

氏名・(本籍)	桑原幹夫(山梨県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第82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	ラット顎関節円板の成長過程におけるバイグリカンとデコリンの蛋白発現と局在に関する研究
論文審査委員	主査 教授 溝口 到 副査 教授 矢嶋 俊彦 副査 教授 田隈 泰信

論文内容の要旨

【緒言】

顎関節は、蝶番運動と滑走運動が複合した運動様式を呈し、関節組織のなかでも最も複雑な機能を営む関節である。顎関節円板は、下顎頭と側頭骨関節窩の間に介入する陥凹形の線維性結合組織であり、顎関節に加わる複雑な生力学的力のshock absorberとして、また関節運動を円滑に行うためのdestabilizerとして機能している。関節円板が、損傷を受けると円板の変形、変位、あるいは穿孔をきたし顎運動の障害(関節内障)や疼痛を引き起こす。

顎関節円板における主要な細胞外基質は、コラーゲンとプロテオグリカンである。一般的にコラーゲン線維は牽引に対する抵抗性を、プロテオグリカンはそれに結合する硫酸鎖を介して剪断、圧縮に対する耐性を組織に付与し、それぞれの組織での機械的特性に寄与していることが知られている。従って、関節円板における細胞外基質の分布は、機械的特性、組織機能の維持、病的変化に大きく関わっているものと考えられる。

バイグリカンとデコリンはLeucine-Rich-Proteoglycansに属し、分子量45kDのコア蛋白にそれぞれ2本、あるいは1本の硫酸鎖が結合している。この2つのプロテオグリカンは、コラーゲン分子やTGF- β との結合能を有し、細胞増殖、細胞接着、基質形成、組織の機械的特性等に重要な役割を果たしていることが報告されている。

本研究では、ラット顎関節円板におけるバイグリカンとデコリンの成長に伴う蛋白発現と局在の変化をウェス

タンブロッティング法、および免疫組織化学的手法を用いて検討した。

【材料と方法】

1. 組織試料の作製

実験動物には、生後0, 2, 4, 8, 16週齢のWistar系雄性ラットを用いた。各週齢のラット5匹ずつを4% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde 固定液(0.1M PB, pH7.4)を用いて灌流固定後、直ちに顎関節部を摘出し、さらに同固定液を用いて4°Cで一晩浸漬固定した。固定後、0.01M PBSによる洗浄、および10% EDTA溶液(0.01M PBS, pH7.4)による脱灰を行い、通法に従い6 μ mの矢状断パラフィン切片を作製した。

2. バイグリカンとデコリンに対する抗体

バイグリカンの抗体作製には、ラットバイグリカン・コア蛋白のhyper-variable regionであるN末端側の合成ペプチド(GVPDLDSLTPTESA)を用い、ポリクローナル抗体(ウサギ)を作製した。デコリン抗体は、P. G. Scott博士(アルバータ大学医学部生化学講座, カナダ)より供与されたものであり、ウシ皮膚から精製したコア蛋白を抗原としたモノクローナル抗体(3B3)である。なお、2つの抗体の特異性を証明するため、ラット皮膚、あるいは膝関節関節軟骨からguanidine抽出した試料を用い、ウェスタンブロッティングを行った。

3. ウェスタンブロッティング

試料として、各週齢5匹のラットから摘出した10関節円板を用いた。関節円板を摘出後、蒸留水にて洗浄を施し、凍結乾燥を行った。なお、各円板組織の凍結乾燥前

後で湿重量と乾燥重量をそれぞれ計測し、含水率を計算した。

凍結乾燥した試料から4M guanidine/50mM Tris-HClにて72時間、4°Cの条件でプロテオグリカンの抽出を行った。抽出液の遠心後、上澄み液を蒸留水に対して48時間の透析を行い、ピンシコニック試薬にて試料の蛋白量を測定し、再度凍結乾燥を行った。次に、各週齢から得られた試料の蛋白0.5mgに対し8 mU/mgの濃度でコンドロイチナーゼABCを37°C、2時間の条件で酵素処理を行い、SDSを含む10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動、および転写を行った。その後、2つの抗体を用いケミルミ・ルミネセンス法にて蛋白の検出を行い、各週齢におけるバイグリカンとデコリンの発現を検討した。

4. 免疫組織化学

抗バイグリカン抗体では、goat antirabbit IgG HRPにて間接法を、抗デコリン抗体ではperoxidase antiperoxidase (PAP) 法を適用した。

【結 果】

1. 抗体の特異性について

ウェスタンブロットングから、両抗体ともコア蛋白の分子量に相当する45kD付近でのシングルバンドの反応を示した。

2. ウェスタンブロットングによる蛋白発現の検討

バイグリカンの蛋白発現では成長に伴う大きな変化は認められなかったのに対し、デコリン蛋白発現は成長に伴い増加していた。

3. 免疫組織化学による蛋白局在の検討

抗バイグリカン抗体では、0週、2週、および4週齢で強い染色性が円板の全体的にみられ領域差は顕著でなかった。8週齢では前方肥厚部と中央狭窄部での染色性が弱く、後方肥厚部で中等度の染色性がみられ、領域による染色性の差が認められた。16週齢では8週齢と同様の領域差が存在していた。

抗デコリン抗体では、0週、および2週齢で弱い染色性が円板、および結合部にわたりみられ領域差は顕著でなかった。4週齢では染色性が全体的に強くなり、特に、前方結合部と後方結合部で強い染色性が認められた。8週齢では中央狭窄部と後方肥厚部の中央部での染色性が弱く、前方と後方結合部で中等部の前方肥厚部と結合部間で強い染色性がみられ、領域による染色性の差が顕著

であった。16週齢では8週齢と同様の領域差が存在したが、さらに染色性の亢進がみられた。

【考 察】

ウェスタンブロットングの結果から、ラット顎関節円板において、バイグリカンの発現は成長に伴い一定の傾向を示し、逆にデコリンは増加することが明らかになった。デコリンの結果は、従来報告されている皮膚、あるいは軟骨組織における所見 (Bianco *et al.*, 1990) と一致していた。

また、免疫組織化学の結果から、2つのプロテオグリカンの局在は、8週齢以降に領域差を示すことが明らかになった。バイグリカンは、周辺部に比べて圧縮力負荷部位と考えられている後方肥厚部で高い染色性を示した。一方、デコリンでは圧縮力負荷部位と考えられる中央狭窄部と後方肥厚部で染色性が弱く、牽引力負荷部位と考えられる円板周辺部において強い染色性が認められた。ウシ腱組織を用いた *in vitro* の実験から、圧縮力に対しバイグリカンのmRNAの発現が増加することが報告されている (Vogel *et al.*, 1984)。また、ウシ関節円板を生化学的に分析した研究から、バイグリカンは領域による顕著な差を示さなかったものの、デコリンは円板周辺部に多く分布することが報告されている (Scott *et al.*, 1995)。従って、8週齢以降顕著となった2つのプロテオグリカンの領域差は、関節円板に加わる力学的環境要因を反映したものであり、成長に伴う顎関節機能の発展に関係していることが示唆された。

バイグリカンの生物学的機能に関しては不明の点が多い。デコリンに関しては、最近のknockout mouseを用いた研究から、コラーゲン線維の太さの調節に大きく関わっていることが明らかにされている (Danielson *et al.*, 1997)。また、ウシ関節円板の研究から、円板周辺部でのコラーゲン線維の直径は中央部に比較して大きいことが報告されている (Kcu *et al.*, 1994)。従って、本研究におけるデコリンの局在の領域差は、デコリンのコラーゲン線維形成との関係を示唆するものと考えられる。

【結 論】

ラット顎関節円板では、成長に伴いバイグリカンの蛋白発現は、一定の傾向を示すのに対し、デコリンの蛋白発現が増加を示すこと、および両プロテオグリカンの領域差が顕著になることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

本論文は、正常ラットの顎関節円板におけるプロテオグリカンであるバイグリカンとデコリンの成長に伴う蛋

白発現と局在の変化をウェスタンブロットリング法、ならびに免疫組織化学的手法を用いて明らかにしたものである。

従来、成長におけるバイグリカン、デコリンの蛋白発現と局在の変化について観察した研究はなかった。この点で、本研究によりバイグリカンとデコリンの蛋白発現がそれぞれ異なった変化を示すこと、デコリンの局在に領域差が顕著になることを認められることを立証したことは高く評価できる。

今後、液状試料などを用い顎関節の機能を変化させ、プロテオグリカンの変化を調べることにより、顎口腔機

能の発達におけるプロテオグリカンの役割を解明することも可能と考えられ、このことは発症機構が明らかでない顎関節症の病因論の解明への初期段階となるものと考えられる。

以上のことより、顎関節円板におけるプロテオグリカンの増減および局在の変化が、成長に伴う顎口腔機能の発達、あるいは顎関節における生力学的環境の変化と密接に関連していることを立証したことは、歯科医学・医療の発展に寄与するところ大であり、よって博士(歯学)の学位授与に値するものと考えられる。

氏名・(本籍)	鈴木 百合子 (北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第83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	ヒト永久歯象牙質ハイドロキシアパタイトの結晶性とCa/Pの関係
論文審査委員	主査 教授 五十嵐 清 治 副査 教授 大野 弘 機 副査 教授 田 隈 泰 信

論文内容の要旨

【目 的】

齲蝕病因の解明に多くの研究がなされ、カリオロジーの発展により齲蝕予防に対して関心が高まっている。齲蝕病因には、宿主、細菌、基質があげられる。宿主要因の一つとして歯質があり、歯質要因のなかでも歯の主要構成成分であるハイドロキシアパタイトの結晶性は、歯質の耐酸性に関与する一因子である。ハイドロキシアパタイトのCa/Pは理論上1.67であるが、実際の測定値ではそれよりも低い値を示すのが一般的である。これはアパタイト結晶中のCa²⁺やPO₄³⁻が他の様々なイオンと置換したり、格子欠陥が存在する結果である。また、Ca/Pが理論値よりも低いほどイオンの置換や格子欠陥の頻度も高いと考えられる。格子欠陥が存在すると、アパタイトの結晶構造に歪みが生じ、結晶性の低下とともに耐酸

性が低下する。これらのことから、Ca/Pは歯の結晶性を示す指標の一つとなると考えられる。しかし、ヒト歯質のCa/Pと結晶性の関係について詳細に検討した研究は報告されていない。また結晶性と耐酸性の関連については、合成ハイドロキシアパタイトを用いた実験的研究がほとんどである。さらに結晶の崩壊すなわち齲蝕の発生に関する研究では主にエナメル質齲蝕について報告されている。齲蝕の進行により修復処置を余儀なくされる場合、多くは象牙質におよぶ齲蝕がほとんどである。そこで本研究では、象牙質の結晶性と耐酸性の関連について検討するために歯根の完成度の異なる永久歯の象牙質についてCa/Pを化学的分析法によって測定した。さらに、ヒト抜去永久歯の象牙質について、結晶性を微小部X線回折法によって調べ、Ca/Pとの相関関係を検討した。