

氏名 森重靖子

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 甲 第 2313 号

学位授与の日付 平成 14 年 3 月 25 日

学位授与の要件 歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 矯正歯の移動時の歯根膜リモデリングにおける肝細胞増殖因子 HGF およびその受容体 c-Met の役割

論文審査委員 教授 村山 洋二 教授 渡邊 達夫 教授 山本 照子

学位論文内容の要旨

【目的】

歯周組織は歯の支持組織で、セメント質、歯根膜、歯槽骨、および歯肉の一部によって構成されている。そのうち、歯根膜、歯槽骨は生理的状況下においても常に改造が起こっており、前者では線維芽細胞、後者では骨形成を担う骨芽細胞と、骨吸収を担う破骨細胞が主に関与していることが知られている。矯正歯の移動は、こうした歯の支持組織である歯根膜と歯槽骨のリモデリングの結果生じる。またこのリモデリングには IL-1、IL-6 などのサイトカイン、PTH、1,25 (OH)₂D₃ などのホルモンの他に、BMP、TGF、FGF、PDGF などの増殖因子が影響を及ぼすと考えられているが、詳細は未だ不明である。一方、成長因子の一つである肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF) は、肝再生を強力に促進する因子として同定され、その高親和性受容体 c-Met とともに、肝細胞のみならず、神経、血管の細胞、歯髓細胞、歯や骨の形成および吸収に関わる細胞などにも影響を及ぼす因子であると考えられている。しかし HGF および c-Met の歯周組織のリモデリングとの関わりについては不明である。さらに、矯正歯の移動において、歯根膜のコラーゲンの改造を担う歯根膜線維芽細胞については、HGF との関連の報告はなされていない。そこで本研究では、ラットの実験的歯の移動において、歯周組織の経時的変化について、HGF および c-Met の遺伝子およびタンパク質発現を in situ hybridization および免疫組織化学的手法を用いて検索し、歯周組織のリモデリングにおける HGF の役割を検討した。

【材料および方法】

1) 試料の作成:

6週齢のSD系雄性ラット(30匹)の上顎右側第一・第二臼歯間にエラストティックを挿入し、未処置の左側をコントロールとして用いた。この実験群ラットは各々5匹ずつ、1、3、5、7、14、35日後にジエチルエーテルにて全身麻酔し、灌流固定後、上顎骨を採取し、4μmパラフィン連続縦断切片を作成した。

2) in situ hybridization :

パラフィン連続切片を通常に従い除タンパク処理、再固定後、プレハイブリダイゼーションし、ディゴキシゲニン標識プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、ブロッッキングを行い、抗体反応後、発色反応を行った。なお、HGF および c-Met のセンス・アンチセンス RNA プローブは、各 PCR 産物を pGEM-T ベクターに組み込み、制限酵素で切断後、SP6 あるいは T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写反応を行い、作成した。PCR プライマーにより、ラット HGF cDNA の 1164 - 1675 (512 bp) およびラット c-Met cDNA の 2818 - 3137 (320 bp) 相当部位を増幅した。

3) 免疫組織化学 :

1 次抗体として各々 1 : 50、1 : 100 に希釈したウサギ抗ヒト HGF α IgG、およびウサギ抗ヒト c-Met IgG、2 次抗体にビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG を用いて免疫染色を行った。また陰性対照としては、1 次抗体の代わりに正常ウサギ血清を用いた。発色後、メチルグリーンによる核染色を行った。

【結果】

- 1) 矯正力を負荷していない生理的状況下では、ラット上顎右側第一臼歯頬側根近心側および遠心側の歯根膜線維芽細胞に弱く、わずかな HGF および c-Met の mRNA、タンパク質の発現を認めた。HGF および c-Met を発現する歯根膜線維芽細胞の近心側と遠心側間での分布には、明らかな差異は認められなかった。
- 2) 矯正力負荷後、第一臼歯頬側近心根近心側および遠心側、即ち、牽引側および圧迫側の歯根膜線維芽細胞で、歯の移動開始後、1、3、5 日まで HGF および c-Met の mRNA 発現細胞ならびに免疫反応陽性細胞が顕著に増加し、7 日以降 14、35 日までいずれも減少する傾向が認められた。35 日には、HGF および c-Met 発現細胞は、生理的状況である 0 日とほぼ同様の状況まで戻った。なお、生理的状況と同様に、矯正歯の移動時の牽引側および圧迫側の歯根膜線維芽細胞における HGF および c-Met の mRNA およびタンパク質発現細胞の分布に、明らかな差異は認められなかった。また、生理的状況および矯正歯の移動において、歯根膜線維芽細胞は HGF と c-Met の mRNA およびタンパク質を同様に発現した。

【考察および結論】

本研究において、生理的状況下で歯根膜線維芽細胞は、HGF ならびに HGF 受容体 c-Met を発現することが明らかとなった。歯周組織におけるそれらの一様な発現により、HGF は生理的状況における歯根膜線維芽細胞の生存・維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。矯正力を加えたとき、歯根膜線維芽細胞における HGF ならびに c-Met の発現は、牽引側、圧迫側ともに、矯正歯の移動に伴って一過性に顕著に上昇することが明らかとなった。さらに生理的状況および矯正歯の移動において、歯根膜線維芽細胞は、HGF と c-Met の mRNA およびタンパク質を同様に発現していた。従って、HGF は、その受容体 c-Met を介し、オートクライン的にメカニカルストレス負荷時の歯根膜線維芽細胞の再生に働き、歯根膜のリモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査結果の要旨

メカニカルストレスによる歯の移動は、歯周組織のリモデリングを引き起こす。歯根膜線維芽細胞は、歯周組織のうちの歯根膜のリモデリングに中心的な役割を果たしていると考えられる。またこのリモデリングには、サイトカインやホルモンおよび成長因子が関与する。HGFは骨芽細胞、破骨細胞および歯髄と歯肉の線維芽細胞に発現することが報告されているが、生理的状況および歯の移動時の歯根膜線維芽細胞におけるその発現については明らかでない。

本研究ではラットを用い、生理的状況下、および臼歯間にエラスティックを挿入してメカニカルストレスを負荷した時の、歯根膜線維芽細胞における、HGF および c-Met の遺伝子発現の動態および免疫組織化学的反応像の変化を、in situ ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的手法を用いて経時的に検索した。その結果は次のとおりである。

1. 歯根膜線維芽細胞は、生理的状況下で HGF ならびにその受容体 c-Met の mRNA を発現し、そして、免疫組織化学的陽性反応を示した。
2. HGF ならびに c-Met の mRNA の発現細胞数および免疫組織化学的に陽性反応を示す細胞数は、メカニカルストレス負荷時において増加し、経時によって生理的状況下における数値にまで減少した。
3. 上記の結果は、牽引側および圧迫側で同じ態度を示した。

申請者は、これらの結果から、歯根膜線維芽細胞は生理的状況下でも HGF および c-Met を発現しているが、メカニカルストレスを負荷すると、それらの発現を増強し、歯周組織のリモデリングに参画することを示唆した。

従って、本申請論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。