

多い。そこで、HGF/SFがヒト口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響と浸潤シグナルの検討を行った。

口腔癌3系(SAS, Ca9-22, HSC-3)の培養株細胞の浸潤能は、HGF/SF刺激により有意に促進され、運動能は、SAS細胞で有意に促進されることが示された。そこで、浸潤シグナルの解析は、HGF/SF刺激に最も高い反応性を示したSAS細胞を用いて行った。その結果、SAS細胞の運動能の促進にRhoが関与していること、HGF/SF刺激の細胞内シグナルはHGF受容体(c-Met)を介し、FAK^{P125}を活性化し伝達される可能性、ならびにFAK^{P125}の上流にRhoが存在し、シグナル伝達の制御に関与していることを示唆した。また、SAS細胞ではRhoは常に産生され、そのRhoがHGF/SF刺激により細胞可溶性分画中に移動する可能性が強いこと、さらにHGF/SF刺激後、

Rhoは細胞膜に移行し活性化されている可能性が推察された。

これらのことより、HGF/SFによるSAS細胞の浸潤シグナルは、HGF受容体のチロシンリン酸化を介したFAK^{P125}のチロシンリン酸化により伝達され、その制御にRhoが深く関与している可能性が示唆された。また、RhoはHGF/SF刺激により核周囲より細胞膜に移行し、その制御に関与していると推察された。

以上の結果より、本論文は、SAS細胞の浸潤・転移能がHGF/SFにより促進されていること、ならびにそれに関与するシグナル伝達機構の一端を明らかにした点で意義があり、さらにこのことは、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の悪性形質を獲得する機序の解明に寄与するところ大であり、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	小山宏樹(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第74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	フェニトインおよびフェニトイン誘導体が正常ヒト骨芽細胞に及ぼす作用 —特にBMP産生に及ぼす作用について—
論文審査委員	主査 教授 賀来 亨 副査 教授 田隈 泰信 副査 教授 武田 正子

論文内容の要旨

(緒言)

抗てんかん薬、フェニトインは、歯科領域では歯肉増殖症を引き起こす薬物として知られているが、一方でin vitroおよびin vivoにおいてosteogenicな作用を有するとの報告がなされており、その骨形成促進剤としての可能性が指摘されている。その作用機序として骨芽細胞におけるTGF- β 1の産生上昇が挙げられているが、フェニトインがオステオカルシンの産生を促進するのに対し、TGF- β は抑制的に働くなど、TGF- β のみでは説明できない部分も残されている。本研究は、フェニトインがオ

ステオカルシンの強力な産生促進因子として知られており、TGF- β スーパーファミリーに属すBone morphogenetic proteins (BMPs)の産生に及ぼす影響を調べ、BMPsがフェニトインのosteogenicな作用における関わりについて明らかにすることを目的に計画された。加えてin vitroにおいて種々のフェニトイン誘導体が、フェニトインと同様のosteogenicな作用を有しているか否かについても検討した。

(方法)

I フェニトインがBMPsの遺伝子の発現およびタンパ

ク合成に及ぼす影響

1. 細胞培養：細胞は継代3～6代のヒト下顎骨由来正常骨芽細胞（以下HOB-M）を用い、10% calf serum添加DMEMで培養した。2. BMP-1～7のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響：フェニトインが、HOB-MのBMP-1～7のmRNAの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法により、濃度依存性（0～50 μ M）、時間依存（0.5, 1, 12, 24h）に半定量的に調べた。3. フェニトインのBMPsタンパク産生に及ぼす影響：RT-PCRにおいて遺伝子発現の増加の認められたBMPはBMP-2のみであった。そこで、抗BMP-2抗体を用いたBMP-2の細胞内局在におよぼす影響および培地中への分泌におよぼす影響をフェニトインを24～48時間作用後、濃度依存性に調べた。4. 抗BMP-2抗体存在下におけるフェニトインのオステオカルシン産生におよぼす影響：BMP-2抗体存在下あるいは非存在下でフェニトインをHOB-Mに48時間作用後のオステオカルシン合成に及ぼす影響は、Takaraオステオカルシン-EIA assay kitを用いて48時間作用後、濃度依存性に調べた。なお、オステオカルシンの濃度は細胞蛋白量当りの値として算出した。

II 種々のフェニトイン誘導体のヒト骨芽細胞の細胞増殖、分化、TGF- β 遺伝子発現に及ぼす影響

1. 細胞培養：細胞は継代3～6代のHOB-Mを用い、10% calf serum添加DMEMで培養した。2. 細胞増殖：種々のフェニトイン誘導体（5-hydantoin acetic acid, 5-4-(hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin, 5.5-diphenylhydantoin, hydantoinic acid, allantoin）がHOB-Mの細胞増殖に及ぼす影響をXTTを用いた細胞増殖assayにより調べた。すなわち、96 wellのdishに細胞3000個/wellを播種し、10% calf serum添加DMEM（10% CS-DMEM）にて24時間培養した後、無血清培地（0.01% BSA-DMEM）に交換、さらに24時間培養した。再度、無血清培地に培地交換後、種々のフェニトイン誘導体を各々濃度依存性（0, 5, 10, 50 μ M）に添加し、24時間培養後、XTT assayを行った。3. 細胞分化に及ぼす影響：細胞増殖促進作用のみられたフェニトイン誘導体がHOB-Mの細胞分化に及ぼす影響についてpNPPを基質とした細胞ALP assayにより、48時間作用後、濃度依存性に調べた。なお、細胞ALP活性は細胞蛋白量当りの値として算出した。4. Type I collagen合成に及ぼす影

響：同様にフェニトイン誘導体がHOB-Mのtype I collagen合成に及ぼす影響はTakara PICP-EIA assay kitを用いたprocollagen type I collagen c-peptide (PICP)産生を指標としたEIA assayにより、48時間作用後、濃度依存性に調べた。なお、PICPの濃度は細胞蛋白量当りの値として算出した。5. TGF- β 1のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響：同様のフェニトイン誘導体が、HOB-MのTGF- β 1のmRNAの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法により、濃度依存性（0～50 μ M）、短時間（1h）に調べた。

（結 果）

1. HOB-Mはbasal conditionで、BMP-1, 2, 4, 5のmRNAの発現がみられたが、BMP-3, 6, 7の発現は観察されなかった。2. 5-50 μ Mのフェニトインは短時間（0.5, 1h）および長時間（12, 24h）でBMP-2のmRNAの発現を増加させた。3. フェニトイン24h作用により、BMP-2の細胞内局在に及ぼす影響は、濃度依存性に免疫化学的染色性を増加させた。4. ドットプロット法をもちいたフェニトインの培地中へのBMP-2の産生に及ぼす効果は、濃度範囲3～4倍の増加を有意に濃度依存性に認めた。5. フェニトインのオステオカルシン産生は、抗BMP-2抗体の添加により抑制された。6. 検索した5種類のフェニトイン誘導体のうち、5-hydantoin acetic acid (PHT-ACE), 5-(parahydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (HPPH)の2種類が、濃度依存性に有意にヒト下顎骨由来正常骨芽細胞において細胞増殖及びALP活性、type I コラーゲン合成およびBMP-2, TGF- β 1の遺伝子発現を刺激した。

（結 論）

1. フェニトインの正常ヒト骨芽細胞におけるオステオカルシン産生促進作用の少なくとも一部にBMP-2の産生上昇が、関与している可能性が示された。2. ある種のフェニトイン誘導体にはin vitroにおいてフェニトイン同様の骨芽細胞の細胞増殖および分化促進作用があり、その作用機序もフェニトインと類似している可能性がある。本研究の結果はフェニトインおよびフェニトイン様誘導体の骨形成作用促進剤としての可能性を示すものと考えられた。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

抗てんかん薬、フェニトインは、歯科領域では歯肉増殖症を引き起こす薬物として知られているが、一方でin vitroおよびin vivoにおいてosteogenicな作用を有する

との報告がなされており、その骨形成促進剤としての可能性が指摘されている。その作用機序として骨芽細胞におけるTGF- β 1の産生上昇が挙げられているが、フェニ-

トインがオステオカルシンの産生を促進するのに対し、TGF- β は抑制的に働くなど、TGF- β のみでは説明できない部分も残されている。本研究は、下顎骨由来正常ヒト骨芽細胞においてフェニトインが、オステオカルシンの強力な産生促進因子として知られているBMPs産生に及ぼす影響を調べ、BMPsがフェニトインのosteogenicな作用にどのように関わるかについて明らかにすることを目的に計画された。加えてin vitroにおいて種々のフェニトイン誘導体が、フェニトインと同様のosteogenicな作用を有しているか否かについても検討した。

(結果) 1. 5-50 μ Mのフェニトインは短時間及び長時間でBMP-2のmRNAの発現を増加させた。2. フェニトイン24h作用により、免疫細胞化学法による検索において、フェニトインは、濃度依存性にBMP-2の免疫細胞化学的染色性を増加させた。3. ドットプロット法をもちいたフェニトイン培地中へのBMP-2の産生におよぼす効果

は、濃度範囲3~4倍の増加を有意に濃度依存性に認めた。4. フェニトインのオステオカルシン産生は、抗BMP-2抗体の添加により抑制された。5. 検索した5種類のフェニトイン誘導体のうち、5-hydantoin acetic acid (PHT-ACE), 5-(parahydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (HPPH)の2種類が、濃度依存性に有意に細胞増殖およびALP活性, type I コラーゲン合成およびBMP-2, TGF- β 1の遺伝子発現を刺激した。

今回の研究結果より、1. フェニトインのosteogenicな作用機序をより詳細に明らかにしたこと、2. ある種のフェニトイン誘導体にフェニトイン類似のosteogenicな効果があることを明らかにしたことは、副作用の少ないフェニトイン様骨形成促進剤の開発につながるものと考えられた。以上より、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)	川上 譲治 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	乙 第37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2項該当 (論文博士)
学位論文題目	ラット下顎頭の過剰運動による顎関節滑膜の変化
論文審査委員	主査 教授 金澤 正昭 副査 教授 矢嶋 俊彦 副査 教授 溝口 到

論文内容の要旨

緒言

近年、歯科領域において顎関節症患者の増加が報告されている。この顎関節症については、顎関節に器質的変化はないが、顎運動時の疼痛などの障害がある者に関して1918年にPrentiss Summaにより初めて報告された。その後、1934年Costenが無歯顎患者、被蓋の深い患者などの低位咬合の患者に耳鳴、頭痛、耳閉感を伴う関節炎様症状を認める症例をCosten症候群として紹介し、広く知られることになったが、当初はその原因として低位咬合による下顎頭の遠心移動が挙げられていた。その後、

顎関節症の発生には、心理的ストレス、顎口腔系の咀嚼抵抗力の劣化、外傷、咬合不正などが関与しているとされているが、未だ十分に明らかにされておらず議論の多い分野である。

下顎運動において正常者では、最大開口時の下顎頭的位置は、大多数のもので関節結節頂部より前方に移動することをわれわれはすでに報告した。このような下顎窩を逸脱するほどの大きな滑走運動は顎関節以外の関節には認められず、この運動の中には下顎頭が過度に前方移動するため、顎関節に対して悪影響をもたらすことがあるのではないかとと思われる。顎関節症のうち顎関節円板