

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	塩見 晶
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第305号
学位授与の日付	平成26年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Cyclic mechanical pressure loading alters epithelial homeostasis in a three-dimensional in vitro oral mucosa model: Clinical implications for denture-wearers (反復加圧刺激が口腔粘膜上皮の恒常性に及ぼす影響について - 義歯装着が口腔粘膜上皮に及ぼす影響 -)
論文審査委員	主査 教授 野村 修一 副査 教授 泉 健次 副査 准教授 大峽 淳

博士論文の要旨

緒言 現在日本は超高齢社会となり、喪失歯に対する補綴処置の必要性はますます拡大してきている。年齢あたりの残存歯数は増加し、デンタルインプラントの需要が増えてはいるが、可撤性義歯の装着総数は2030年まで増加するとの予測が出ている。患者のQOL向上のために可撤性義歯の装着とその後のメンテナンスは必須であり、歯科医師が義歯の支持組織の変化を把握することは重要である。

義歯床下粘膜は角化重層扁平上皮を有し、その主たる機能は外界からの物理的および化学的、生物学的刺激からの保護作用である。粘膜上皮の変化についてはヒトや動物を用いた組織学的観察が報告されているが、正角化や上皮の肥厚が報告されている一方で錯角化や角化層の減少も報告されており、見解は一致していない。

そこで本研究では、独自に開発した、圧縮空気により反復加圧刺激を培養細胞に加える装置を用いて、義歯装着を想定し口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞を共培養した口腔粘膜モデル(three-dimensional oral mucosa model, 3DOMM)に生ずる組織学的変化と細胞応答について明らかにすることを目的とし、義歯床下粘膜に起こりうる変化を検討した。

材料と方法

インフォームドコンセントを得た患者から採取した口腔粘膜から、口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞を単離し、それぞれ連続培養した。反復加圧刺激下での上皮細胞と線維芽細胞の代謝活性について、WST-8 kit を用いて細胞増殖測定試験を行った。3DOMM は、線維芽細胞混合コラーゲンを7日間液相培養した後、上皮細胞をゲル上に播種し、液相培養と気相-液相培養を各7日間行い作成した。気相-液相培養の間、培養細胞圧縮装置を用いて3DOMMに反復加圧刺激(50kPa)を加えた。完成した3DOMMは4%パラホルムアルデヒド溶液にて固定後パラフィン切片を作成し、H-E染色にて組織学的観察を行い、p63, Ki-67, filaggrin, involucrin, integrin β 1, laminin, type IV collagen を用いて免疫組織化学的に検討した。Ki-67陽性細胞率(%)を基底層細胞数に対する陽性細胞数から求め、paired t-test ($p < 0.05$)を用いて統計処理を行った。

結果

WST-8 kit を用いた上皮細胞と線維芽細胞の代謝活性の定量では反復加圧刺激による有意な違いは見られなかった。H-E染色においては非加圧群、加圧群とも線維芽細胞を含んだコラーゲンゲル上に角化層を有した重層扁平上皮が形成されていたが、若干加圧群の細胞の扁平化がみられた以外に組織学的に明らかな違いは見られなかった。一方で、免疫染色では様々なタンパクの発現パターンに違いが見られた。転写因子である p63 陽性細胞は非加圧群において基底細胞と上基底細胞に見られたが、加圧群においては基底細胞と傍基底細胞に限局して見られた。増殖マーカー

一である Ki-67 陽性細胞は非加圧群に比べ、加圧群で有意に減少していた。上皮の分化マーカーである filaggrin と involucrin は、非加圧群では発現がまばらであったが、加圧群では顆粒層における発現が亢進していた。一方、上皮結合組織間領域において integrin $\beta 1$ は、非加圧群では基底細胞と傍基底細胞に発現していたが、加圧群では基底細胞に発現が限局していた。基底膜構成成分である laminin は、非加圧群では基底細胞とコラーゲンゲルとの間に連続した線状に発現していたが、加圧群では基底細胞の細胞質に発現していたものの、細胞外気質への沈着はほとんどみられなかった。また、type IV collagen は、非加圧群では基底細胞とコラーゲンゲルとの間に発現していたが、加圧群ではほとんど発現が認められなかった。

考察

反復加圧刺激による組織学的変化がほとんど認められなかったことは、義歯装着者において粘膜上皮の角化様式や厚さの変化を示した過去の *in vivo* での研究結果とは異なった。しかし、加圧群において上皮の重層化に必要とされる p63 陽性細胞の発現が減少していたことから、本実験では 3DOMM の加圧を開始した時期が早かったことを差し引いても、反復加圧刺激によって重層化過程はいずれ抑制されることが考えられた。加圧刺激に対する早期の反応として基底細胞の増殖能の抑制が起こることが明らかとなった。さらに分化の過程は障害されないと考えられたが、分化そのものは亢進あるいは早まっていたことが明らかとなった。上皮の恒常性維持に関与している Integrin $\beta 1$ の発現が加圧群では基底細胞に限局していたことから、基底細胞が上方に移動すると早期に分化することを示し、反復加圧刺激が上皮の恒常性に影響を与えることが示唆された。また、加圧群で基底膜形成に必要な integrin $\beta 1$ の発現が認められていたにもかかわらず基底膜構成成分の細胞外沈着がほとんどみられなかった所見は、基底膜形成の初期過程が阻害、遅延されたことを示し、上皮の健全性が障害されたことを示した。

結論

本実験の結果から、義歯装着は口腔粘膜上皮の恒常性および健全性に影響を及ぼすことが示唆された。このことから、外部刺激に対する感受性も増加すると考えられ、歯科医師は義歯のメンテナンス時にこのことを考慮する必要がある。

審査結果の要旨

義歯床下粘膜は角化重層扁平上皮を有し、その主たる機能は外界からの物理的および化学的、生物学的刺激からの保護作用である。粘膜上皮の変化についてはヒトや動物を用いた組織学的観察が報告されているが、正角化や上皮の肥厚が報告されている一方で錯角化や角化層の減少も報告されており、見解は一致していない。そこで本研究では、圧縮空気により反復加圧刺激を培養細胞に加える装置を独自に開発して、義歯装着を想定し口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞を共培養した口腔粘膜モデル(three-dimensional oral mucosa model, 3DOMM)に生ずる組織学的変化と細胞応答について明らかにすることを目的としている。

採取した口腔粘膜から、口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞を単離し、それぞれ連続培養した。反復加圧刺激下での上皮細胞と線維芽細胞の代謝活性について、WST-8 kit を用いて細胞増殖測定試験を行った。3DOMM は、線維芽細胞混合コラーゲンゲルを 7 日間液相培養した後、上皮細胞をゲル上に播種し、液相培養と気相 - 液相培養を各 7 日間行い作成した。気相 - 液相培養の間、培養細胞圧縮装置を用いて 3DOMM に反復加圧刺激(50kPa)を加えた。完成した 3DOMM は 4%パラホルムアルデヒド溶液にて固定後パラフィン切片を作成し、H-E 染色にて組織学的観察を行い、p63, Ki-67, filaggrin, involucrin, integrin $\beta 1$, laminin, type IV collagen を用いて免疫組織化学的に検討した。Ki-67 陽性細胞率(%)を基底層細胞数に対する陽性細胞数から求め、paired t-test ($p < 0.05$)を用いて統計処理を行った。

WST-8 kit を用いた上皮細胞と線維芽細胞の代謝活性の定量では反復加圧刺激による有意な違いは見られなかった。H-E 染色においては非加圧群、加圧群とも線維芽細胞を含んだコラーゲンゲル上に角化層を有した重層扁平上皮が形成されていたが、若干加圧群の細胞の扁平化がみられた以外に組織学的に明らかな違いは見られなかった。一方で、免疫染色では様々なタンパクの発現パターンに違いが見られた。転写因子である p 63 陽性細胞は非加圧群において基底細胞と上基底細胞に見られたが、加圧群においては基底細胞と傍基底細胞に限局して見られた。増殖マーカーである Ki-67 陽性細胞は非加圧群に比べ、加圧群で有意に減少していた。上皮の分化マーカーで

ある filaggrin と involucrin は、非加圧群では発現がまばらであったが、加圧群では顆粒層における発現が亢進していた。一方、上皮結合組織間領域において integrin $\beta 1$ は、非加圧群では基底細胞と傍基底細胞に発現していたが、加圧群では基底細胞に発現が限局していた。基底膜構成成分である laminin は、非加圧群では基底細胞とコラーゲングルとの間に連続した線状に発現していたが、加圧群では基底細胞の細胞質に発現していたものの、細胞外気質への沈着はほとんどみられなかった。また、type IV collagen は、非加圧群では基底細胞とコラーゲングルとの間に発現していたが、加圧群ではほとんど発現が認められなかった。

これらの結果から、反復加圧刺激による組織学的変化がほとんど認められなかったことは、義歯装着者において粘膜上皮の角化様式や厚さの変化を示した過去の in vivo での研究結果とは異なった。しかし、加圧群において上皮の重層化に必要な p63 陽性細胞の発現が減少していたことから、本実験では 3DOMM の加圧を開始した時期が早かったことを差し引いても、反復加圧刺激によって重層化過程はいずれ抑制されることが考えられた。加圧刺激に対する早期の反応として基底細胞の増殖能の抑制が起こることが明らかとなった。さらに分化の過程は障害されないと考えられたが、分化そのものは亢進あるいは早まっていたことが明らかとなった。上皮の恒常性維持に関与している Integrin $\beta 1$ の発現が加圧群では基底細胞に限局していたことから、基底細胞が上方に移動すると早期に分化することを示し、反復加圧刺激が上皮の恒常性に影

響を与えることが示唆された。また、加圧群で基底膜形成に必要な integrin $\beta 1$ の発現が認められていたにもかかわらず基底膜構成成分の細胞外沈着がほとんどみられなかった所見は、基底膜形成の初期過程が阻害、遅延されたことを示し、上皮の健全性が障害されたことを示したと考察している。

本実験の結果から、義歯装着は口腔粘膜上皮の恒常性および健全性に影響を及ぼすことが示唆された。このことから、外部刺激に対する感受性も増加すると考えられ、歯科医師は義歯のメンテナンス時にこのことを考慮する必要があると結論を出している。

以上の様に、本研究は圧縮空気による反復加圧刺激を培養細胞に加える培養細胞圧縮装置を独自に開発して、口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞を共培養した口腔粘膜モデル (three-dimensional oral mucosa model, 3DOMM) に生ずる組織学的変化と細胞応答を明らかにしている。義歯床下粘膜に起こりうる変化を探究する先駆的研究モデルを構築した内容であり、ここに博士論文としての価値を認める。