. 10)。なお、データには示さないが、メカニカルストレスを加えた直後の細胞では、EGF-R リン酸化に変化は見られなかった。

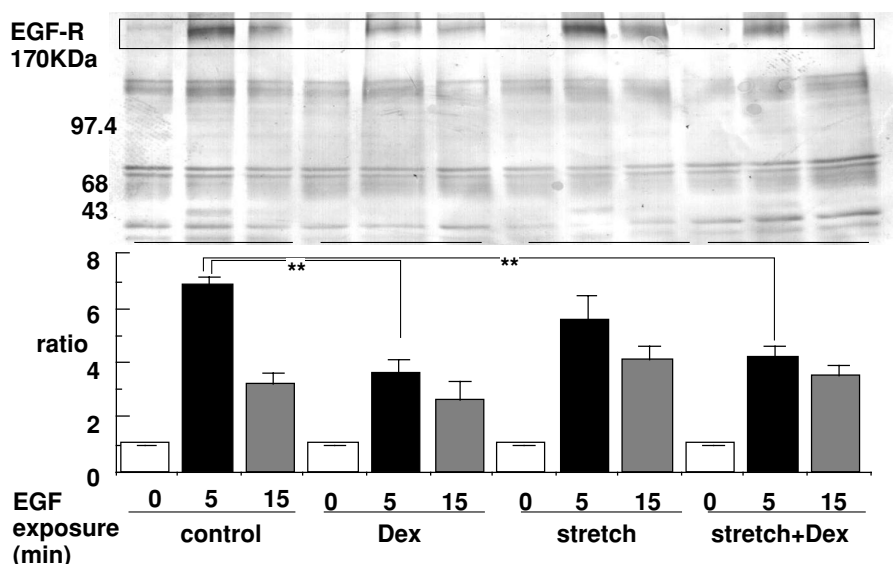


Fig.10 Dex 処理細胞およびメカニカルストレス負荷細胞における EGF による EGF-R 自己リン酸化 (\*\* $p < 0.01$ , ANOVA)

## 10 . 考察

EGF はラット頭蓋骨由来骨芽細胞の自発的な分化を抑制することが報告されている<sup>22,23)</sup>。我々も、ラット歯根膜細胞<sup>8)</sup> およびラット骨髄間質細胞<sup>24)</sup> の Dex 誘導分化が EGF により阻害され、そのいずれの場合にも EGF-R タンパクの合成が低下することを示してきた。これらの結果に加えて、今回、我々はヒト歯根膜細胞の増殖と分化におよぼすメカニカルストレスの作用を、EGF が抑制することを初めて見いだした。さらに、メカニカルストレスによる分化誘導に伴い、EGF-R タンパクが減少していた。これらの結果は、EGF/EGF-R が、分化誘導刺激の種類に依らず、骨性分化の普遍的な負の調節因子である可能性を示す。分化誘導刺激としてのメカニカルストレスの細胞センサーおよび情報伝達経路については不明であ

るが、Dex などのグルココルチコイドの他に、副甲状腺ホルモンおよび  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin  $\text{D}_3$  などに関しては、核内受容体の存在が確認されている<sup>25,26)</sup>。EGF/EGF-R はメカニカルストレスと Dex の両者に反応したので、EGF-R は、このような特異的な受容体を介する信号経路に作用したのではなく、歯根膜細胞の増殖分化制御に関わる信号経路に作用するのではないかと考えられる。

EGF が細胞膜上の EGF-R と結合後に最初に起こる現象は、EGF-R のチロシンキナーゼ活性の上昇と、それによる EGF-R 自身の自己リン酸化である<sup>21)</sup>。次いで活性化した EGF-R は SH2/SH3 タンパクなどのアダプター分子を介して、下流の多くの分子に信号を伝える<sup>27)</sup>。したがって、EGF-R の自己リン酸化量は、細胞の EGF 応答量を示すものと考えられる。本研究では Dex 処理細胞で EGF-R タンパクが減少し、それによって EGF 誘導リン酸化 EGF-R タンパクも減少した。ところがメカニカルストレス負荷細胞では、EGF-R 量は Dex 処理細胞よりもさらに低下していたにも関わらず、EGF で刺激されリン酸化された EGF-R 量はコントロールと同レベルであった。このような現象が、メカニカルストレスを 4 日間負荷された細胞には起こったが、数 10 分という短時間の負荷では起こらなかったということは、長期間にわたり細胞内で起こった変化、特に分化に関わる変化が関わっていることを示す。その機構に関しては不明であるが、これがメカニカルストレスによる分化の一つの特徴と考えられる。また生物学的な意味としては、メカニカルストレス負荷によっても EGF への応答性を維持するための機構ではないかと推察される。なおこの結果に類似したものとして、メカニカルストレスの負荷される培養系では、通常の単層培養の系と比較して、PDGF (血小板由来増殖因子) による PDGF-R (同、受容体) の自己リン酸化が顕著に高いということが線維芽細胞において報告されている<sup>28)</sup>。

これまでのところ、我々の実験も含めて、骨性細胞の *in vitro* 分化におよぼすメカニカルストレスの影響に関する報告がいくつか見られるが、その結果はまだ一致していない。齧歯類由来の細胞種である ROS 17/2.8<sup>29)</sup> と MC3T3-E1<sup>30)</sup> に圧力を加えた実験では、ALP 活性が前者では上昇し、後者では低下する。Flexercell システムを用いて我々と同程度の機械的伸張ストレスを与えた実験では、ALP 活性の上昇や、骨基質タンパク合成の促進が、ラット頭蓋骨由来初代細胞<sup>31)</sup>、同樹立細胞 (HT-3)<sup>16)</sup>、およびヒト骨肉腫由来細胞 (OHS-4)<sup>14)</sup> において示されている。今回の結果はこれらの報告と一致する。その一方で、ヒト歯根膜細胞に機械的伸張ストレスを加えたところ、ALP の活性、mRNA 発現がともに減少したという我々と対照的な結果も Yamaguchi ら<sup>18,32)</sup> により報告されている。この違いは細胞の培養条件に起因するものかもしれない。彼らの系では、セミコンフルエントの細胞を増殖培地で培養しメカニカルストレスを加えているが、我々の系ではコンフルエントな細胞を、歯根膜細胞の分化に必要なアスコルビン酸およびグリセロリン酸を含む培地<sup>9)</sup> で培養し、ストレスを加えた。これらの薬物の存在下でコンフルエントな歯根膜細胞が石灰化ノズルを形成するまで分化することは、Ramakrishnan ら<sup>7)</sup> により示されている。すなわち、我々の系では、より分化に向かいやすい条件でストレスを加えたと考えられる。また別の考え方として、培養した歯根膜細胞の分化の段階が異なっていたということも考えられる。例えば Mikuni-Takagaki ら<sup>15)</sup> は、分化の段階の異なる骨細胞がメカニカルストレスに対して異なった応答

性を示すことを報告している。

Flexercell システムによる機械的伸張ストレスの負荷には、その伸張力が生理的なものよりも比較的高いことや、伸張力の分布が不均一であるという欠点が指摘されている。生理的な伸張力に関しては、ヒト上顎切歯に側方から加えられた 500g の矯正力は約 24% の伸張を生じること<sup>32)</sup>、また小臼歯に対する 1N の矯正力は約 1% の伸張を生じること<sup>33)</sup> が示されている。健常人の咬合力にはバラツキがあるが、通常の臨床試験の咬合力の基準としては、500 ~ 3000g が用いられているようである<sup>34)</sup>。また矯正力は連続的な負荷であるのに対して、咬合力は不連続的な負荷であることも考慮に入れなければならない。我々は過去の文献<sup>14,16,18,31)</sup> に基づき、咬合力を想定して、培養底面周辺部における最大伸張度として 9% および 18% の不連続な反復伸張ストレスを用いた。この最大伸張度は生理的咬合力よりもやや高めであるが、この条件での底面上の伸張度は、それぞれ -5 ~ 9% および -4 ~ 18% の不均一な分布となるため、全体としては生理的な伸張力の範囲もカバーしていると考えられる。また伸張力とストレスファイバーの角度には密接な関連があることが報告されているが<sup>35)</sup>、本研究でも、細胞全体の約 10% に相当する周辺部の細胞のアクチン・ストレスファイバーは、伸張力の方向に対して垂直に並んで整列する傾向が見られた。これは伸張度の高い周辺部において、細胞が伸張力を回避するように方向を変えたためと考えられる。また底面の伸張に伴って生じる培養液の動きが、細胞に対する削ぎ応力 (fluid shear stress) となって細胞の方向性に影響したことも考えられる<sup>13)</sup>。したがって、ストレスファイバーの整列に関して言えば、我々の結果では周辺部の細胞のみが有効な量のメカニカルストレスを受けたということになる。しかしながら、今回の結果では、ALP 活性染色で陽性を示した細胞が周辺部だけではなく全体に分布していた。これにはメカニカルストレスに応答して細胞が産生した二次的因子<sup>32,36)</sup> や、ストレスにより活性化する細胞間コミュニケーション<sup>37)</sup> が関与しているものと考えられる。現実には組織レベルでは、歯根膜は不均一なメカニカルストレスを受け、それに対して細胞集団として応答しているはずである。我々も、メカニカルストレスを受けた細胞が、個々ではなく、細胞集団全体としてどのように応答するか (net response)、という観点からの解析を試みた。Flexercell システムによる伸張ストレス負荷系は、その目的に適ったものであると考えられる。

結論として、メカニカルストレスはヒト歯根膜細胞の分化を誘導し、EGF はこれを阻害した。メカニカルストレスは EGF-R 量を低下させたが、EGF-R 活性化を促進することにより EGF 応答性を維持する可能性が示唆された。このようなメカニカルストレスと EGF/EGF-R 間の相互作用が、歯根膜細胞の分化を制御し、ひいては歯根膜の機能的、構造的恒常性維持に関わっているものと考えられる。

## 11. 今後の展開

メカニカルストレスに関する研究は、骨性細胞のみならず血管内皮細胞や心筋細胞において精力的に進められており、ストレスのセンサー分子、および細胞内の信号伝達系の解明に焦点は移っている。我々も歯根膜細胞におけるメカニカルストレス信号伝達系についての研究を継続的に進めており、MAP キナーゼ・カスケードに着目した結果は別途報告する。また、

歯根膜細胞の増殖や運動性を活性化することの知られている増殖因子である、PDGF や IGF の受容体に関する PI3 キナーゼ系にも着目し、歯根膜細胞に特有のメカニカルストレス応答シグナル分子を見いだすことを考えている。さらに次の段階として、Two-hybrid system 法を用いて、上記分子と相互作用を起こす遺伝子クローニングを、また Differential display 法によっても、メカニカルストレスに特異的発現パターンを示す遺伝子をクローニングし、この両者により一致して得られた遺伝子を特定することを予定している。

歯根膜細胞におけるメカニカルストレスに対するシグナル伝達系を明らかにすることは、分子細胞生物学分野において重要な知見を与えると同時に、このシグナル系を制御することにより、健全な歯周組織の維持や歯周疾患の治療に応用できる、有用な薬物、療法の提案につながるものである。

## 12. 参考文献

- 1) M. A. Aukhil, D. M. Simpson, C. Suggs and E. Pettersson: *In vivo* differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament: an experimental study using physical barriers, *J. Clin. Periodontol.*, 13, 862-868 (1986)
- 2) C. A. G. McCulloch and A. H. Melcher: Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice, *Am. J. Anat.*, 167, 43-58 (1983)
- 3) W. E. Roberts, P. G. Mozsary and E. Klingler: Nuclear size as a cell-kinetic marker for osteoblast differentiation, *Am. J. Anat.*, 165, 373-384 (1982)
- 4) T. Kawase, S. Sato, K. Miake and S. Saito: Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblastic cells, *Adv. Dent. Res.*, 2, 234-239 (1988)
- 5) N. Nojima, M. Kobayashi, M. Shinonome, N. Takahashi, T. Suda and K. Hasegawa: Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts, *J. Periodont. Res.*, 25, 179-185 (1990)
- 6) M. J. Somerman, S. Y. Archer, G. R. Imm and R. A. Foster: A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*, *J. Dent. Res.*, 67, 66-70 (1988)
- 7) P. Ramakrishnan, W. Lin, J. Sodek and M. Cho: Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells *in vitro*, *Calcif. Tissue Int.*, 57, 52-59 (1995)
- 8) N. Matsuda, N. M. Kumar, P. R. Ramakrishnan, R. J. Genco and M. I. Cho: Evidence for up-regulation of epidermal growth factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype *in vitro*, *Archs. oral Biol.*, 38, 559-570 (1993)
- 9) M. I. Cho, N. Matsuda, W. L. Lin, A. Moshier and P. R. Ramakrishnan: *In vitro* formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat, *Calcif. Tissue Int.*, 50, 459-467 (1992)
- 10) M. I. Cho, W. L. Lin and P. R. Garant: Occurrence of epidermal growth factor-

- binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat: a light and electron microscopic radioautographic study, *Anat. Rec.*, 231, 14-24 (1991)
- 11) A. Banes, J. Gilbert, D. Taylor and M. Olivier: A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells *in vitro*, *J. Cell Sci.*, 75, 35-42 (1985)
  - 12) J. Veldhuijzen, L. Bourret and G. Rodan: *In vitro* studies of the effect of intermittent compressive forces on cartilage cell proliferation, *J. Cell. Physiol.*, 98, 299-306 (1979)
  - 13) A. Malek, G. Gibbons, V. Dzau and S. Izumo: Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium, *J. Clin. Invest.*, 92, 2013-2021 (1993)
  - 14) L. V. Harter, K. A. Hruska and R. L. Duncan: Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation, *Endocrinol.*, 136, 528-535 (1995)
  - 15) Y. Mikuni-Takagaki, Y. Suzuki, T. Kawase and S. Saito: Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress, *Endocrinol.*, 137, 2028-2035 (1996)
  - 16) S. Nishioka, K. Fukuda and S. Tanaka: Cyclic stretch increases alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells: a role for prostaglandin E<sub>2</sub>, *Bone Miner.*, 21, 141-150 (1993)
  - 17) M. Yamaguchi, N. Shimizu, T. Goseki, Y. Shibata, H. Takiguchi, T. Iwasawa and Y. Abiko: Effect of different magnitude of tension force on prostaglandin E<sub>2</sub> production by human periodontal ligament cells, *Archs. oral Biol.*, 39, 877-884 (1994)
  - 18) M. Yamaguchi, N. Shimizu, Y. Shibata and Y. Abiko: Effects of different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.*, 75, 889-894 (1996)
  - 19) P. Chomczynski and N. Sacchi: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analyt. Biochem.*, 162, 157-159 (1987)
  - 20) J. C. Fleet and J. M. Hock: Identification of osteocalcin mRNA in nonosteoid tissue of rats and humans by reverse transcription-polymerase chain reaction, *J. Bone Miner. Res.*, 9, 1565-1573 (1994)
  - 21) J. Downward, P. Parker and M. D. Waterfield: Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor, *Nature*, 311, 483-485 (1984)
  - 22) M. E. Antosz, C. G. Bellows and J. E. Aubin: Effects of transforming growth factor  $\beta$  and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells, *J. Cell. Physiol.*, 140, 386-395 (1989)

- 23) S. M. Bernier and D. Goltzman: Effect of protein and steroidal osteotropic agents on differentiation and epidermal growth factor-mediated growth of the CFK1 osseous cell line, *J. Cell. Physiol.*, 152, 317-327 (1992)
- 24) N. Matsuda, N. M. Kumar, P. R. Ramakrishnan and M. I. Cho: Role of epidermal growth factor receptor in osteoblastic differentiation of rat bone marrow stromal cells, *J. Bone Miner. Metab.*, 14, 137-145 (1996)
- 25) S. M. Bernier, M. F. Rouleau and D. Goltzman: Biochemical and morphological analysis of the interaction of epidermal growth factor and parathyroid hormone with UMR 106 osteosarcoma cells, *Endocrinol.*, 128, 2752-2760 (1991)
- 26) T. Chen, P. Hauschka, S. Cabrales and D. Feldman: The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and dexamethasone on rat osteoblast-like primary cell cultures' receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses, *Endocrinol.*, 118, 250-259 (1986)
- 27) J. Gergel, D. McNamara, E. Dobrusin, G. Zhu, A. Saltieri and W. Miller: Identification of amino acids in the N-terminal SH2 domain of phospholipase C  $\gamma$ 1 important in the interaction with epidermal growth factor receptor, *Biochemistry*, 33, 14671-14678 (1994)
- 28) Y.-C. Lin and F. Grinnell: Decreased level of PDGF-stimulated receptor autophosphorylation by fibroblasts in mechanically relaxed collagen matrices, *J. Cell Biol.*, 122, 663-672 (1993)
- 29) T. Kubota, M. Yamauchi, J. Onozaki, S. Sato, Y. Suzuki and J. Sodek: Influence of an intermittent compressive force on matrix protein expression by ROS 17/2.8 cells, with selective stimulation of osteopontin, *Archs. oral Biol.*, 38, 23-30 (1993)
- 30) H. Ozawa, K. Imamura, E. Abe, N. Takahashi, T. Hiraide, Y. Shibasaki, T. Fukuhara and T. Suda: Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) *in vitro*, *J. Cell. Physiol.*, 142, 177-185 (1990)
- 31) R. Carvalho, J. Scott, D. Suga and E. Yen: Stimulation of signal transduction pathways in osteoblasts by mechanical strain potentiated by parathyroid hormone, *J. Bone. Miner. Res.*, 9, 999-1011 (1994)
- 32) M. Yamaguchi and N. Shimizu: Identification of factors mediating the decrease of alkaline phosphatase activity caused by tension-force in periodontal ligament cells, *Gen. Pharmacol.*, 25, 1229-1235, (1994)
- 33) C. Dolce, A. J. Kinniburgh and R. Dziak: Immediate early-gene induction in rat osteoblastic cells after mechanical deformation, *Archs. oral Biol.*, 41, 1101-1108 (1996)
- 34) J. P. Coffey, W. N. Williams, G. E. Turner, P. E. Mahan, L. L. Lapointe and C. E. Cornell: Human bite force discrimination using specific maxillary and mandibular

teeth, J. Oral Rehabil., 16, 529-536 (1989)

- 35) T. Takemasa, K. Sugimoto and K. Yamashita: Amplitude-dependent stress fiber reorientation in early response to cyclic strain, Exp. Cell Res., 230, 407-410 (1997)
- 36) N. Resnick, T. Collins, W. Atkinson, D. Bonthron, C. Dewey and M. Gimbrone: Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 4591-4595 (1993)
- 37) K. Ziambaras, F. Lecanda, T. H. Steinberg & R. Civitelli: Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells, J. Bone Miner. Res., 13, 218-228 (1998)

### 13 . 研究業績

#### 13-1 . 原著論文

- 1) N. Matsuda: Glycosaminoglycans modulate chemotaxis and collagen gel contractability of cultured human periodontal ligament cells, Jpn. J. Oral. Biol., 38, 274-284 (1996)
- 2) N. Matsuda, N. M. Kumar, P.R. Ramakrishnan and M.I. Cho: Role of epidermal growth factor receptor in osteoblastic differentiation of rat bone marrow stromal cells, J. Bone Miner. Mitab., 14, 137-145 (1996)
- 3) N. Matsuda, A. Takemura, S. Taniguchi, A. Amano and S. Shizukuishi: *Porphyromonas gingivalis* reduces mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to platelet-derived growth factor *in vitro*, J. Periodontol., 67, 1335-1341 (1996)
- 4) N. Matsuda, K. Yokoyama, S. Takeshita and M. Watanabe: Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro*, Archs. Oral. Biol., 43, 987-997 (1998)
- 5) A. Takemura, N. Matsuda, S. Kimura, T. Fujiwara, I. Nakagawa and S. Hamada: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide modulates the responsiveness of human periodontal ligament fibroblasts to platelet-derived growth factor, J. Periodont. Res., 33, 400-407 (1998)

#### 13-2 . 総説など

- 1) 松田尚樹, 森田直子: メカニカルストレスに対する細胞の応答機構, 放射線生物研究, 33, 214-225 (1998)

#### 13-3 . 国際学会発表

- 1) A. Takemura, N. Matsuda, S. Kimura, T. Fujiwara and S. Hamada: *Porphyromonas ginivalis* LPS augments PDGF-induced biological activities of fibroblasts, The 73<sup>rd</sup> General Session, International Association for Dental Research, June 28 – July 1,

1995, Singapore.

- 2) N. Matsuda, K. Yokoyama, S. Takeshita and M. Watanabe: Role of EGF-R in mechanical stress-induced differentiation of PDL cells, The 75th General Session, International Association for Dental Research, March 19-23, 1997, Orlando, FL.

#### 13-4 . 国内学会発表

- 1) 松田尚樹, 横山兼久, 竹下哲史, 渡邊正己: 機械的ストレスに対する培養ヒト歯根膜細胞の応答性, 日本組織培養学会第 69 回大会, 平成 8 年 5 月 15 日-16 日, 広島.
- 2) 松田尚樹: ヒト歯根膜細胞の骨性分化における EGF および EGF レセプターの役割について, 第 14 回日本骨代謝学会, 平成 8 年 7 月 18 日-20 日, 大阪.
- 3) 松田尚樹, 横山兼久, 竹下哲史, 森田直子, 渡邊正己: コラーゲンおよびリン酸カルシウムとの混合スフェロイド形成によるヒト歯根膜細胞の機能変化, 日本組織培養学会第 70 回大会, 平成 9 年 5 月 22 日-23 日, 横浜.
- 4) 松田尚樹: ヒト歯根膜細胞における機械的伸長ストレス受容およびシグナル伝達機構, 第 15 回日本骨代謝学会, 平成 9 年 7 月 24 日-26 日, 大宮.

#### 13-5 . 新聞など なし

#### 13-6 . 特許

- 1) 松田尚樹, 横山兼久, 渡邊正己: 硬組織石灰化促進用材料, 特願平 09-052889, 特開平 10-243996 (平成 10 年 9 月 14 日).
- 2) 松田尚樹, 森田直子, 竹下哲史, 横山兼久, 渡邊正己: 細胞培養法, 特願平 09-054388, 特開平 10-248557 (平成 10 年 9 月 22 日).

#### 14 .

- (1) Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells in vitro.

(2) Nagasaki University Radioisotope Center

(3) Naoki Matsuda

(4) Kanehisa Yokoyama (JST at Nagasaki)

Satoshi Takeshita (Nagasaki University School of Medicine)

Masami Watanabe (Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)

(5) 1995 - 1997

(6) Abstract

Periodontal ligament (PDL) is a dense connective tissue between the cementum and the alveolar bone, and has been known to contain precursor cells for osteoblasts and cementoblasts. We demonstrated before that EGF inhibited the dexamethasone-induced differentiation and upregulated EGF-R expression, whereas EGF-R was down-regulated



in the course of differentiation. Thus we suggested that epidermal growth factor (EGF) and its receptors (EGF-R) act as a negative regulator of osteoblastic differentiation in PDL cells. In order to further investigate our hypothesis, in this study we used human PDL cells and elucidated the role of EGF and EGF-R in proliferation and differentiation of these cells in mechanical stress-loaded conditions *in vitro*, since the PDL receives mechanical stress caused by occlusal force on a regular basis. As a model of mechanical stress, a cyclic stretch of 9% or 18% elongation was applied to the cells using a Flexercell cell strain unit system. Alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin mRNA expression were significantly induced by loading cyclic stretch for more than 4 days, whereas cyclic stretch slightly inhibited cell proliferation. Visualization of actin stress fibers of the cells by rhodamine phalloidin revealed that approximately 10% of total cells became aligned perpendicular to the direction of the stretch. The effects of stretch on ALP activity and cell proliferation were totally abolished by the presence of 10ng/ml EGF. Western blotting of EGF-R protein demonstrated that stretch-induced differentiation accompanied the decreased expression of EGF-R protein in the cells. However, the amount of tyrosine-phosphorylated EGF-R upon EGF-stimulation was restored to the control level in stretched cells. These results suggested that the EGF/EGF-R system acts as a negative regulator of differentiation of PDL cells regardless of the type of differentiation stimuli. Also, cross-talk between mechanical stress and the EGF/EGF-R system may play a role in osteoblastic differentiation of PDL cells and thereby, regulate the source of cementoblasts and osteoblasts.