

氏名・(本籍)	有 路 博 彦 (宮城県)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第71号
学位授与の日付	平成11年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	細胞外カルシウム濃度と間葉系細胞のBMP産生
論文審査委員	主 査 教 授 賀 来 亨 副 査 教 授 武 田 正 子 副 査 教 授 田 隈 泰 信

論 文 内 容 の 要 旨

〈緒 言〉

細胞内カルシウム濃度は生体の機能維持において重要な因子であり、その濃度の上昇は種々の間葉系細胞の細胞増殖を促進させることが知られている。ハイドロキシアパタイト (リン酸カルシウム) は歯科インプラント材料や骨補填材として広く用いられており、犬の皮下にそれを移植すると稀に異所性の骨形成が見られることがあるとの報告がある。加えて、異所性の骨化には通常、異所性の石灰化が先行し、歯科領域においても歯髄露出面に水酸化カルシウムを応用すると骨様象牙質の形成が促進されとの報告がある。一方、bone morphogenetic proteins (BMPs) はin vivoにおいて異所性の骨形成を誘導する代表的な蛋白群であることから、細胞外カルシウム濃度の上昇が間葉系細胞のBMPsの産生を高め、オートクリン、パラクリンに働き、間葉系細胞から骨芽細胞への分化を誘導し、異所性の骨形成に関与するとの仮説を立てた。

本研究は、in vitroにおける細胞外カルシウム濃度の上昇がヒト正常歯肉由来線維芽細胞の細胞増殖、細胞分化、BMP-2, 4, 5およびTGF- β_1 の産生に及ぼす影響を調べることを目的に行われた。加えて、in vitroにおいてラット腹直筋の器官培養における細胞外カルシウム濃度の上昇がBMP-2, 4, 5の遺伝子発現に与える影響も調べた。

〈方 法〉

1. 細胞培養：細胞は継代3-6代のヒト正常歯肉線維芽細胞 (以下HFB-G) を用い、10% calf serum添加DMEM (10CS-DMEM) で培養した。

2. 細胞増殖：細胞外カルシウム濃度の上昇 (0-1.2 mM) はCaCl₂をDMEM (CaCl₂濃度; 1.8mM) に添加することによって行った。細胞外カルシウム濃度の上昇がHFB-Gの細胞増殖に及ぼす影響を [³H] thymidineの取り込みを指標とした細胞増殖assayにより調べた。

3. 細胞分化に及ぼす影響：細胞カルシウム濃度の上昇がHFB-Gの細胞分化に及ぼす影響はpNPPを基質とした細胞ALP assayにより濃度依存性に調べた。なお、細胞ALP活性は細胞蛋白量当たりの値として算出した。

4. BMP-2, 4, 5およびTGF- β_1 のm-RNAの遺伝子発現に及ぼす影響：細胞外カルシウム濃度の上昇がHFB-GのBMP-2, 4, 5およびTGF- β_1 のm-RNAの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法により、短時間作用 (0.5h) および長時間作用 (24h) について半定量的に調べた。なおtotal RNAの抽出はAcid-guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform法により行いRNAを逆転写酵素でcDNA転換した後、PCRを行った。さらに、細胞外カルシウム濃度の低下がBMP-2, 4, 5のm-RNAの遺伝子発現に及ぼす影響をEGTA (0-0.5mM) を添加し同様の方法で検討した。

5. 細胞外カルシウム濃度の上昇がHFB-GのBMP蛋白産生に及ぼす影響：RT-PCR法による検討において細胞外カルシウム濃度の上昇はHFB-GのBMP-2, 4のmRNAの発現を増加させた。そのうち、抗体が入手でき、ドットブロッキング法に使用可能な抗体は、抗ヒトBMP-2抗体 (米国、ジェネティック社より供与) のみであった。従って、細胞外カルシウム濃度の上昇がHFB-GのBMP分泌に及ぼす影響はBMP-2に関してのみ検討可能であり、ドットブロッキング法により検討した。な

おCaCl₂の作用時間は24時間とした。

6. ラット腹直筋器官培養における細胞外カルシウム濃度の上昇がBMPsの遺伝子発現に及ぼす影響：細胞外カルシウム濃度の上昇がラット腹直筋器官培養におけるBMPsの遺伝子発現に及ぼす影響について調べるため10周齢ラットを屠殺し、直ちに腹直筋を摘出、1×5×5mm大に細切し、生理的食塩水で約5分間洗浄したものをを用いた。その後、種々のカルシウム濃度(1.8–3.0mM)に調節された0.01%BSA添加DMEMにて、短時間(0.5h)および長時間(24h)器官培養を行い、細胞外カルシウムの上昇がBMPs(BMP-2, -4, -5)のm-RNAの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法によって半定量的に調べた。なお、RNAの抽出は組織を液体窒素にて凍結した状態で、ダイヤトン社製凍結プレス粉碎装置(CP-100W)にて粉碎後、先に述べた方法で行った。

〈結 果〉

1. 0.1–1.2mMの細胞外カルシウムの上昇はHFB-Gにおいて細胞増殖を濃度依存性に有意に増加させた。
2. 細胞外カルシウムの上昇はHFB-GのALP活性に関しては有意な効果は及ぼさなかった。
3. 0.1–0.4mMの細胞外カルシウムの上昇はHFB-GにおいてBMP-2, -4のm-RNAの発現を短時間および長時間作用ともに増加させたが、BMP-5とTGF- β_1 については増減させる効果は認められなかった。
4. 0.1–0.5mMのEGTAの添加はBMP-2, -4のm-

RNAの発現を減少させたが、BMP-5とTGF- β_1 については増減させる効果は認められなかった。

5. ドットプロット法により、0.4–1.2mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はBMP-2の産生を約3倍まで増加させた。
6. 0.1–0.4mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はラット腹直筋の器官培養において、0.5時間作用においてBMP-4のm-RNAの発現の増加させたが、24時間作用においては増加させる効果は認められなかった。なお、BMP-2, 5においてはラット腹直筋においてそれらのmRNAの発現自体認められず、検討不可能であった。

〈結 論〉

1. 細胞外カルシウム濃度の上昇は長時間にわたり、正常ヒト歯肉由来線維芽細胞のBMP-2, 4のmRNAの発現を上昇させる。
2. 細胞外カルシウム濃度の上昇はラット腹直筋の器官培養において、一過性にBMP-4のm-RNAの発現の増加させる。

〈考 察〉

本研究の結果は、細胞外カルシウム濃度の上昇が間葉系細胞のBMPsの産生を高め、オートクリン、パラクリンに働き、間葉系細胞から骨芽細胞への分化を誘導し、異所性の骨形成に関与するという仮説を支持する結果と考えられる。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

ハイドロキシアパタイト(リン酸カルシウム)を犬の皮下に移植すると稀に異所性の骨形成が見られるとの報告があるが、その機序については全く明らかにされていない。本研究ではbone morphogenetic proteins(BMPs)はin vivoにおいて異所性の骨形成を誘導する代表的な蛋白群であることから、細胞外カルシウム濃度の上昇が間葉系細胞のBMPsの産生を高め、オートクリン、パラクリンに働き、間葉系細胞から骨芽細胞への分化を誘導し、異所性の骨形成に関与するとの仮説を立てた。一方、最近、細胞外カルシウムの上昇は正常ヒト骨芽細胞においてBMP-2, 4, 5のmRNAの発現を増加するとの報告があるが、他の間葉系細胞のBMPsの遺伝子発現に及ぼす影響についての報告はない。本研究は、in vitroにおける細胞外カルシウム濃度の上昇が歯肉由来ヒト正常線維芽細胞の細胞増殖、細胞分化、BMP-2, 4, 5およびTGF- β_1 の産生に及ぼす影響を調べることを目的に行われた。加えて、ラット腹直筋の器官培養にお

ける細胞外カルシウム濃度の上昇がBMP-2, 4, 5の遺伝子発現に与える影響を調べた。結果は以下のとおりである。

1. 0.1–1.2mMの細胞外カルシウムの上昇は歯肉由来ヒト正常線維芽細胞(HFB-G)の細胞増殖に有意に増加させた。
2. 細胞外カルシウムの上昇はHFB-GのALP活性を有意に刺激しなかった。
3. 0.1–0.4mMの細胞外カルシウムの上昇はHFB-GにおいてBMP-2, -4のm-RNAの発現を短時間および長時間の作用により共に増加させた。
4. EGTAの添加による細胞外カルシウム濃度の低下はBMP-2, -4のm-RNAの発現を減少させた。
5. 0.4–1.2mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はBMP-2の培地中への産生を増加させた。
6. 0.1–0.4mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はラット腹直筋の器官培養において、0.5時間作用においてBMP-4のm-RNAの発現を増加させたが、24時間作用においては増加させる効果は認められなかった。

本研究は、細胞外カルシウム濃度の上昇が骨芽細胞以

外の間葉系細胞においてもBMPの産生を上昇させることを初めて示し、細胞外カルシウム濃度の上昇と異所性の骨化との関わりを示唆する研究と考えられ、BMPsを骨以外の組織に臨床応用する上で、有意義な研究と思われる。

れた。

以上のことより、本論文は病理学および歯科医学の進歩発展に寄与するところが大きく、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	河 合 拓 郎 (愛知県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第72号
学位授与の日付	平成11年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	三叉神経電気刺激による副腎髄質機能に及ぼす影響
論文審査委員	主 査 教 授 新 家 昇 副 査 教 授 猪 股 孝四郎 副 査 教 授 金 子 昌 幸

論文内容の要旨

I 緒 言

高齢社会に伴い、歯科を受診する高齢患者は年々増加している。このような高齢患者は循環器系疾患を有していることが多く、安全な歯科治療を行うためには、治療前の十分な全身評価および治療中・治療後の管理が重要である。特に、歯科治療における偶発症の発症や基礎疾患の増悪は、三叉神経への痛み刺激が交換神経系に影響して生じると考えられている。そこで、本研究の目的は三叉神経領域への侵害性刺激に対する循環動態および副腎髄質機能の影響を知るために検討した。すなわち、ハロタン吸入下ラットにおいて、三叉神経第II枝である上顎神経末梢部に電気刺激を与え、その前後の心拍数および血圧の変動を測定し、同時に副腎カテコールアミン分泌速度の変動を測定した。

II 方 法

Wistar系雄性ラット (8~14週齢) を用い、刺激群および無刺激群の2群にわけ比較検討した。麻酔導入はハロタンで行い、その後臭化パンクロニウムを1mg腹腔内に投与し不動化して気管切開を行った。呼吸管理は人工呼吸器を用いて、呼吸回数70回/分、一回換気量14ml/分で行った。麻酔維持はルームエアー下0.5%ハロタンにて

行った。体温は36°C~37°Cで体温保持装置を用いて維持した。

血圧は0.1%ヘパリン添加生理食塩水で満たした留置針を右大腿動脈に挿入して圧トランスデューサーを介して血圧測定アンプにて測定した。心拍数は針電極を四肢に刺入して心電図記録を行い、R-R間隔より計測した。

副腎静脈採血の前準備として開腹切開した。その後実態顕微鏡下で副腎静脈にチューブを挿入し、経時的にヘマトクリット毛細管で40 μ l採血した。

採血した試料は12,000回転、5分間、遠心分離を行った。その上清を10 μ l採取し、500倍希釈した。希釈した試料はマレイミド/ほう酸水溶液と1.0Mの亜塩素酸で除蛋白して、0.4Mのほう酸カリウムでpH2~4に調整し、遠心分離後、その上清液を高速液体クロマトグラフィーへ注入した。カテコールアミン基に結合するジフェニルエチレンジアミンに自動的にラベルされた後、蛍光検出器で血漿カテコールアミン濃度を測定した。測定後、副腎のカテコールアミン分泌速度をヘマトクリット値、副腎静脈血流量、体重から求めた。

刺激電極に歯科用リーマーを用い、刺激部位を三叉神経第II枝 (上顎左右切歯歯髄) に設定した。上顎左右切歯を露髄させた後、刺激電極を約10mm挿入した。歯科用即時重合レジンで絶縁し、電気刺激装置に接続した。電