

氏名・(本籍)	中村公則(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第85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	スーパーオキシドによってマクロファージの運動性は促進する
論文審査委員	主査 教授 金澤正昭 副査 教授 賀来亨 副査 教授 田隈泰信

論文内容の要旨

1: 緒言

マクロファージ(M ϕ)は貪食作用により、生体内に存在する異物を排除するが、その際、活性酸素種であるスーパーオキシド(O $_2^-$)を産生放出することが知られている。これまで、癌細胞は活性酸素の一つであるO $_2^-$ によって、その運動性が促進され浸潤転移能が亢進することが知られているが、正常細胞においても、細胞自らが産生放出するO $_2^-$ によってその運動性が促進されるであろうことが推測される。そこで本研究では、炎症反応巣においてきわめて活発な細胞運動性を示すM ϕ は、O $_2^-$ によりその運動性が促進されるか否か、また促進されるとすれば、その細胞運動制御はどのような機構によるかを検討した。

2: 材料と方法

1) 細胞: ヒトM ϕ は末梢血からelutriator遠心法によって採取した。培養細胞は、マウス由来M ϕ 様細胞株であるJ774.1細胞を用いた。

2) 試薬: O $_2^-$ の産生にはHypoxanthine (HPX: 4 μ g/ml濃度)とXanthine oxidase (XOD: 7 \times 10 $^{-4}$ U/ml濃度)を、O $_2^-$ の消去系酵素としてはSuperoxide dismutase (SOD: 80U/ml濃度)を用いた。また、M ϕ の活性化にはf-MLP (1 \times 10 $^{-6}$ μ M濃度)とPhorbol 112-miristate 13-acetate (PMA: 1 μ g/ml濃度)を用い、さらにProtein Kinase C (PKC) 阻害剤としてCalphostin C (5 \times 10 $^{-4}$ μ M \sim 5 \times 10 $^{-2}$ D μ M濃度)を用いた。なお、Rho蛋白質阻害剤としてC3酵素(0.1 μ g/ml \sim 1 μ g/ml濃度)を用い

た。

3) 細胞運動性の測定: 金コロイド法を用いたPhagokinetic track assayで測定した。

4) PKC活性: EGFレセプターのアミノ酸残基から成る合成基質ペプチドを基質としたPKC活性アッセイシステム(Amersham社製)を用いて測定した。

5) O $_2^-$ 産生放出量の測定: cytochrome C還元法により測定した。

6) 共焦点レーザー顕微鏡による観察: rhodamine-phalloidinによりアクチン線維を染色し、形態的变化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

7) 低分子量GTP結合蛋白質Rhoファミリーの細胞内動態の検討: 細胞膜分画調整はFlemingらの方法に準じて行い、ウエスタンブロットにて検討した。

3: 結果

1) ヒトM ϕ をO $_2^-$ またはf-MLPで処理したところ、未処理のものと比較して約2倍に運動性が促進されたが、SODの共存下ではその促進が抑制された。ヒトM ϕ のO $_2^-$ 産生量は、O $_2^-$ 処理により、未処理のものとは比べ約4倍増大した。また、J774.1細胞は、O $_2^-$ 処理により細胞運動性が約1.6倍と促進し、SODの共存下ではその促進は抑制された。

2) 共焦点レーザー顕微鏡によりヒトM ϕ のアクチン線維の変化について検討したところ、O $_2^-$ 処理により、アクチン線維の増加に伴い多数のfilopodiaとlamellipodiaの形成が観察された。しかし、SODの共存下では未処理の細胞と同様に球形で細胞辺縁は平坦化してい

た。さらに、J 774.1細胞でも、同様の結果が得られた。

3) J 774.1細胞をCalphostin C処理に続いて、 O_2^- で処理すると、その細胞運動性は抑制された。また、J 774.1細胞は、 O_2^- 処理によりPKC活性が未処理のものに比べ約2倍に亢進したが、SODまたはCalphostin Cの共存下では有意にその亢進が抑制された。

4) J 774.1細胞をC3酵素で処理したところ、 O_2^- により促進された細胞運動性はC3酵素の濃度に依存して抑制された。また、 O_2^- 処理によりRhoファミリー (Rho, RacおよびCdc42) は細胞膜に移行した。

4 : 考 察

本研究の結果を、考察すると以下のことが明らかになった。

1) O_2^- によるM ϕ の細胞運動性への影響と O_2^- 産生量について

O_2^- による細胞運動性の促進が、癌細胞だけでなくM ϕ でも認められた。また、M ϕ は自ら産生放出した O_2^- によって、細胞運動性を促進することが示され、オートクリン機構によって活性化していることが明らかとなった。

2) O_2^- によるM ϕ の形態変化について

M ϕ は O_2^- 処理により、アクチン線維の増加に伴い多数のfilopodiaとlamellopodeiaの形成が観察され活発な細胞運動性が示された。しかし、SODの共存下では未処理の細胞と同様に球形で細胞辺縁は平坦化しており運動性が抑制されている状態を示していた。このことから形態的に、 O_2^- がM ϕ の細胞運動性を促進することが示された。

3) O_2^- によるProtein Kinase Cの活性化について
 O_2^- 処理によるJ 774.1細胞の細胞運動性促進と、 O_2^- 産生放出量の亢進は、PKCを介していることが示唆された。

4) Rhoファミリーの関与について

O_2^- によるJ 774.1細胞の運動性シグナルにおいて、アクチン線維形成を主体とした細胞骨格蛋白質の制御を行っているRhoファミリーの活性化が関与していることが示唆された。

5 : 結 論

M ϕ は O_2^- によってその運動性が促進され、これにはPKCおよびRhoファミリーが関与していることが示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

マクロファージ (M ϕ) は炎症巣に遊走・浸潤し、生体内に存在する異物を貪食・排除するが、その際、活性酸素種であるスーパーオキシド (O_2^-) を産生放出することが知られている。これまで、癌細胞は活性酸素の一つである O_2^- によって、その運動性が促進され浸潤転移能が亢進することが知られている。一方、M ϕ では、その遊走運動性には細菌由来のN-formyl peptideや免疫複合体、補体分解老廃物であるC5a、さらにケモカインが関与するといわれている。また、M ϕ は自らが産生放出する O_2^- によっても、その運動性が促進される可能性が推測されるが、これについての報告は全くない。そこで、中村は、炎症反応巣に多量に存在するM ϕ の細胞運動性の制御機構に O_2^- が関与するか否かを、ヒトM ϕ とマウスのM ϕ 様細胞株J 774.1細胞を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. ヒトM ϕ を、f-MLPまたは O_2^- で処理するとその運動性は約2倍促進され、 O_2^- 産生量も、約4倍増量された。また、J774.1細胞でも、 O_2^- 処理により細胞運動性が約1.6倍と促進した。しかし、両細胞ともSuperoxide dismutase (SOD) の共存下ではこれらの反応は抑制された。
2. M ϕ では、 O_2^- 処理により、アクチン線維形成の促進

に伴い多数のfilopodiaとlamellipodiaが形成され、活発な細胞運動性が示された。また、J774.1細胞でも同様の形態変化を認め、活発な運動性が示された。しかし、両細胞ともSODの共存下ではその細胞運動性が抑制されている所見が示された。

3. PKC阻害剤であるCalphostin Cは、J774.1細胞の O_2^- による細胞運動性促進を濃度依存性に抑制した。また、J774.1細胞のPKC活性は、 O_2^- 処理により亢進されるが、SODの共存下では抑制した。
4. J774.1細胞をC3酵素で処理したところ、 O_2^- による細胞運動性の促進は、C3酵素の濃度に依存して低下した。また、 O_2^- 処理により低分子量GTP結合蛋白質であるRhoファミリー (Rho, RacおよびCdc42) は細胞質から細胞膜に移行した。

以上の結果から

- 1) O_2^- による細胞運動性の促進は、癌細胞と同様に正常細胞の一つであるヒトM ϕ でも認められたが、これはM ϕ 自らが産生放出した O_2^- のオートクリン機構によることが明らかとなった。
- 2) なお、この際の細胞運動シグナルには、PKCを介し、アクチン線維形成を主体とした細胞骨格蛋白質の制御

を行っているRhoファミリーが関与することが示唆された。

3) すなわち, $M\phi$ は O_2^- によってその運動性が促進されることが本研究によってはじめて明らかにされた。

したがって, 本研究は歯科医学発展に寄与するところ大であり, 審査の結果, 学位授与に値するものと判定した。

氏名・(本籍)	濱谷 明里 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第86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	実験的歯の移動に伴うラット歯槽骨骨細胞の細胞死に関する研究
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 賀来 亨

論文内容の要旨

【緒言】

歯に矯正力を加えると, 歯根膜に圧迫力, および牽引力負荷部位を生じる。圧迫側においては, 歯根膜の圧迫による血流の阻害および硝子様変性の出現, マクロファージ系の細胞による変性組織の吸収, そして破骨細胞による歯槽骨の吸収 (穿下性吸収) が起こる。一方, 牽引側では, 歯根膜が牽引されることにより血流が活性化され, 骨芽細胞, 線維芽細胞が増殖し骨形成が行われる。このように, 矯正学的歯の移動は, 外力に対する歯周組織の一連の反応により特徴づけられた生物学的過程である。しかし, 従来の歯の移動に伴う歯周組織の反応メカニズムに関する研究では, 破骨細胞, 骨芽細胞, あるいは線維芽細胞などの歯根膜組織を対象にしたものがほとんどであり, 骨改造過程に重要な役割を担っていると考えられる歯槽骨内の骨細胞の動態に関しては, ほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では, ラットの歯の移動時における圧迫側歯槽骨骨細胞の動態, 特に細胞死についてアクチンおよび核に対する蛍光染色法, TUNEL法, および透過型電子顕微鏡を用いて明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

生後8週齢のWistar系雄性ラットを用い, 割田らの方法 (1996年) に準じ, 加工硬化型ニッケルチタン合金ワイヤーを用いて, 初期荷重10gfで上顎左側第一臼歯の近心移動を行った。実験期間は, 歯の移動開始から3, 6, 12時間, 1, 2, 4, 7日とした。なお対照群として, 装置未装着の8週および9週齢のラットを用いた。

実験期間終了後, 4%paraformaldehyde-0.5%glutaraldehyde, 4%paraformaldehyde単独, あるいは2%paraformaldehyde-2%glutaraldehyde固定液で灌流固定を行った。上顎骨を摘出後, 同固定液を用いて4°C下で12時間, 浸漬固定を施した。固定終了後, 10%EDTA溶液で脱灰した後, 通法によりパラフィン, O. C. T. Compound, あるいはEpon-812に包埋し, 水平断のパラフィン切片 (厚さ6 μ m), 凍結切片 (厚さ30 μ m), 超薄切片を作製した。パラフィン切片には, Hematoxylin-eosin染色, あるいはTUNEL染色を行った。凍結切片には, Alexa488標識phalloidinによるF-actin染色, ならびに4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)による核染色を施し, 共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。超薄切片は, 酢酸ウランとクエン酸鉛