

関しての報告, すなわち, 意識的クレンチング時や咀嚼運動時に閉口筋の筋活動に同調した胸鎖乳突筋の筋活動が発現するという報告や, 顎関節症患者に認められる胸鎖乳突筋の疼痛が咬合治療により改善されたという報告などがなされている。これらの報告から, クレンチングが頭位に影響を及ぼすことは容易に想像できるが, その客観的・定量的なデータは未だ得られていない。そこで, 本研究では, クレンチング時の閉口筋および頸部筋の筋活動と頭位とを同時記録・分析し, 咬合機能が頸部筋ならびに頭位すなわち姿勢に及ぼす影響を検討した。

本研究において, 申請者は先ず, 頭位を測定するための磁気センサ式3次元空間計測装置の測定精度を検定し, その有用性を確認した。次に, 下顎安静時には頭位変化が認められないこと, また, 咬頭嵌合位における随意最大噛みしめ(以下, VMC)時および全歯列接触型スプリントを装着したVMC時には頸部が前屈し, 片側臼歯部接触型スプリントを装着したVMC時には頸部が前屈するとともに咬合支持側に側屈すること, さらに, 開眼状態における各々の頭位変化は, 閉眼状態のそれらに比

較して減少することを確認した。また, 片側臼歯部接触型スプリントを装着した場合のVMC時には, 咬合支持側の閉口筋および胸鎖乳突筋の筋活動は反対側のそれよりも優勢であること, さらに, 閉眼状態における胸鎖乳突筋筋活動の非対称性指数(左右側筋活動量の差をその和で除した値)と頸部側屈角との間には正の相関があることを確認した。以上の結果から, クレンチングが頭位すなわち姿勢に影響を及ぼすこと, さらに, クレンチング時の咬合支持の不均衡が, 閉口筋筋活動とともに頸部筋筋活動の不均衡をもたらすことを明らかにした。なお, この結果は, 咬合異常と頭頸部筋群における筋症状の発現との関連性を示唆するものである。加えて, 筋活動開始時期の比較から, 胸鎖乳突筋の筋活動は閉口筋のそれによって引き起こされるフィードバック機構によるものであることを推測し, 姿勢制御機構における胸鎖乳突筋の役割の重要性を指摘している。

本研究によって得られた結果は, 歯科補綴学ならびに関連諸学科の進歩発展に寄与するところが大きく, 審査の結果, 本論文は学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	野 中 浩 嗣 (佐賀県)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第78号
学位授与の日付	平成12年3月17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	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> 感染マクロファージのアポトーシス発現機序の解析 —アポトーシス発現におけるカスパーゼの関与について—
論文審査委員	主 査 教 授 小 鷲 悠 典 副 査 教 授 賀 来 亨 副 査 教 授 馬 場 久 衛

論 文 内 容 の 要 旨

<緒 言>

歯周病関連細菌の一つである *Actinobacillus actinomycetemcomitans* は, 若年性歯周炎および急速進行性歯周炎の原因菌と考えられている。我々は, マウス

マクロファージ細胞株である J774.1細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させる *in vitro* の実験系を確立し, 感染細胞に細胞死(アポトーシス)が引き起こされることを報告した。また, 感染マクロファージがアポトーシスを発現するためには本菌が細胞内に取

り込まれることが必須であり、その際マクロファージ表層のCD14分子が重要な役割を担っていることを報告した。さらに、このアポトーシス発現には細胞内のプロテインキナーゼCが関与していることも明らかにした。

アポトーシス発現機構において、現在最も注目されている分子は、IL-1 β 変換酵素に代表されるシステインプロテアーゼファミリーである。この酵素はカスパーゼと呼ばれ、線虫のプログラム細胞死に必須の遺伝子である*ced-3*の遺伝子産物と高い相同性を有している。そこで、本研究では、カスパーゼファミリーのうちカスパーゼ1およびカスパーゼ3に着目し、これらプロテアーゼが*A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージのアポトーシス発現にどのように関与しているかを検討した。

〈材料および方法〉

1. 細胞の感染操作

マウスマクロファージ細胞株であるJ774.1細胞を6穴プレートの各穴に 5×10^4 個となるように播種し、18時間培養した。その後、抗生物質を含まない5%FCS-RPMI 1640培地に浮遊させた*A. actinomycetemcomitans* Y4株を各穴あたり 10^7 , 10^8 , 10^9 個となるように添加し、 $1,000 \times g$ で10分間遠心操作を行った。5%CO₂存在下で1時間培養し、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン含有RPMI1640培地で3回洗浄した。その後、抗生物質を含む5%FCS-RPMI1640培地にカスパーゼ1、カスパーゼ3、各々に対する特異的阻害剤を添加して培養した。

2. DNA断片化の検出

感染操作後、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を添加し24時間培養した。その後、細胞からDNAを抽出し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線イルミネーター上で断片化DNA像を観察した。

3. IL-1 β 量の測定

感染操作後にカスパーゼ1阻害剤を添加し24時間培養した。その培養上清について、Inter Test-1 β XTM ELISA Kit (Genzyme Co. Cambridge Ma, U. S. A)を用いてIL-1 β 量の測定を行った。

4. 感染マクロファージ細胞内のRbタンパクの発現

感染操作後、24時間培養した後、マクロファージからタンパクを調整し電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体としてretinoblastoma (Rb) タンパクに対する抗体を用いてウェスタンブロットを行い、感染マクロファージにおけるRbタンパク発現の有無を調べた。

5. 感染マクロファージ細胞内のカスパーゼ3活性の測定

感染操作後、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を $50 \mu\text{M}$ の濃度で添加し、12時間および24時間培養した。回収した細胞を細胞溶解バッファーにて溶解し遠心操作後、その上清を採取した。上清に反応バッファーと7-アミノ-4-メチルクマリリン (AMC) を結合させた合成ペプチドを添加し、37°Cで1時間反応させた後、蛍光光度計を用いて遊離したAMC量を測定した。

〈結果および考察〉

J774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させ、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を添加したところ、阻害剤を添加しなかった感染細胞に比べて致死活性が著しく抑制された。また、アガロース電気泳動の結果から、添加した阻害剤の濃度に依存してアポトーシスが抑制されることが明らかとなった。

次に、感染マクロファージ培養上清中のIL-1 β 量を測定したところ、感染細胞では著しい増加が認められた。しかし、感染後にカスパーゼ1阻害剤を添加すると、IL-1 β 量は著しく減少した。この結果は、カスパーゼ1が感染マクロファージ内でアポトーシス誘導とIL-1 β への変換に関与している可能性を示唆するものであった。アポトーシス誘導に深く関与することに加えて、カスパーゼ3は細胞内のさまざまなタンパクを分解すると報告されている。そこで、その中でも細胞周期を抑制するタンパクである網膜芽細胞腫 (Retinoblastoma; Rb) タンパクに着目して実験を行った。ウェスタンブロット分析の結果、感染マクロファージにおけるRbタンパクの分解がカスパーゼ3阻害剤の添加により完全に抑制されることが明らかとなった。さらに、マクロファージ細胞内のカスパーゼ3活性は、感染により著しく上昇した。また、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤の添加により、カスパーゼ3の活性が著しく低下した。これらの結果は、*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージのアポトーシス発現機構においてカスパーゼ1がカスパーゼ3の上流に位置して作用を制御している可能性を示唆した。

本研究の結果、*A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージのアポトーシス発現においてカスパーゼ1およびカスパーゼ3が関与していることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

これまでわれわれは、*in vitro*の培養系で*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4株がマウスマクロファージ細胞株であるJ774.1細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。本研究では、このアポトーシス発現に関与する因子としてカスパーゼ1およびカスパーゼ3に着目し、これらが*A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージのアポトーシス発現にどのような影響をおよぼしているか検討した。J774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させ、アガロース電気泳動で調べたところ、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤の添加により濃度依存的にアポトーシスが抑制されることが明らかとなった。次に、感染マクロファージ培養上清中のIL-1 β 量を測定したところ、IL-1 β 量の著しい増加が認められた。しかし、感染後にカスパーゼ1阻害剤を添加すると、IL-1 β 量は著しく減少した。この結果は、カスパーゼ1が感染マクロファージ内でアポトーシス誘導とIL-1 β への変換に関与している可能性を示唆するものであった。アポトーシス誘導に深く関与することに加えて、カスパーゼ3は細胞内のさ

まざまなタンパクを分解すると報告されている。その内、細胞周期を制御するタンパクである網膜芽細胞腫(Retinoblastoma; Rb)タンパクに着目した。ウェスタンブロット分析の結果、感染マクロファージにおけるRbタンパクの分解がカスパーゼ3阻害剤の添加により完全に抑制されることが明らかとなった。さらに、マクロファージ細胞内のカスパーゼ3活性は、感染により著しく上昇した。また、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤の添加により、カスパーゼ3の活性が著しく低下した。これらの結果は、*A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージのアポトーシス発現機構においてカスパーゼ1がカスパーゼ3の上流に位置して作用を制御している可能性を示唆した。本研究の結果、*A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージのアポトーシス発現においてカスパーゼ1およびカスパーゼ3が関与していることが明らかとなった。

以上の結果から、本論文は歯周疾患の発症および進行の解明に寄与するところが大きく、審査の結果、学位論文に値すると判定した。