

氏名	鷲尾 憲文		
授与した学位	博	士	
専攻分野の名称	歯	学	
学位授与番号	博 甲 第 1222 号		
学位授与の日付	平成 6 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)		
学位論文題目	ヒト歯根膜線維芽細胞における活性型ビタミンD ₃ レセプター発現に関する研究		
論文審査委員	教授 村山 洋二	教授 谷口 茂彦	教授 永井 教之

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

歯根膜線維芽細胞は線維芽細胞としての性質だけでなく骨芽細胞様性質をも有する。これは、歯根膜線維芽細胞がアルカリホスファターゼ (ALP) とオステオカルシン (OC) を産生すること、ならびに、活性型ビタミンD₃ (Vit D₃) の刺激によってALP活性が上昇し、OC産生が亢進するという骨芽細胞に特徴的な性状を有していることによる。しかし、歯根膜線維芽細胞が果たして硬組織形成細胞であるのか、もしそうであるならどのような機序で石灰化が起こるのかは明確にされていない。

本研究は、歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞としての役割を明らかにするために、歯根膜線維芽細胞の硬組織形成機序を、1) 歯根膜線維芽細胞の石灰化に関する機能発現、2) 歯根膜線維芽細胞の石灰化機能発現に果たすVit D₃の役割、そして、3) 歯根膜線維芽細胞の石灰化機能発現と活性型ビタミンD₃レセプター (VDR) 発現との関わりから調べようとするものである。

【材料ならびに方法】

1. ヒト歯根膜線維芽細胞：歯周組織が健全な下顎智歯の歯根膜から、Kawaseの方法に従って調整した線維芽細胞様細胞をヒト歯根膜線維芽細胞とした。細胞の培養はウシ胎児血清 (FCS) を 5% の割合に含むアルファ変法イーグル培地 (α -MEM) に、5% 炭酸ガス存在下、37℃で行った。実験には、細胞をカルチャーディッシュおよびプレートに一定数接種し、培養期間 (2~19日) を変えることによって得た増殖状態の異なる細

胞を用いた。細胞の増殖状態は2日培養で疎、5日で単層形成前、8日で単層形成、そして11日以降で重層形成であった。

2. 細胞刺激：細胞刺激は、上述の培養終了時に培養液を除き、 1α , 25-dihydroxy vitamin D₃ (活性型ビタミンD₃; Vit. D₃) を 10^{-8} Mの濃度を含む2%FCS加 α -MEMに置き換えて、さらに24時間あるいは48時間培養することによって行った。
3. 石灰化能に関する測定法：Vit. D₃刺激培養系の培養上清および細胞画分を一定量のデタージェントおよび塩酸でそれぞれ可溶化した液について石灰化能に関する各種測定を行った。①タンパク質：細胞のNonidet可溶液について、Bradfordの方法を応用したタンパク定量キット (Bio-Rad) を用いて比色定量した。②ALP活性：Nonidet可溶液について、Lowryの変法に従って測定した。③OC量：Vit. D₃刺激後の培養液について、ラジオイムノアッセイを用いた二抗体法によって定量した。④カルシウム量：細胞の塩酸可溶液について、原子吸光分光光度計を用いて比色定量した。なお、各刺激培養系のALP活性およびOC量はそれぞれ刺激培養の系の全細胞が含むタンパク量の比で表した。
4. VDRおよびOC遺伝子転写産物の検出：Vit D₃刺激した細胞が発現するVDR mRNAおよびOC mRNAを、リボプローブを用いたin situハイブリダイゼーション法によって検出した。

【結果】

1. 細胞密度と石灰化に関する機能発現との関係：歯根膜線維芽細胞における石灰化に関する機能をALP活性、OC産生量およびカルシウムの定着量として捉えたとき、すべての機能は細胞密度の増加につれて上昇した。
2. 細胞密度とVDR mRNA発現の関係：密度が疎な細胞ではVDR mRNAを発現しなかった。しかし、単層および重層を形成した細胞はVDR mRNAを著しく発現した。
3. 細胞の石灰化とVDR発現の関係：VDR mRNAを発現しない疎な細胞をVit D₃で刺激すると、刺激しない状態の細胞の1.3倍量のOCを産生した。VDRを著明に発現する単層あるいは重層を形成した細胞はVit D₃刺激によって、4～5倍量のOCを産生した。一方、VDR発現量が異なる細胞をVit D₃で刺激したときのALP活性は、いずれの細胞でも刺激しないときのALP活性の1.5～2倍高まるにとどまった。
4. VDR mRNA発現の誘導：重層形成系培養液と2%FCS加 α -MEMを等量を含む培地で疎な細胞を刺激培養すると、細胞はVDR mRNAを発現するようになった。
5. OC mRNAの発現：疎細胞ではOC mRNAを発現しなかった。しかし、VDR mRNAを最も多く誘導する条件、すなわち、重層を形成した細胞の培養液を疎な細胞に添加して培養した後に、Vit D₃で刺激するとOC mRNAを発現した。

【考察および結論】

1. 歯根膜線維芽細胞は細胞密度が高くなるにつれて石灰化機能が高まる。
2. Vit D₃は歯根膜線維芽細胞の石灰化機能を亢進する。

3. 歯根膜線維芽細胞におけるVDR mRNAは細胞密度が高くなるにつれて著明になる。
4. OCの産生はVDR発現によって制御されていると考えられる。
5. 歯根膜線維芽細胞は密度が高くなると、自ら液性因子を産生し、VDR mRNAの発現を制御する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞としての役割を明らかにするために、歯根膜線維芽細胞の硬組織形成機序を 1)歯根膜線維芽細胞の石灰化に関する機能発現, 2)歯根膜線維芽細胞の石灰化機能発現に果たす活性型ビタミンD₃の役割, そして, 3)歯根膜線維芽細胞の石灰化機能発現と活性型ビタミンD₃レセプター発現との関わりから検討がなされ、次のことが結論された。

- 1)歯根膜線維芽細胞は細胞密度が高くなるにつれて石灰化機能が高まる。
- 2)活性型ビタミンD₃は歯根膜線維芽細胞の石灰化機能を亢進する。
- 3)歯根膜線維芽細胞における活性型ビタミンD₃レセプターmRNA発現は細胞密度が高くなるにつれて著明になる。
- 4)歯根膜線維芽細胞におけるオステオカルシンの産生は、活性型ビタミンD₃レセプター発現によって制御される。
- 5)歯根膜線維芽細胞は密度が増すと、自ら液性因子を産出することが示され、活性型ビタミンD₃レセプターmRNA発現を制御することが示唆される。

これらの知見は歯根膜線維芽細胞の硬組織形成機序を考察する上で価値ある研究業績である。

なお、論文に用語の使い方および文章の表現において適切でないところが数カ所あった。これらのことは論文を修正することによってすべて対応させた。

申請者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。