

形態に反映させる可能性が考えられる。一方、ラットにおける卵巣摘出術はその直後から急速な骨粗鬆症をもたらすことから、閉経後の骨粗鬆症モデルとしてよく用いられている。しかしながら、卵巣摘出術 (OVX) がラット切歯の形態学的変化に及ぼす影響に関してはほとんど明らかにされていない。本研究はOVXがラット切歯の形態的变化、特に横断面における形態変化に及ぼす影響を調べる目的で行われた。加えて、OVXが切歯の歯牙密度に及ぼす影響を調べた。

動物は、24匹の22週齢の体重230~260 gのWistar系雌のラットを三協ラボサービスから購入し、本学動物実験センターにて2週間飼育し、24週齢となった時点で異常の認められなかったものを用いた。飼料はオリエンタル酵母社製固形飼料MFを用い、水は自由摂取、室温、湿度、照明時間を一定に保ち実験終了まで飼育を行った。

ラットはネプタール (25mg/kg) 腹腔内麻酔下で背側正中部を剃毛、消毒後、皮膚を切開した。それぞれ12匹ずつOVXあるいは偽手術 (Sham) を施した。OVX群、Sham群ともに、10および26週で6匹ずつ屠殺し、OVXがラットの体重、子宮を含めた諸臓器重量、DEXA法による骨密度 (BMD) および切歯の横断面形態 (総切歯面積、歯髓腔の大きさ、エナメル質、象牙質、セメント質の面積) について両群を比較検討した。なお、切歯の横

断面形態は下顎を用い、第一臼歯歯冠近心面に接し近心根に平行なライン上で切歯の非脱灰あるいは脱灰横断研磨標本を作製し、形態計測によって評価した。結果は次の通りであった。

1. OVXは手術後10週および26週のいずれにおいても有意に体重の増加、子宮重量の減少および脛骨の骨密度の減少をもたらした。
2. OVXは手術後、10週および26週のいずれにおいても切歯の無機質密度、象牙質形成率および切歯総面積に有意な影響を与えなかったが、象牙質の厚みを有意に増加させ、歯髓面積を有意に減少させた。
3. OVX処置により、特に歯髓の病理学的変化は認められず、また象牙芽細胞や歯髓細胞、エナメル芽細胞の形態に、特にSham群と比べ変化は認められなかった。これまで卵巣摘出術の成否の確認は体重の増加、屠殺時の子宮体重の減少および卵巣の欠如、あるいは骨密度の減少などによってなされてきたが、今回、本研究によりOVXがラット切歯の歯髓面積を減少させることが初めて明らかになった。本研究は卵巣摘出術とげっ歯類の切歯歯髓腔の関係を調べた初めての研究であり、本研究の成果は今後歯科医学の発展に大いに貢献する研究と考えられ、よって博士 (歯学) に値すると判定した。

氏名・(本籍)	石井久淑 (東京都)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	乙 第52号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当 (論文博士)
学位論文題目	離乳期におけるラット咬筋の血管新生に関する研究
論文審査委員	主査 教授 姜 英 男 副査 教授 武田 正 子 副査 教授 田 隈 泰 信

## 論文内容の要旨

### 【緒 言】

咀嚼筋の発達には、離乳の前後において著明になることが知られている。ラットの咬筋では、筋線維は生後約10

日齢から酸化酵素活性の異なる3つのタイプに分化し、急激に肥大することが知られている。近年、血管内皮細胞に特異性の高い増殖因子あるいは透過性因子として働くVEGF (vascular endothelial growth factor) とその

受容体(fms-like tyrosine kinase : Flt-1, kinase insert domain-containing receptor : KDR)の存在が明らかにされ、血管系細胞が臓器固有の実質系細胞の分化および発達に密接に関係することが示唆されている。したがって、血管網の構築過程とその調節機構を明らかにすることは、臓器における発達のメカニズムを解明するために重要であると考えられる。

本研究は、咬筋の分化および発達に深く関与すると考えられる血管系の構築過程とその調節機構を明らかにすることを目的とし、離乳期におけるラット咬筋の血管網をATPase染色法を用いて組織化学的に観察するとともに、VEGF, VEGF受容体(Flt-1, KDR)ならびにVEGFの転写因子として知られるHIF-1(hypoxia-inducible factor 1)の発現を主としてRT-PCR法を用いて分子生物学的に解析した。

### [材料と方法]

実験には、Wistar系ラットの咬筋浅部を用いた。ラットは、生後20日目に母親から隔離することによって離乳させた。咬筋に分布する血管は、ATPase染色法を用いて組織化学的に同定し、無作為に選択した5つの部位の毛細血管と筋線維の数を画像処理解析システムを用いて計測することにより、筋線維あたりの毛細血管数(capillary-to-fiber ratio : C/Fratio)を求めた。咬筋におけるVEGFの発現量はELISA法を用いて分析するとともに、VEGF, VEGF受容体(Flt-1, KDR)ならびにHIF-1 mRNAの発現についてRT-PCR法を用いて検討した。

### [結果と考察]

#### ・咬筋における血管新生とVEGFの役割について

出生直後における咬筋の血管網はきわめて未熟であったが、離乳期において急激な血管新生が認められ、生後約40日で成熟個体とほぼ等しいC/F ratioを有する緻密な血管網が構築されることが明らかになった。さらに、ELISAで測定したVEGFの発現量の増加とC/F ratioの増大は高い平行性を示した。したがって、VEGFが咬筋における血管新生に深く関与することが示唆される。

#### ・咬筋の血管新生に関与するVEGF-受容体系について

ラットの種々の臓器では、VEGF120, VEGF144, VEGF164ならびにVEGF188の4つのアイソフォームの存在が明らかにされている。VEGF120以外のVEGFは、ヘパリンに対して高い親和性を示すことから、細胞膜あるいは細胞外マトリックスに存在するヘパラン硫酸プロ

テオグリカンに結合して貯蔵されていると考えられている。咬筋においても上述した4つのVEGFアイソフォームのmRNAの発現が認められたが、それらのアイソフォームの発現パターンは出生後の日齢経過とともに変化した。すなわち、VEGF120の発現頻度は出生直後に最も高く、その後急激に減少することが明らかになった。VEGF188の発現頻度は、VEGF120とは逆に出生直後ではきわめて低かったが、離乳期に著明な増加を示した。VEGF164ならびにVEGF144の発現頻度は生後ほとんど変化せず、VEGF164は常に高く、VEGF144は常に低かった。一方、VEGF受容体に関しては、KDRの発現量は出生直後において最も高く、その後加齢とともに減少することが明らかになった。Flt-1の発現量は生後ほとんど変化しなかった。

以上のことより、咬筋における血管新生は、出生直後においてはVEGF120, VEGF164とKDR受容体を中心とする急速な血管内皮細胞の増殖が中心であり、離乳期においてはVEGF188, VEGF164とFlt-1受容体が血管網の形態形成および維持に深く関与すると考えられる。

#### ・血管新生調節系に対するHIF-1の関与について

HIF-1は低酸素状態によって誘導され、VEGF遺伝子に存在する(hypoxia responsive recognition element)に特異的に結合し、VEGFを誘導することが明らかにされている。本研究において、HIF-1の出現は出生直後および離乳直後において著明であった。また、粉末飼料を摂取したラット咬筋における、HIF-1ならびにVEGF受容体の発現は、固型飼料摂取時に比較して有意に低かった。したがって、咬筋における血管新生は、咀嚼ならびに吸綴運動にともなう機能的運動負荷により促進され、局所的な低酸素状態によって誘導されるHIF-1が深く関与することが推測される。

### [結 語]

咬筋の血管網は、出生直後から離乳期にかけて急速に発達することが明らかになった。この血管新生は、主としてVEGFとその受容体系を介しており、出生直後においてはVEGF120, VEGF164とKDR受容体による急速な血管内皮細胞の増殖が中心であり、離乳期においてはVEGF188, VEGF164とFlt-1受容体による血管網の形態形成が中心であると考えられる。また、咬筋の血管網の形成過程においては、授乳あるいは咀嚼などの機能的運動負荷にともなう局所的な低酸素状態が関与していることが示唆された。

## 学位論文審査の要旨

咀嚼筋の発達は、離乳の前後において著明になることが知られている。ラットの咬筋では、筋線維は生後約10日齢から酸化酵素活性の異なる3つのタイプに分化し、急激に肥大することが知られている。近年、血管内皮細胞に特異性の高い増殖因子あるいは透過性因子として働くVEGF (vascular endothelial growth factor) とその受容体 (fms-like tyrosine kinase: Flt-1, kinase insert-domain-containing receptor: KDR) の存在が明らかにされ、血管系細胞が臓器固有の実質系細胞の分化および発達に密接に関係することが示唆されている。したがって、血管網の構築過程とその調節機構を明らかにすることは、臓器における発達のメカニズムを解明するために重要であると考えられる。

本研究は、咬筋の分化および発達に深く関与すると考えられる血管系の構築過程とその調節機構を明らかにすることを目的とし、離乳期におけるラット咬筋の血管網をATPase染色法を用いて組織化学的に観察するとともに、

VEGF, VEGF受容体(Flt-1, KDR)ならびにVEGFの転写因子として知られるHIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) の発現を主としてRT-PCR法を用いて分子生物学的に解析した。

その結果、咬筋の血管網は、出生直後から離乳期にかけて急速に発達することが明らかになった。この血管新生は、主としてVEGFとその受容体系を介しており、出生直後においてはVEGF120, VEGF164とKDR受容体による急速な血管内皮細胞の増殖が中心であり、離乳期においてはVEGF188, VEGF164とFlt-1受容体による血管網の形態形成が中心であると考えられる。また、血管網の形成過程においては、授乳あるいは咀嚼などの機能的運動負荷にともなう局所的な低酸素状態が関与していることが示唆された。

以上より、本論文は咀嚼筋の発達機構の解明に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	木下隆二(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第54号
学位授与の日付	平成13年9月14日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) は口腔扁平上皮癌細胞の浸潤突起形成を制御している
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 田隈泰信

## 論文内容の要旨

### [目的]

臨床的にStage I, IIの口腔扁平上皮癌の治療成績を見ると、近年の癌治療の進歩によりその生存率は向上している。しかし、比較的早期の癌で、治療後に原発巣が十分に制御されているにも関わらず、予期せぬ後発頸部転移などによって治療に難渋する症例がみられる。このた

め浸潤転移の有無は予後を決定する重要な因子となることから、浸潤転移の制御機構の解析が急務とされる。この浸潤転移の初期段階では、癌細胞の基底膜基質への接着と運動性を制御する因子の一つとして、脂質キナーゼであるPhosphatidylinositol3-kinase (PI3-K) が知られている。

そこで、著者は基底膜基質への初期浸潤過程を観察す