

## 論 文 要 旨

**Hyperosmotic Stress Induces Cell Death  
in an Odontoblast-lineage Cell Line**

Odontoblast-lineage Cell Line において  
高浸透圧ストレスは細胞死を誘導する

藤 澤 真 理

**【序論および目的】**

象牙質知覚過敏症 (Dentin Hypersensitivity) は、生活歯において象牙質の露出をきたし、様々な刺激による知覚亢進を主症状とする硬組織疾患である。原因としては露出した象牙質に機械的・化学的・温度などの刺激が加わることで、開口している象牙細管内の組織液が動き、歯髄側の神経線維を刺激する動水力学説が考えられている。しかし刺激に対して最前線で応答する象牙芽細胞の痛みの伝達メカニズムはいまだに明らかにされていない。

我々は今回種々の刺激のなかでも浸透圧に着目し、象牙芽細胞へ及ぼす影響について調べた。常に細胞内外の浸透圧の変化を感知している腎臓・肺・角膜などの組織においては、高・低浸透圧下での様々な細胞応答が報告されている。しかし、象牙芽細胞に対する浸透圧の直接的な影響はほとんど解明されていない。そこで我々は、高浸透圧刺激物質として、甘味痛の原因と考えられるスクロースを用い、高浸透圧刺激が象牙芽細胞に及ぼす影響について検討を行った。

**【材料および方法】****<象牙芽細胞の培養と浸透圧刺激の条件>**

マウス歯胚から分離培養した odontoblast-lineage cell line; OLC (Arany S. et. al: Biochem. Biophys. Res. Commun. 342:718-724, 2006) を、10% FBS 添加 D-MEM で培養した。実験には 5 ~ 15 代までの細胞を用いた。

通常培地 (浸透圧 (330 mOsm)) を 1M スクロースにて、500, 600, 700, 800, 900, 1000 mOsm に調整したものを作成し、高浸透圧刺激用培地として用いた。

**<高浸透圧刺激下での細胞応答の検討>**

- 1) Odontoblast-lineage cells (OLCs) における dentin sialophosphoprotein (DSPP), dentin matrix protein 1 (DMP 1) の発現の確認と、高浸透圧下における発現の増減を RT-PCR 法にて解析した。
- 2) 高浸透圧下での、0, 1, 3, 6, 12, 24 時間後までの生存率を MTT assay にて検討した。
- 3) 高浸透圧刺激後 3 時間の細胞の変化、および DAPI による核染色後の核形態の変化を光学顕微鏡下で観察した。
- 4) 高浸透圧刺激 3 時間後に、総タンパクを回収し、cleaved caspase-3 の活性化をウェスタンブロット法にて解析した。また、スクロース 500 mOsm 刺激、0, 1, 3, 6, 12, 24 時間後の cleaved

caspase-3 の活性化もウェスタンブロット法にて解析した。さらに、細胞死の程度を Flow cytometry を用いて解析した。

- 5) 高浸透圧刺激後、細胞から総タンパクを回収し、MAPKs (p38, JNK, ERK) のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。また、MAPKs に対する阻害剤 (U0126, SB203580, SP600125) を添加した場合の、浸透圧刺激後の生存率の変化も検討した。

## 【結果】

1. OLCs において DSPP, DMP-1 の発現を認め、高浸透圧刺激ではそれらの発現の増減は認めなかった。
2. OLCs において、スクロース 600 mOsm 以上では刺激後 3 時間で、急激に生存率が低下し、細胞形態、核形態も変化した。
3. OLCs において、高浸透圧刺激後 3 時間より、活性型 caspase-3 の発現量の上昇を認めた。また、スクロース 500 mOsm 刺激後 3, 6 時間で活性型 caspase-3 の発現量の上昇を認めた。
4. OLCs において、高浸透圧刺激後 3 時間で、Annexin V positive-cell は認めなかったが、PI positive-cell の割合が増加した。
5. 各種リン酸化 MAPKs はスクロース 500 mOsm で発現量の上昇を認めた。また、p38, JNK に対する阻害剤を作用させると、スクロース 700 mOsm で生存率の低下が有意に抑制された。

## 【結論及び考察】

細胞に対する浸透圧の及ぼす影響は、腎臓・角膜・肺など、常時シビアな浸透圧変化にさらされている臓器においては以前より様々な研究が行われている。浸透圧刺激による細胞応答としては、細胞膜の伸展・収縮、mechanical sensor の活性化、炎症反応、Heat shock protein、細胞死など様々なものが報告されている。しかし、象牙質は通常エナメル質に覆われており、直接口腔内の浸透圧変化にさらされる環境にはない。それゆえ、象牙質に対する浸透圧刺激の直接的な研究はほとんど行われていない。

象牙質知覚過敏の原因としては、露出した象牙質に機械的・化学的・温度などの刺激が加わることで、開口している象牙細管内容液が動き、歯髄側の神経線維を刺激する動水力学説が有力である。我々は今回、機械的刺激の中でも、甘味痛すなわちショ糖 (スクロース) による浸透圧に着目して研究を行った。

今回の結果より、象牙芽細胞はスクロースによる高浸透圧刺激には、ある一定のライン (スクロース 500 mOsm) までは耐えうるが、それ以上の刺激では、細胞死の方向へ向かうことが示された。またその過程には、MAPKs, caspase-3 などが関与していることが示唆された。

実際の砂糖含有飲食物の浸透圧は、飲料水でも isotonic を表示しているもの以外は 400~500 mOsm を超えるものが多く、チョコレートやキャンディなどの浸透圧は 1000 mOsm を超える。摂取されたショ糖を含む飲食物が継続して露出した象牙質に触れることで、象牙芽細胞へ何らかのダメージを与え、それが象牙質知覚過敏の発生に関与していると考えられる。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 194 号	学位申請者	藤澤 真理
審査委員	主査	於保 孝彦	学位
	副査	松口 徹也	副査
	副査	三浦 裕仁	副査
			博士 (歯学)
			杉原 一正
			松山 孝司

### Hyperosmotic Stress Induces Cell Death in an Odontoblast-lineage Cell Line (Odontoblast-lineage Cell Line において高浸透圧ストレスは細胞死を誘導する)

象牙質知覚過敏症 (Dentin Hypersensitivity) は、生活歯において露出した象牙質への、様々な刺激に対する知覚亢進を主症状とする硬組織疾患である。原因としては象牙質に機械的・化学的・温度などの刺激が加わることで、開口している象牙細管内の組織液が動き、歯髄側の神経線維を刺激する動水力学説が考えられている。しかし刺激に対して最前線で応答する象牙芽細胞の痛みの伝達メカニズムはいまだに明らかにされていない。そこで、学位申請者らは、種々の刺激の中でも浸透圧に着目し、高浸透圧刺激物質として甘味痛の原因と考えられるスクロースを用い、高浸透圧刺激が象牙芽細胞に及ぼす影響について検討を行った。供試細胞として、マウス歯胚から分離培養した odontoblast-lineage cell line ; OLC を用いた。象牙芽細胞特有の DSPP, DMP1 の発現を RT-PCR を用いて確認した。高浸透圧刺激下 (500, 600, 700, 800, 900, 1000 mOsm) での細胞の変化として、生存率を MTT assay にて、細胞形態・核形態の変化を顕微鏡にて観察した。細胞死の指標として、caspase-3 の活性化をウェスタンブロット法にて解析し、細胞死の程度を Annexin V, PI を指標に Flow cytometry を用いて解析した。さらに、MAPKs の活性化をウェスタンブロット法にて解析し、生存率への影響を MTT assay により解析した。

その結果、OLCs について以下の知見が明らかになった。

- 1) DSPP, DMP1 の発現が認められたが、両因子の高浸透圧刺激による発現の増減は認めなかった。
- 2) 500 mOsm を超える高浸透圧刺激で、刺激後 3 時間で急激に生存率が低下し、細胞形態、核形態も変化した。
- 3) 高浸透圧刺激後 3 時間より、活性型 caspase-3 の発現量の上昇を認めた。また、スクロース 500 mOsm 刺激後 3, 6 時間で活性型 caspase-3 の発現量の上昇を認めた。
- 4) 高浸透圧刺激後 3 時間で、PI-positive cell の割合が増加した。
- 5) 各種リン酸化 MAPKs は 500 mOsm で発現量の上昇を認めた。また、p38, JNK, ERK に対する阻害剤を作用させると、700 mOsm で生存率の低下が有意に抑制された。

象牙芽細胞は 500 mOsm を超える高浸透圧刺激では、細胞死の方向へ向かうことが示された。またその過程には MAPKs, caspase-3 などが関与していることが示唆された。スクロースを含む飲食物が継続して露出した象牙質に触れることで、象牙芽細胞へ何らかのダメージが加わる。それが象牙質知覚過敏の発生に関与していると考えられ、今後高浸透圧による細胞死がどのように痛みへ続くシグナルを発生させているかを研究する必要がある。

本研究は象牙芽細胞における高浸透圧の及ぼす影響を調べたものであり、その結果スクロースによる高浸透圧刺激は象牙芽細胞を細胞死へ導くことが明らかとなった。象牙質知覚過敏症による痛みの発生メカニズム解明に繋がる研究であり、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 194 号	学位申請者	藤澤 真理
審査委員	主査	於保 孝彦	学位
	副査	松口 徹也	副査
	副査	三浦 裕仁	副査
			博士 (歯学)
			杉原 一正
			松山 孝司

主査および副査の5名は、平成24年5月9日、学位申請者 藤澤 真理 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 動水力学説では象牙細管内容液の動きにより、神経を刺激するが、今回の研究では細胞死が直接神経を刺激するという事か？

(回答) 象牙芽細胞が細胞死に至るときに放出するシグナルや物質 (HMGB1 など) が神経を刺激すると考えている。

質問2) 今回は in vitro での研究だが、実際の口腔内では高浸透圧刺激がどのように影響すると考えているか？

(回答) 市販の砂糖含有飲食物はかなりの高浸透圧であり、深いカリエスなどでは、今回の結果に類似して、象牙芽細胞は何らかのダメージを受けると考えている。

質問3) Flow cytometry で高浸透圧刺激により、Annexin V は観察されず、PI のみ観察されたのはなぜか？

(回答) 実験操作の不慣れもあったと思う。PI positive cell の割合は増加しており、細胞形態の崩壊は認めたので、細胞死へ向かっていることは確認できた。

質問4) caspase-3 の活性化は 1000 mOsm では低下しているが、なぜか？

(回答) 800~1000 mOsm の高浸透圧下では 3 時間よりも早い段階で細胞死が起きており、タンパク量が少なくなっていると考えられる。

質問5) MAPKs inhibitor を用いて 1 時間前処理しているが、刺激の際は inhibitor は加えなかったのか？刺激時に加えておけばより効果があったのではないか？

(回答) 刺激の際は inhibitor は除きました。刺激時に inhibitor が存在していれば、また違った傾向がみられたかもしれない。

質問6) 500 mOsm 刺激で caspase-3 の活性化を認めているが、cell viability は維持している。これは矛盾しているのでは？

(回答) 論文には出ていないが、600 mOsm から生存率は低下する。500 mOsm という刺激は、象牙芽細胞が生存できる限界のラインなのではないかと考えている。

質問7) OLCs において、DSPP, DMP1 の確認をしているが、これで象牙芽細胞といえるのか？

## 最終試験の結果の要旨

(回答) 両者とも一般的な象牙芽細胞のマーカーであり、OLCs の象牙芽細胞としての同定に用いた。

質問 8) apoptosis と確定するには他にどのような実験方法が考えられるか?

(回答) DNA ladder を試みたが、良い結果が得られなかった。

質問 9) 他の種類の細胞でも高浸透圧刺激がダメージを与えるのか?

(回答) 腎臓、眼、肺などの細胞では浸透圧刺激が炎症反応を引き起こしている。

質問 10) この実験を始めたきっかけは何か?

(回答) 高浸透圧刺激による生存率の変化を調べるうちに、細胞がどのように死へ導かれるのかについて研究しようと考えた。

質問 11) 象牙芽細胞は特に浸透圧刺激に弱い細胞なのか? 他の細胞の挙動は?

(回答) 特に象牙芽細胞が浸透圧に弱いとは考えていない。他の細胞として歯髄細胞は、象牙芽細胞と類似した挙動を示した。また、腎臓の細胞などでは、許容できる浸透圧の範囲はかなり広いとの報告がある。

質問 12) 炎症性サイトカインなどの検討は行ったのか?

(回答) 高浸透圧刺激を行い、ELISA にてサイトカインの解析を行ったが、今回の刺激条件下では、IL-6 の産生がわずかに上昇したのみであった。

質問 13) 前培養やコントロールにおいて、FBS を除くと細胞はかなりのダメージを受けるのではないか?

(回答) 予備実験で FBS を加えたものでは、コントロールとの差がうまく出なかったため、今回は細胞をシビアな条件下において、スクロースの影響を調べた。確かに FBS 0% の影響は大きいと考えられるため、FBS 0.5%, 1.0% などの検討も行うべきであった。

質問 14) 今回はスクロースを用いて浸透圧を変化させているが、象牙芽細胞はスクロースを炭素源として用いることができるか?

(回答) 炭素源としては利用できないと考えている。今回はスクロースを有効な浸透圧物質として用いた。

質問 15) 論文ではキシリトールについて触れてあるが、キシリトールでも浸透圧は操作出来るのか? また今回の結果との違いは何か?

(回答) キシリトールでも浸透圧は変化させられる。スクロースと同条件で刺激を行ったが、キシリトールの場合は生存率が保たれていた。

質問 16) 500 mOsm では生存率の低下が認められないが、MAPKs inhibitor を作用させると生存率が上昇している。この意味は?

(回答) この点に関する解釈は難しかった。他の浸透圧では、高浸透圧刺激による細胞死を inhibitor により回復させている傾向を認めたが、500 mOsm に関しては異なるプロセスで生存率が上昇しているのではないかと考えられる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。