

北海道医療大学博士論文の内容および審査の結果要旨（平成10年度）

氏名・(本籍)	荒井 滋 朗 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第53号
学位授与の日付	平成10年 3月20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	ヒト歯肉由来線維芽細胞の接着伸展時におけるFocal contact構成蛋白およびProto-oncogeneの挙動
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 市 田 篤 郎

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

ある種の細胞は細胞外マトリックスにより細胞増殖、分化および形態変化を引き起こすことが解ってきている。細胞外マトリックスの中で特にfibronectin (FN)は、生理的にも多く存在しており、線維芽細胞をはじめとして様々な細胞の接着や遊走の促進、細胞によっては増殖や分化の促進効果などのあることが報告されている。しかし、その細胞内への伝達経路については未だ不明な点が多い。最近になり、主にFocal contact (FC) 内でFNにIntegrinを介し、Focal adhesion kinase (FAK) のチロシンのリン酸化などがこの伝達経路に関与していることを示唆する報告がなされてきているが、その詳細については明らかにされていない。また、足場依存性細胞では、細胞外マトリックスを介し、細胞が基質に接着しない限り細胞の増殖を開始しないが、この経路についても不明な点が多い。本実験ではこれらを明らかにするために、ヒト歯肉由来線維芽細胞を用い、FNコートおよび非コートのCulture dish上での細胞形態の変化、その時のFC蛋白の挙動、特にチロシンリン酸化の変化などを検索し、さらに細胞外基質の経路に関してはcyclin-dependent kinase inhibitor (CDK) などの proto-oncogeneの挙動について検索を行い、細胞外基質からのシグナルの細胞内での伝達経路について議論することを目的とした。

材料および方法

1. 細 胞

ヒト歯肉よりoutgrowth法にて得られたヒト歯肉由来線維芽細胞を、10%FBS含有DMEMにて培養を行った。実験に先立ち、培養液から血清を除去し、無血清状態でFN-coat dish (FN-coat), Tissue culture dish (TC-dish), Non-coat dish (Non-coat) 上で、10分から4時間の培養を行い検索用のサンプルとした。

2. 細胞伸展率の評価

Kaplanらの方法に従い、位相差顕微鏡下で伸展細胞と非伸展細胞を計測、全細胞に対して伸展している細胞を伸展率として計測し、それぞれのdishごとに比較検討した。また、同様の方法で、TC-dish上で細胞を培養し、リゾフォスファチジン酸 (LPA) 投与による伸展率の影響についても検索を行った。

3. 免疫組織化学的検索

細胞を4%パラホルムアルンデヒドにて固定後、PBSで洗浄、抗Paxillin (Pax) 抗体、抗FAK抗体、抗リン酸化チロシン (pTh) 抗体を一次抗体とし、二次抗体にFITC標識抗体を用い蛍光顕微鏡下で観察した。また、FITC標識ファロイジンを用いてactin stress fiberの観察も行った。

4. ウェスタンブロットおよび免疫沈降法

細胞をPBSにて洗浄後、PIPA bufferにて可溶化し、遠沈後、上清をSDS-PAGE, semi-dryにてニトロセルロー

ス膜に転写, 一次抗体として Pax, FAK, pTh, p21/waf-1, p27, Rb, pRb, MAPの各々に対する抗体を用い, 二次抗体による標識後, Super signalを用い X線フィルム上に感光させた。また, 抗FAK抗体, 抗MAP抗体については免疫沈降後, 抗pTh抗体を用いたウエスタンブロットもあわせて行った。

5. RT-PCR法

それぞれの細胞から変法AGPEC法にて全RNAを抽出し, p21, p27, p16, c-fos, c-mycのプライマーを用いたRT-PCRによりそれぞれのm-RNAの発現を検索した。

結 果

1. FNの細胞接着への影響

培養後20分の早期にFN-coatでは伸展を開始し, 1時間, 2時間の時点において細胞伸展率ではFN-coat, TC-dishよりも有意に伸展しているのが確認された。

2. 細胞接着とFC蛋白の発現

FN-coat, TC-dishともに伸展が進行するにしたがい actin stress fiberが形成され, また, Pax, FAK, pThが散在性に観察され, 同部がFC形成のあることが示唆された。

3. FNによるFC構成蛋白の発現とリン酸化の変化

FAKの発現は, FN-coat, TC-dish, 時間による発現量に有意な変化が認められず, PaxはFN-coatにおいて細胞接着直後に著明な発現が認められ, 伸展に伴い減少していた。125kDa付近のpThはFN-coatにおいて細胞接着直後から発現が認められ, 伸展に伴い増加していた。

TC-dishではPaxの発現はFN-coatに比べて一定であり, pThはFN-coatから遅れて発現の増加が認められた。

4. FAKの活性化と細胞伸展

LPA投与によりTC-dishにおいてFAKのpTh亢進に伴って細胞の伸展率が有意に増加した。

5. MAPおよびMAPのリン酸化

MAPの発現は, 基質および時間で変化しないのに対し, MAPのpThはFN-coatで発現が強く, 4時間まで経時的に増加していた。

6. Proto-oncogeneの挙動

接着初期においてc-fosのm-RNAの発現はFN-coatとではTC-dishに比べて培養直後高くなっていた。p21はNon-coatにおいてFN-coatとTC-dishよりもいずれの時間においても発現が強くなっていた。Rb (Ser780) の発現はいずれの基質においても1時間が強く, その後減少していた。

考察および結論

ヒト歯肉線維芽細胞においてFNが細胞伸展を促進すると同時にFAKのチロシンリン酸化の亢進がみられ, また, LPAによるFAKのチロシンリン酸化により細胞伸展が亢進したことより, 細胞伸展にFAKのチロシンリン酸化の関与していることが示唆された。また, 細胞外基質からのシグナルによりproto-oncogeneの変動することが観察されたが, 特に細胞の接着を抑制するNon-coatによりCDKの発現が増強していたことより, 足場依存性細胞の細胞分裂は基質によるCDK発現により調整されていることが示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

細胞外基質により細胞は増殖, 分化および形態変化を引き起こすことが古くから知られている。この細胞外基質と細胞間における情報伝達経路の解明は, fibronectinのレセプターであるIntegrinを中心に現在急速に進んでいるが, 未だ不明な点が多い。そのfibronectinの細胞内情報伝達経路解明を目的にヒト歯肉由来線維芽細胞を用い, fibronectin-coat dish, tissue culture dishでのfocal contact構成蛋白の挙動, 細胞増殖関連蛋白およびproto-oncogeneの挙動を蛋白レベルおよびm-RNAレベルで検証した。また, 正常培養細胞の多くは細胞外基質がなければ増殖しない, いわゆる anchorage dependent growthが提唱されており, Integrinがそのanchorage dependent growthに深く関与していると言われている。そこで, fibronectin-coat dish, tissue culture dish, Non-coat dishの3種類の細胞外環境でのp21, p27の蛋

白および, m-RNAの発現量を比較し, 以下の結果を得た。

歯肉由来線維芽細胞はfibronectinにより, focal contact, actin stress fiberの形成促進, focal adhesion kinaseの自己リン酸化の亢進が認められ, fibronectinがfocal contactの構成に寄与することが確認された。細胞増殖関連蛋白では, ERKのチロシンリン酸化の亢進, c-fosの上昇が細胞接着初期に観察された。また, fibronectinによりp21, p27の減少も確認できた。このことにより細胞外基質が細胞形態のみならず, 細胞増殖関連蛋白に影響を及ぼすことが確認できた。

以下の結果は, fibronectinからのIntegrin情報伝達機構の解明またはanchorage dependent growthの解明に寄与するものと考えられた。

本研究によって得られたこの結果は, 歯科医学および

細胞生物学の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)	加々美 寛 行 (北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第54号
学位授与の日付	平成10年3月20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	容量結合型電気刺激CCEFの口腔インプラントへの応用 薬剤併用による骨形成促進効果について
論文審査委員	主査 教授 坂口 邦彦 副査 教授 賀来 亨 副査 教授 金子 昌幸

論文内容の要旨

【目 的】

インプラント補綴において、補綴装置装着までの治療期間で最も多くの期間を占めるのがインプラント体と骨とがosseointegrationするまでの期間であり、上顎で約6ヶ月、下顎で約3ヶ月で治癒するといわれている。その期間を短くすることができれば、補綴装置を早期に装着でき、口腔機能を早く回復させることができる。それは、患者にとってQOLや歯科補綴学の面においても意義は大きいと思われる。

しかし、インプラントに対する基礎的、臨床的な研究が多く行われているものの、これらの治療期間の短縮に関する研究がほとんど見られないのが現状である。当講座では、これまでにosseointegrationの獲得を加速させるためにパルス電磁場刺激法の応用を考え、8時間/日の刺激に骨形成促進効果があることを証明した。

本研究の目的は電気刺激療法の一方法である容量結合型電気刺激法を応用し、骨形成促進効果を検討すること。さらに、骨形成の促進ならびに装置装着時間の短縮の可能性を調べるために、骨形成促進因子を増強させるという報告がある薬剤のプロスタグランジンE₁ (以下PGE₁)を併用して検討を行う。

【材料および方法】

直径3.2mm、骨内長10mmのTi-6Al-4V合金製京セラ社POIインプラントを、体重約2.5kgの雄日本白色ウサギ24羽の左右大腿骨遠心端内側に埋入した。容量結合型電気刺激装置(以下、CCEF)は、伊藤超短波社製のオステオトロンIIを用いた。本装置は一对の皮膚電極で創部を挟む様に装着することで、生体を一種の誘電体を用いたコンデンサーとみなして、非観血的に電流を体内に送り込むことにより電気刺激する装置である。インプラント埋入翌日から片側にのみCCEFによる電気刺激を行い実験側とした。対側は刺激をせずに対照(以下、対照群)とした。実験期間は、松本らの報告より骨の修復期に相当すると思われる2週間で行った。インプラント埋入後2週間でウサギを屠殺、灌流固定後通法に従い、研磨標本はPolyester樹脂にて包埋後、インプラントの埋入方向に対し垂直に試料を割断、作製した。

新生骨形成状態の評価は、塩基性フクシン・メチレンブルー重染色で組織学的観察、テトラサイクリン、カルセイン、アリザリンコンプレクソンを用いた三色蛍光ラベリングで経時的な骨形成過程の観察、Contact Microradiography (以下、CMR)で骨の分布の観察、CMR画像を用いたコンピューター画像解析により骨接触率、骨面積比率の計測、また埋入したインプラント体の骨に対