

**Basic-FGFとTGF- $\beta$  がヒト歯槽骨由来骨芽細胞様細胞の増殖・分化に及ぼす作用(北海道大学博士論文の内容および審査の結果要旨(平成13年度))**

著者名(日)	島袋 鎮太郎
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	1
ページ	150-152
発行年	2002-06-30
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00008693/">http://id.nii.ac.jp/1145/00008693/</a>

## 学位論文審査の要旨

小児歯科臨床においては、エナメル質の初期う蝕である白斑の形成がしばしば観察される。これは表層下脱灰状態を特徴としており、表層の高石灰化層は歯質表面から口腔内へのイオンの遊離を防ぎ、歯質内での再石灰化が可能な微小環境を保持していると考えられる。さらに、この表層下脱灰病変は、適切な処理により健全歯への回復が可能であるといわれている。このため、様々なプロフェッショナルケアが試みられており、フッ化物の応用をはじめ、最近ではキシリトールなども注目されている。キシリトールには唾液分泌を促進する作用があり、その唾液自身の再石灰化能によって、唾液の影響が大きいとも考えられている。しかし、キシリトール自体の再石灰化能の存在については不明である、今後の詳細な検討が必要である。一方、フッ素とキシリトールを併用した場合についての再石灰化現象とその機序についても未だ不明な点が多い。そこで本研究では、永久歯エナメル質初期う蝕病変の再石灰化に及ぼすフッ素およびキシリトールの影響について解明することを目的として行った。表層下脱灰の観察にはSingle thin section法、およびpH-cycling法を用いたin vitro人工う蝕モデルを応用し、再石灰化過程を種々の条件下で検討した。得られた結果は

次の通りである。

1. 再石灰化のCMRによる測定では、NaF群、キシリトール+NaF群で、有意な再石灰化が認められた。
2. キシリトール単独の再石灰化能については本実験では確認できなかった。
3. 表層下脱灰部の構造は、正常なエナメル小柱が失われ、針状、板状の構造が認められ、再石灰化処理後では大型の棒状、板状の構造が出現した。
4. 微小領域X線回析による結晶の同定を行ったところ、健全エナメル質、表層下脱灰部、表層下再石灰化部、エナメル質表層の付着生成物は、その大部分がハイドロキシアパタイトであると同定された。

以上より、初期う蝕病変の再石灰化にはフッ化物が重要な役割を果たし、キシリトールはフッ素による再石灰化を促進する傾向を示した。また、再石灰化エナメル質各部位のSEMによる構図は異なっていたが、微小領域X線回析による結晶の分析より、大部分がハイドロキシアパタイトであると判断された。

これらの結果は歯科医学、特にう蝕学の進歩発展に寄与するところ大であり、よって審査の結果、本論文は博士（歯学）の学位を授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	島袋 鎮太郎 (沖縄県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第94号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	<b>Basic-FGFとTGF-<math>\beta</math>がヒト歯槽骨由来骨芽細胞様細胞の増殖・分化に及ぼす作用</b>
論文審査委員	主査 教授 五十嵐 清 治 副査 教授 矢 嶋 俊 彦 副査 教授 賀 来 亨

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

顎の成長・発育に関する研究は、咀嚼機能の発達にも

関わる重要な研究課題である。顎を構成する骨体部と歯槽骨の骨形成に中心的な役割を担っている骨芽細胞の増殖と分化の制御メカニズムは、多くの因子が関与する複

雑な系であり、未解明な部分も多く残されている。細胞の増殖と分化には多くの増殖因子の関与が確認されているが、basic Fibroblast Growth Factor (以下bFGF) とtransforming growth factor- $\beta$  (以下TGF- $\beta$ ) も骨形成において重要な役割を担う増殖因子のひとつである。bFGFは骨芽細胞において増殖促進、分化抑制に働くといわれている。またTGF- $\beta$ は、細胞の種類や培養条件、添加濃度などによって異なる研究結果がみられ、例えば正常ラットの胎児より得た骨芽細胞を用いた研究では、その増殖を促進するとともに、コラーゲンの合成など分化機能も促進するという骨形成に対して必要な2つの機能をもつといわれている。しかしヒト由来の正常骨芽細胞様細胞ではその作用は明確にされていない。また、bFGFとTGF- $\beta$ を共存下で添加した場合の骨芽細胞の応答に関しても明らかにされていない。そこで、本研究ではbFGFとTGF- $\beta$ がヒト歯槽骨由来骨芽細胞様細胞 (human alveolar bone-derived cells; 以下HAB cells) の増殖・分化に与える効果を検討した。

#### [材料および方法]

1. 細胞培養；細胞は9歳の男児から得られた健全な上顎正中中部歯槽骨をcollagenase処理した後、培地中に静置し、遊走した細胞を継代培養した。また実験には、継代2～9代の細胞を使用した。なお、基本培地としては加熱不活性化処理 (50°C 15min) した10%Fetal-bovine serum (FBS), 0.25mM L-アスコルビン酸-2-リン酸, および100U/mlペニシリン, 100 $\mu$ g/mlストレプトマイシン添加D-MEMを用いた。さらに2.5ng/ml bFGF, 0.5または1.0ng/ml TGF- $\beta$ を各々単独, あるいは共存下で投与し, 以下の実験を行った。
2. bFGFとTGF- $\beta$ がHABの細胞増殖に及ぼす影響；HAB cellsに対して2.5ng/ml bFGFおよび0.5または1.0ng/ml TGF- $\beta$ を各々単独, あるいは共存下で1日おきに投与し, 投与後10日目にDiaminobenzoic acid法を用いてDNA量を定量した。
3. bFGFとTGF- $\beta$ がHABの細胞分化に及ぼす影響；HAB cellsに対して2.5ng/ml bFGF, 0.5または1.0ng/ml TGF- $\beta$ を各々単独, あるいは共存下のそれぞれの培養条件で細胞分化に及ぼす影響を, pNPPを基質とした細胞ALP assayにより10日間培養後, ALP活性を測定した。なお, 細胞ALP活性はDNA量あたりの値として算出した。さらに, 細胞分化の指標としてType I collagen, ALP, Osteocalcinの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法により培養7日目において半定量的に調べた。
4. bFGFがTGF- $\beta$ 分泌に及ぼす影響；HAB cellsに対

してbFGFをDNA量とALP活性の測定時と同じ培養条件で添加し, 培養10日目の48時間 conditioned mediumを検体として, medium中のTGF- $\beta$ 量をELISA法により測定した。

#### [結果および考察]

1. 細胞増殖に及ぼす影響；細胞増殖はcontrolと比べてbFGFおよび0.5ng/ml TGF- $\beta$  (低濃度) では増殖を促進した。2.5ng/ml bFGF+0.5ng/ml TGF- $\beta$  (低濃度) では増殖をさらに促進させた。1.0ng/ml TGF- $\beta$  (高濃度) はcontrol, 0.5ng/ml TGF- $\beta$  と比べて増殖を抑制した。このことより2.5ng/ml bFGFと0.5ng/ml TGF- $\beta$ 細胞では増殖促進効果を有し, 共存下ではさらに増殖促進効果を有することが明らかとなった。
2. 細胞分化に及ぼす影響；ALP活性はcontrolと比べて2.5ng/ml bFGFおよび0.5ng/ml TGF- $\beta$  (低濃度) では活性を抑制した。2.5ng/ml bFGF+0.5ng/ml TGF- $\beta$  (低濃度) では活性をさらに抑制させた。1.0ng/ml TGF- $\beta$  (高濃度) はcontrol, 0.5ng/ml TGF- $\beta$  と比べて活性を促進した。mRNAレベルにおいてbFGFはOsteocalcinの発現を上昇させた。1.0ng/ml TGF- $\beta$ ではOsteocalcinの発現を抑制させた。しかし, 2.5ng/ml bFGFと1.0ng/ml TGF- $\beta$ はType I collagenとALPの発現に対し, 顕著な変化を生じなかった。このことより細胞分化の調節作用に関しては, 高濃度TGF- $\beta$ では促進的に作用し, bFGFと低濃度TGF- $\beta$ 細胞では抑制的に作用し, 共存下ではさらに抑制的に作用することが明らかとなった。
3. bFGFがTGF- $\beta$ 分泌に及ぼす影響；TGF- $\beta$ 量はcontrolと比べてbFGFではTGF- $\beta$ 量を増加させた。このことからbFGFはTGF- $\beta$ 分泌を亢進することが示された。

#### [結 論]

bFGFは, 単独ではHAB cellsの細胞増殖を促進し, 分化を抑制した。HAB cellsに対するTGF- $\beta$ の作用は濃度によって異なる挙動を示し, 0.5ng/mlでは増殖を促進し, ALP活性を抑制した。これに対し, 1.0ng/mlの濃度では増殖は抑制され, ALP活性を上昇させた。また2.5ng/ml bFGFと0.5ng/ml TGF- $\beta$  (低濃度) の共存下では増殖をさらに促進し, ALP活性をさらに抑制した。このことからbFGFとTGF- $\beta$ は増殖および分化の調節作用を有することが示された。また共存下において相加的にその作用を増強することが示された。一方, HAB cellsによるTGF- $\beta$ 分泌自体がbFGFにより調節を受けることから, 今後は両者の相互作用についてさらに検討が必

要と思われた。

### 学位論文審査の要旨

basic fibroblast growth factor (以下bFGF) と transforming factor- $\beta$  (以下TGF- $\beta$ ) は、骨形成において重要な役割を担う増殖因子のひとつである。bFGFは骨芽細胞において増殖促進、分化抑制に働くといわれている。またTGF- $\beta$ は、骨芽細胞を用いた培養実験系では、その増殖を促進するとともに、コラーゲンの合成を促進し、osteocalcinの産生を抑制するといわれている。しかしながら、増殖と分化に及ぼすbFGFとTGF- $\beta$ の機能については、細胞の種類、細胞の分化状態、細胞の採取部位および培養条件により多様な報告が現在までなされ、いまだ不明な点が少ない。特に、ヒト由来の正常骨芽細胞様細胞ではその作用は明らかにされていない、またbFGFとTGF- $\beta$ を共存下で添加した研究は見られない。そこで本研究では、bFGFとTGF- $\beta$ が単独ないし共存下でヒト歯槽骨由来骨芽細胞様細胞 (human alveolar bone-derived cells; 以下HAB) の増殖・分化に与える効果を検討したところ、以下の結果を得た。

1) bFGF (2.5ng/ml) とTGF- $\beta$  (0.5ng/ml) はHABの細胞増殖を促進し、ALP活性を抑制した。

2) TGF- $\beta$  (1.0ng/ml) はHABの細胞増殖を抑制し、ALP活性を促進した。

3) TGF- $\beta$  (0.5ng/ml) + bFGF (2.5ng/ml) はHABの細胞増殖をさらに促進し、ALP活性をさらに抑制した。

4) bFGF (2.5ng/ml) はmRNA発現に対して、Type I collagenとALPでは顕著な変化はなく、osteocalcinのmRNA発現に対し促進的に作用した。

5) TGF- $\beta$  (1.0ng/ml) はmRNA発現に対して、Type I collagenとALPでは顕著な変化はなく、osteocalcinのmRNA発現に対し促進的に作用した。

このことから、bFGFとTGF- $\beta$ がHABに対して細胞増殖および分化の調節作用を有することが考えられた。また、本研究はbFGFとTGF- $\beta$ の単独および共存下でのHABにおける作用を明らかにした最初の研究であり、bFGFとTGF- $\beta$ を顎骨領域で応用する際、有用であると考えられた。以上の結果から、本論文は歯科医学の発展に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	鈴木 崇之 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第95号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	嚥下時における舌尖固定部の変化が舌運動に及ぼす影響——超音波診断装置と筋電図による検討——
論文審査委員	主査 教授 五十嵐 清治 副査 教授 武田 正子 副査 教授 溝口 到

### 論文内容の要旨

#### 【緒 言】

正常な嚥下においては、舌は舌背正中部を陥凹させて食塊を形成し、舌尖部から順次口蓋に舌背を押しつける

ことにより食塊を咽頭へ移送する。このとき舌尖は切歯乳頭部に固定され、舌の側縁部は上顎白歯顎堤に固定される。しかし、ダウン症児などの舌突出癖のある患者においては、舌尖を固有口腔から突出させる異常な嚥下像