



氏 名 藤 原 英 明 (昭和50年4月20日生)
 本 籍 地 岩 手 県
 学 位 の 種 類 博 士 (歯 学)
 学 位 授 与 番 号 岩 医 大 院 歯 博 第 213 号
 学 位 授 与 の 日 付 平 成 17 年 3 月 25 日
 学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当 者 (博 士 課 程 修 了 者)
 学 位 論 文 題 目 歯 髓 由 来 線 維 芽 細 胞 の 象 牙 質 シ ア ロ リ ン タ ン パ ク お よ び ア ル カ リ
 ホ ス フ ァ ー ゼ 発 現 に 及 ぼ す イ ン タ ー ロ イ キ ン - 6 の 作 用

論文内容の要旨

I. 研究目的

歯髓を構成するおもな細胞は象牙芽細胞、線維芽細胞、未分化間葉系細胞、マクロファージなどである。歯髓の最外層には象牙芽細胞が存在し、隣接する象牙質を形成、維持している。また、齲蝕や外傷などによる歯髓組織の炎症部位にはインターロイキン (IL) -1, IL-6, 腫瘍壊死因子 (TNF) - α などの炎症性サイトカインの存在が認められる。一方、形態的には第二象牙質や石灰化物などの形成がみられ、これらと炎症性サイトカインとの関連性が推測される。しかし、この点に関する研究は少ない。そこで本研究では象牙質に特異的に存在する象牙質シアロリントンパク (DSPP) と石灰化のマーカであるアルカリホスファターゼ (ALPase) を指標として、培養歯髓細胞の細胞学的特性におよぼす IL-6 の作用について検討した。

II. 研究方法

岩手医科大学歯学部附属病院第二保存科を受診した患者で、治療上抜歯が必要とされるが齲蝕の認められない下顎第三大臼歯を保有する男性3名 (平均年齢31.7歳) に本研究の内容を説明し、同意を得たうえで抜歯した。抜去された歯から直ちに歯髓組織を無菌的に採取し、試料を10%FBS添加ダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM) を用いて37°C, 5%CO₂条件下にて初代培養した。その後、4~9代まで継代した培養歯髓細胞を実験に用いた。6ウェルプレート (Nalge nunc) に細胞を3×10⁴個播種し、3週間培養後、IL-6を0, 0.01, 0.1, 1, 10ng/ml濃度でD-MEMに添加し、さらに1週間培養した。それら培養歯髓細胞よりRNeasy® Mini Kit (QIAGEN) にて全RNAを回収後、cDNAを合成した。cDNAはライトサイクラー (Roche Diagnostics) を用いてreal-time PCR法にてDSPPとALPaseのmRNA発現について検索した。得られたDSPPとALPaseのmRNA発現の定量値は、分散分析一元配置法による統計学的解析にて比較検討した。さらに、DSPPについては象牙質シアロタンパク (DSP) 抗体を用いて免疫組織化学的染色を、ALPase活性については組織化学的検索を行った。

III. 研究成績

Real-time PCR法による検索では、DSPPのmRNA発現量はIL-6添加により濃度依存的に有意に増加した ($p < 0.01$)。一方、ALPaseのmRNA発現量はIL-6添加により濃度依存的に有意に抑制された ($p < 0.01$)。免疫組織化学的染色においてDSPの発現を検討した結果、培養4週後の歯髓細胞においてIL-6 (1ng/ml) 添加群は非添加群と比較して免疫反応産物が多く認められた。また、ALPase活性に関する組織化学的検索ではIL-6濃度が0.01, 0.1ng/ml添加群では非添加群との間に差は認められなかったが、1および10ng/ml添加群では非添加群と比較してALPase活性を示す細胞が少なかった。

IV. 考察及び結論

現在、象牙質形成の特異的な指標となる物質としてDSPP, nestin, TGF- β などが見い出されているが、その発現を制御するサイトカインに関する研究は少ない。本研究においてIL-6が濃度依存的に象牙芽細胞のマーカで

ある DSPP の mRNA 発現を up-regulation することが初めて明らかとなった。また、石灰化のマーカーである ALPase の mRNA 発現を down-regulation する結果が得られた。これらの結果より、IL-6 が歯髓細胞の象牙芽細胞への分化を促し、石灰化を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 國 松 和 司 (歯科保存学第二講座)

副査 教授 佐 藤 方 信 (口腔病理学講座)

副査 教授 木 村 重 信 (口腔微生物学講座)

歯髓はおもに象牙芽細胞、線維芽細胞、未分化間葉系細胞、マクロファージなどで構成され、歯髓の最外層には象牙芽細胞が存在し、隣接する象牙質を形成、維持している。齲蝕や外傷などによる歯髓組織の炎症部位にはインターロイキン (IL) -1, IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの存在が認められる。一方、形態的には第二象牙質や石灰化物などの形成がみられ、これらと炎症性サイトカインとの関連性が推測される。

本研究ではヒトの歯髓細胞を用いて、象牙質に特異的に存在する象牙質シアロリントタンパク (DSPP) と石灰化のマーカーであるアルカリホスファターゼ (ALPase) を指標として、RT-PCR, real-time PCR, 免疫組織化学的および組織化学的検索にて歯髓細胞の細胞学的特性に及ぼす IL-6 の作用について検討した。

その結果、DSPP mRNA 発現量は IL-6 添加により濃度依存的に増加し、濃度間における有意差を認めた。一方、ALPase mRNA 発現量は IL-6 添加により濃度依存的に減少し、IL-6 は ALPase mRNA 発現を抑制した。DSPP について免疫組織化学的染色では、IL-6 非添加群に比較して IL-6 添加群では免疫反応産物が多数認められた。ALPase 活性について組織化学的に検索した結果、IL-6 非添加群の歯髓細胞は、IL-6 添加群と比較して細胞質や細胞間基質に ALPase 活性を示す所見が強くみられた。

以上の結果から、炎症部位に浸潤する T 細胞や B 細胞により産生分泌される IL-6 が歯髓細胞の DSPP mRNA 発現を増加させ、象牙芽細胞への細胞分化を促す可能性が示唆された。一方、IL-6 は歯髓細胞の ALPase mRNA 発現を抑制し、石灰化を阻害する可能性を示した。

本研究で得られた結果は、各種外来刺激に対する生体反応や齲蝕、歯周病に伴う炎症反応、免疫反応の生体への影響の解明に寄与すること大で、今後臨床にも貢献するものと考え、学位論文に十分値すると評価した。

試験・試問の結果の要旨

学位申請者による本論文の目的、概要、研究方法、結果および考察に関する説明が明解になされ、また、それらに関する審査者による試問に対し適切な解答が得られた。また、今後の研究の展望も明確であり、審査者による建設的な助言および示唆を研究に組み入れて、さらなる研究の継続を行っていくことを確認した。本学位申請者は十分な学識と研究能力を有しているものと認め、合格と判定した。