

氏名・(本籍)	三田村 治 郎 (福井県)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第79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	<b>重層扁平上皮における p21/waf-1 と p27/kip-1 の発現 変化に関する研究</b> <b>—特に, in vivo における口腔上皮の発生, 再生および in vitro における皮膚上皮の分化過程について—</b>
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 小 鷲 悠 典

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (緒 言)

サイクリン依存性キナーゼインヒビターは, 細胞周期に関わっているサイクリンを活性化し, サイクリン依存性キナーゼを抑制する蛋白質である。これらは大きく分けて p16 family と p21 family とに分けられる。前者は多くの癌細胞には変異が認められるが, 後者には変異はほとんどみられず, 癌細胞, 正常細胞を問わず広く細胞周期の制御に関与していると言われている。

p21 family には, p21/waf-1/cip-1, p27/kip/sdi-1, p57/kip-2 があるが, p21/waf-1/cip-1 (waf-1) および p27/kip-1/sdi-1 (kip-1) は特に, 様々な細胞の増殖停止に関与していることが示唆されている。しかしながら口腔上皮, 皮膚上皮などの扁平上皮における局在様式には不明な点が多く, さらに, waf-1, kip-1 両者の役割の違いについても, 明らかにされていない。そこで本研究では waf-1 および kip-1 の発現様式を明らかにするために, (1) 正常口腔上皮, (2) 発生過程における口腔上皮, (3) 口腔上皮の再生過程, (4) in vitro での皮膚由来上皮細胞の増殖停止, 分化について, 検索し waf-1, kip-1 の扁平上皮での役割について議論することを目的とした。

### (材料および方法)

#### 1. 歯肉, 舌組織での waf-1 と kip-1 の発現

動物には, 胎生16日齢および生後7週齢の Sprague-Dawley 系ラットを用いた。胎生ラットは前額断にし,

生後のラットからは舌組織および上顎歯周組織を歯牙とともに摘出した。胎生ラットおよび舌組織は切除後, 一部は直ちに OCT compound に包埋し, 急速凍結後, 凍結切片を製作した。また, 一部は 4% パラホルムアルデドによる固定の後, 必要に応じて EDTA により脱灰し, 通法に従いパラフィンに包埋し, パラフィン切片を作成した。蛍光抗体法のために凍結切片とパラフィン切片を用い, 1次抗体として, 抗 waf-1 および抗 kip-1 抗体, 2次抗体には抗 waf-1 抗体に対しては Alexa 488 標識抗体を, 抗 kip-1 抗体に対しては Alexa 546 標識抗体を用いて二重染色を行った。また, in situ hybridization のためにパラフィン切片を用い, ジコキシゲニン標識キットにて, waf-1 のジコキシゲニン標識アンチセンス RNA を作製し, hybridization を行った後, アルカリホスファターゼ標識ジコキシゲニン抗体で発色を行った。

#### 2. 上皮再生過程での waf-1 および kip-1 の経時的発現変化

ラット舌の正中部に幅約 3 mm, 深さ約 1 mm の創傷を付与し, 72時間, 78時間, 84時間, 4日, 5日, 7日後にそれぞれ創傷部を中心に健常部を含めた舌組織を切除し同様に凍結切片を作成し, 蛍光抗体法を行った。さらに, 上記の凍結切片から Total-RNA を抽出し, Cyber green を用いた LightCycler により m-RNA の waf-1, kip-1 の定量を行った。

細胞には新生児ヒト皮膚由来の扁平上皮細胞を用い, 扁平上皮細胞増殖用無血清培地 KGM (0.03mM Ca<sup>2+</sup>, 増殖因子(+)) で培養を行った。培養24時間後, 上皮細胞

の増殖停止, 分化を促進するために, 高Ca<sup>2+</sup>で増殖因子無添加のKGMに交換し同様に4時間, 8時間, 12時間, 18時間, 24時間培養を行った。これらの細胞からいずれもTotal-RNAを抽出し, Cyber greenを用いたLightCyclerによりwaf-1, kip-1のmRNAの定量を行った。

### (結果および考察)

#### 1. 歯肉, 舌組織でのwaf-1とkip-1の局在

蛍光抗体法において, waf-1はいずれも, 正常歯肉, 舌組織の有棘層上層から角化層直下部にかけて発現が観察されたが, 歯肉付着上皮においては明らかな発現は認められず, 発生初期における上皮細胞では発現は軽度であった。尚, waf-1とkip-1の局在部位はいずれにおいても一致していた。in situ hybridizationでwaf-1のmRNAの局在を検索したところ, 蛍光抗体法の結果と一致していた。

#### 2. 上皮再生過程でのwaf-1およびkip-1の経時的発現変化

蛍光抗体法により, 再生上皮でのwaf-1およびkip-1の発現は正常上皮での発現に比べ弱く, その局在も正常上皮では上皮細胞の主に細胞質にあったのに対し, 核周囲に限局していた。しかし再生後半にはその発現が, 核周囲から細胞質に移行していくのが観察された。再生上皮のkip-1およびwaf-1のmRNAの発現は正常上皮と比べて低下していた。kip-1のmRNAの発現は再生の過程に

おいて変化はみられなかったものの, waf-1のmRNAは72時間から78時間例に比べて5日, 7日例では明らかな上昇が確認された。

#### 3. ヒト皮膚由来扁平上皮細胞の細胞増殖停止, 分化におけるwaf-1, kip-1 mRNAの経時的発現変化

Ca<sup>2+</sup>添加と増殖因子除去による, 経時的なwaf-1 mRNAの発現量の増加が認められた。一方, kip-1の発現量はCa<sup>2+</sup>添加初期において発現量の増加は認められたが経時的な変化はみられなかった。また培養前のcontrolと比較してもwaf-1およびkip-1 mRNAの発現量は増加していた。

以上の結果から, (1)waf-1およびkip-1はin vivoではいずれも正常角化重層扁平上皮の分化に関与している, (2)上皮再生過程では, 再生後半において細胞増殖停止にwaf-1が大きく関与している, (3)in vitroでの細胞増殖停止および分化には, waf-1が大きく関与している, ことなどが示唆された。

### (結 論)

サイクリン依存性キナーゼインヒビターのなかのp21 familyであるp21/waf-1/cip-1およびp27/kip-1/sdi-1はともに, 扁平上皮細胞の細胞増殖停止および分化に関わっているが, p21/waf-1/cip-1が特にダイナミックを変化を示すことを明らかにした。

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

サイクリン依存性インヒビターにより細胞は増殖停止, 分化を引き起こすことが知られている。このサイクリン依存性インヒビターのなかで特にp21/waf-1およびp27/kip-1は, 様々な細胞の増殖停止に関与していることが示唆されている。しかしながら口腔上皮, 皮膚上皮などの扁平上皮における局在様式には不明な点が多く, さらに, waf-1およびkip-1両者の役割の違いについても明らかにされていない。waf-1およびkip-1の発現様式を, (1)正常口腔上皮, (2)発生過程における口腔上皮, (3)口腔上皮の再生過程, (4)in vitroでの皮膚由来上皮細胞の増殖停止, 分化について検索し, 以下のような結果を得た。

蛍光抗体法において, 正常上皮の角化を伴った成熟ラットの口腔上皮では, 有棘層の上層から顆粒層にかけてwaf-1およびkip-1の発現が確認された。また角化を伴わない発生過程における口腔上皮では, waf-1およびkip-1の発現が減少していた。さらに再生上皮では, 創傷付与後初期のwaf-1およびkip-1の局在は, 核周囲に限局していたが, 後期では, 核周囲から細胞質に移行していく

のが確認された。上皮再生後半で, waf-1およびkip-1の発現が, 強度になる傾向が確認されたため, mRNAレベルでの経時的な発現変化を検証した。その結果, 創傷付与後後期でp21/waf-1の発現の増加は確認されたが, kip-1の発現量の経時的変化はみられなかった。つぎにin vitroにおいてヒト皮膚由来keratinocyteが, 細胞外カルシウム濃度を変えた条件下で, 分化が誘導される性質を利用して, カルシウム添加によるヒト皮膚由来keratinocyteの分化誘導におけるwaf-1およびkip-1の経時的発現変化をmRNAレベルで検証した。その結果, カルシウム添加直後よりwaf-1の発現量は経時的に上昇した。一方kip-1は, カルシウム添加直後より発現の増加はみられたが, その後は経時的な発現の増加はみられなかった。

以上の結果より, in vivoおよびin vitroにおいて, waf-1およびkip-1いずれも扁平上皮の細胞増殖停止, 分化に関与していることが, 分化では特にwaf-1の影響が大きいことが示唆された。

本研究は, in vivoにおける口腔上皮の発生, 再生およ

びin vitroにおける皮膚上皮の分化過程について, p21/waf-1とp27/kip-1の局在, 発現変化を明らかにした報告

であり, 本論文は病理学および歯科医学の進歩発展に寄与することが大であり, 学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	神 成 克 映 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第80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	<b>チタンと陶材の溶着強さに及ぼすチタン表面処理法の影響とX線光電子分光法による最弱層の解析</b>
論文審査委員	主 査 教 授 坂 口 邦 彦 副 査 教 授 大 野 弘 機 副 査 教 授 松 田 浩 一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

純チタンは, 生体親和性や耐食性に優れており金属アレルギーを起こす頻度も少なく, 適度な弾性や強度を有することから生体用金属として有用である。陶材は, 生体親和性に優れているとともに強度と審美性を兼ね備えた修復材料である。チタンと陶材の長所を有するチタン製陶材溶着鑄造冠は, 審美性の要求を満たすとともに, 金属アレルギーに対処できる歯冠修復物として期待されている。しかし, 純チタンを陶材溶着用金属として用いた場合, 2つの問題点が指摘されている。すなわち, 第1に, チタンの本質的問題として, 純チタンは800°C以上で酸素と激しく反応し, 表面に酸素濃度の高い $\alpha$ ケースと呼ばれる厚い酸化膜を形成すること, さらに882°C以上で $\alpha$ 相から $\beta$ 相に変態して体積変化が生じることである。これらのチタンの特性は, チタンと陶材の溶着強さを阻害する大きな要因となる。また, 第2に, チタンは熱膨張係数 ( $8.6 \times 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$ ) が従来の陶材溶着用金属 ( $12 \sim 15 \times 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$ ) よりかなり低いため, 従来の溶着用陶材が使用できないという問題があった。最近になり, 800°C以下で焼成可能なチタン専用の低溶陶材が各社から市販され, 臨床応用が可能となった。しかし, 前装陶材の剝離や破折などの問題が報告されており, 従来型の陶材溶着鑄造冠に比べ臨床における信頼性は確立されて

いない。

そこで, 本研究では, 高い溶着強さを有する信頼性の高いチタン製陶材溶着鑄造冠の作製技術を確立することを目的として, 異なる表面性状の試験片について溶着強さを測定した。すなわち, 純チタンと3種類の市販チタン溶着用陶材を用いて引張試験を行い, 溶着強さに及ぼすチタンの表面処理法について検討した。さらに, チタンと陶材との溶着構造における最弱層を解明するために, X線光電子分光分析装置 (以下, ESCA) を用いて, 3点曲げ試験によって機械的に剝離させた表面について構成成分の定量分析および状態分析を行った。

### 【実験材料および方法】

#### 1. 実験材料

金属材料としては, JIS規格3種の純チタンを用い, 陶材材料としては, 3種類のチタン用陶材, すなわち, Super Porcelain TITAN (NORITAKE社, 以下, NO), Titanium Porcelain (VITA社, 以下, VI), Duceratin (DUCERA社, 以下, DU) を用いた。なお, 溶着強さの対照群としては, 従来型のNi-Cr系陶材溶着用合金とその専用陶材を用いた。

#### 2. 実験方法

##### 1) 引張試験による溶着強さの測定

##### (1) チタンの表面処理条件