

氏名	新井 英雄		
学位の種類	歯学博士		
学位授与番号	博甲第 804 号		
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 28 日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第 5 条第 1 項該当)		
学位論文題目	ヒト歯肉線維芽細胞のプロスタグランジンに対する応答に関する研究 —プロスタグランジン E ₂ の DNA 合成への作用機序について—		
論文審査委員	教授 村山洋二	教授 谷口茂彦	教授 加藤慶二郎

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

研究目的

線維芽細胞の増殖ならびに結合組織基質成分の合成などの機能は、プロスタグランジン (PG) の影響を受けることが知られている。しかし、線維芽細胞の機能に対する PG の作用は、その線維芽細胞の由来とする組織が違くと異なることがある。また、PG についても基本的構造は類似しているもののわずかな構造の違いによって各種細胞に対する PG の作用は著しく異なることがある。したがって、歯周疾患の病態を理解するためには、ヒト歯肉線維芽細胞の機能に対する各種 PG の作用が様々な角度から整理されている必要がある。ところが、このことに関しては、PGE₂ が正常ヒト歯肉線維芽細胞の DNA 合成ならびに蛋白合成を抑制するという Ko の研究 (1977) があるにとどまり、PG の作用機序にまで言及した研究は皆無である。ヒト歯肉以外の線維芽細胞の機能に対する PG の作用機序に関しては、ホルモン作用の第 2 情報伝達物質の 1 つであるサイクリック AMP (cAMP) の代謝から説明された研究が多い。

そこで、本研究では、種々の PG の正常ヒト歯肉由来線維芽細胞の形態、増殖、DNA 合成および高分子基質合成に及ぼす影響を広く調べることを出発点とし、そしてそれらの作用機序を調べる手がかりを cAMP 代謝に求めて、PGE₂ の DNA 合成に対する作用の面から検討した。

研究方法

1. 線維芽細胞および培養

線維芽細胞：正常ヒト歯肉由来線維芽細胞 (ATCC CRL 1292)

培 養：非働化したウシ新生児血清 (NCS) を 5% の割合に含むダルベッコ変法イーグル培地 (Flow) を基礎培地として、5% 炭酸ガス存在下 37℃ で、細胞が confluent になるま

で培養した。なお、コラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成測定系の基礎培地には、NCSを5%の割合に含む α -MEM (Flow)を用いた。

2. PGおよび阻害剤

PG: PGA_1 , PGA_2 , PGB_1 , PGB_2 , $\text{PGF}_1\alpha$, $\text{PGI}_2\cdot\text{Na}$, 6-keto- $\text{PGF}_1\alpha$ (PGI_2 代謝物), トロンボキサン(TX) B_2 (TXA_2 代謝物) (Sigma), PGD_2 , PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_2\alpha$ (小野薬品工業), および 9α - 11α -methanoepoxy- $\text{PGF}_2\alpha$ (TXA_2 analog) (フナコシ薬品)

cAMP分解酵素阻害剤: 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma)

プロテインキナーゼ阻害剤: HA1004, H-7 (生化学工業)

3. 細胞機能の検定系

各種PGを添加した基礎培地で培養したときの供試線維芽細胞の機能を基礎培地だけで培養したときのそれと比較した。なお、調べた細胞機能とその測定方法は以下の通りである。

細胞形態: 位相差顕微鏡下での観察

細胞増殖: トリパンプルーを用いた色素排除試験による生細胞数の測定

DNA合成: 標識用培地に添加した ^3H -チミジンの細胞内取り込み

コラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成: 標識用培地に添加した ^3H -プロリンのコラゲナーゼ消化性および非消化性蛋白への取り込み

グリコサミノグリカン(GAG)合成: 細胞とその培養液のN-セチルピリジウムクロライド沈澱画分への ^3H -グルコサミンならびに ^{35}S -硫酸基の取り込みの総量

4. 細胞内cAMP代謝

培養後の細胞内cAMPレベルによって表わした。なお、細胞内cAMPレベルの測定は、培養細胞の5%トリクロロ酢酸抽出画分のラジオイムノアッセイによった。

研究結果

1. 細胞形態に及ぼすPGの影響

PGA_1 および PGD_2 は、線維芽細胞特有の紡錘状の形態を球状に近い形態に変化させた。しかし、その他の被験PGは、本実験条件では形態変化を与えなかった。

2. 細胞増殖, DNA合成ならびに高分子基質合成に及ぼすPGの影響

被験PGはいずれも、本実験条件では、供試線維芽細胞の増殖, DNA合成, コラーゲン合成, および非コラーゲン蛋白合成を抑制したが、その程度は被験PGの違いにより異なった。一方、被験PGはいずれも、供試線維芽細胞のGAG合成には影響を及ぼさなかった。

3. PGの作用におけるcAMP代謝

1) 本実験条件では、6-keto- $\text{PGF}_1\alpha$ および 9α - 11α -methanoepoxy- $\text{PGF}_2\alpha$ を除く被験PGは、供試線維芽細胞の細胞内cAMPレベルを上昇させた。特に、 PGA_1 ,

PGE₁, PGE₂, およびPGI₂による上昇は著明であった。

2) PGE₂による供試線維芽細胞の細胞内cAMPレベルの上昇作用はIBMXによって増強された。しかし、PGE₂による供試線維芽細胞のDNA合成抑制作用はIBMXによって増強されなかった。

3) HA1004をA-kinaseが阻害を受ける濃度で作用させても、PGE₂による供試線維芽細胞のDNA合成抑制作用は弱くならなかった。

考察および結論

本実験条件では、供試線維芽細胞の機能に対する被験PGの影響は多くの場合抑制的なものであった。このうち、PGE₂による供試線維芽細胞のDNA合成抑制作用を取り上げ、その作用機序をcAMP代謝の面から検討した。その結果PGE₂による供試線維芽細胞のDNA合成抑制作用は、cAMP-A-kinase系を介さないことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト歯肉線維芽細胞の各種プロスタグランジンに対する応答の詳細を検討しただけでなく、プロスタグランジンE₂のDNA合成抑制作用に関してはその機序にまで言及したものであり、価値ある業績と認める。

よって、本研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。