

第141回 岐阜歯科学会例会

とき 平成13年12月1日(土)午後1時より
ところ 朝日大学1号館3階 第1大講義室

1. マウス下顎関節頭および歯牙の発生における形態形成と細胞増殖の関係

後藤 達也(朝日大・歯・大学院・歯科矯正)

<目的>

歯科矯正領域において顎の発生を知ることは必要不可欠であり、これには主に顎骨、歯牙、顎関節頭の要素が含まれる。発生における形態形成は細胞増殖と関連するが、一般に細胞周期の Retinoblastoma(RB)経路においてcyclin はG1期からS期へのリン酸化促進因子であり、cyclin dependent kinase(CDK)や proliferating cell nuclear antigen(PCNA)と複合体を形成し、その活性を高める一方で、p27は cyclin/CDK複合体に結合し、G1期阻害を示すといわれている。この点をマウス下顎関節頭ならびに歯牙の発生におけるPCNA、cyclin D1およびCDK inhibitor の p27について免疫組織学的ならびに免疫沈降法でタンパクの結合状態から細胞増殖と顎関節頭および歯牙の形態形成との関連性を考察した。

<方法>

胎生14.5日と生後2日のマウス頭部パラフィン切片を抗PCNA、抗 cyclin D1および抗p27マウスモノクローナル抗体で免疫染色を行った。また生後2日の頭部ホモジネートを抗PCNAまたは抗 cyclin D1抗体で免疫沈降させ、immunoblotでこれらの抗原の発現と相互結合状態を検索した。

<結果>

1) 免疫染色

(1) 胎生14.5日の顎関節頭部

軟骨細胞や軟骨内骨化の骨芽細胞にPCNA陽性を示し、表層の関節円板に相当する未分化な細胞には陰性で、cyclin D1は全ての細胞に発現が弱く、p27は骨化した骨芽細胞にのみ強陽性を示した。

(2) 生後2日の顎関節頭部

PCNAは表層を除く全ての細胞に強陽性を示し、cyclin D1は一部の肥大した軟骨細胞や骨化した骨芽細胞にのみ陽性で、p27はPCNAやcyclin D1陽性細胞よりも少なく限定された。

(3) 胎生14.5日の臼歯部歯胚

PCNAはエナメル器両端の内エナメル上皮や歯原性間葉に陽性を示し、一方cyclin D1はPCNAと一致したがその程度は弱くp27は陰性であった。

(4) 生後2日の臼歯部歯胚

複雑な形態を示した将来の咬頭間やヘルトビッチ上皮鞘にPCNAは強陽性を示し、cyclin D1はPCNA

と一致したがその程度は弱く、逆にp27は咬頭間で強陽性でヘルトビッチ上皮鞘では陰性であった。

2) 免疫沈降によるimmunoblot

それぞれの抗体で免疫沈降させた転写膜に互いに特異な陽性バンドを検出したが、p27は検出されなかった。これは頭部ホモジネートに対するimmunoblotの結果とも一致した。

<考察と結論>

生後2日の顎関節頭ならびに歯牙の免疫染色で、PCNAとcyclin D1の共発現細胞は一樣に細胞周期が進行し、活発に増殖しながら形態形成を行うことが窺えた。また両タンパクは免疫沈降によっても結合していることから、その細胞増殖にRB系が関与していることが示唆された。一方、p27はPCNAとcyclin D1の共発現細胞のうち、さらに限定された一部の細胞に陽性であり、免疫沈降ではPCNAとcyclin D1のどちらにも結合していなかったことから、本タンパクは少なくともcyclin D1/CDK/PCNA複合体には結合しないことが明らかになった。この現象によって展開される機構は不明であるが、別のcyclin/CDKに結合してこれを阻害し、この細胞では増殖よりもむしろ細胞分化に働いている可能性も示唆された。

以上のことから、マウスの顎関節頭における形態形成は常に増殖して類球形状を示しながら進行性であること、一方歯牙においては複雑な形態形成の際にこれらのタンパクの時空間的な発現と作用が関連することが示唆された。(学位請求論文)

2. ラット顎下腺DMBA誘発癌におけるH-rasの変異

水谷 豪(朝日大・歯・大学院・顎顔面外科)

<目的>

ラット顎下腺9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene(DMBA)誘発癌におけるH-rasの変異について検討した。

<方法>

動物は8週齢SD系雄ラット100匹を使用した。発癌は顎下部皮膚を切開後、腺体内に小窩を形成し2% DMBAオリブ油溶液含有歯科用スポンジを埋入した。また、オリブ油のみを含んだものを対照群とした。組織の約1/2を10%ホルマリンにて試料を固定後、通常に従い病理組織学的検索を行い、残りの組織にてH-rasの変異を検討するためにmRNAを抽出し、RT-PCR後、SSCPにて多型解析した。変異バンドより一本

鎖DNAを抽出し、さらにPCRにて増幅後、塩基配列を決定した。RNA抽出時にホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動を行いDNAのコンタミのないことを確認した。また、RT-PCRに用いたプライマーの設計にあたり、H-rasの変異の部位としてexon1codon12, 13およびexon 2 codon61が知られているが、exon1codon 12, 13を含む領域を特異的に増幅するように設計した。

<結果>

対照群ではスポンジ周囲に上皮は認めず一層の結合組織が存在し、その周囲は正常組織であった。DMBA埋入後3週ではスポンジ周囲の組織が破壊され、周囲結合組織中に上皮細胞が散在性に認められた。4週後ではスポンジ周囲に単層の扁平上皮の形成を認め、5週後では重層扁平上皮となったが異形成は認めなかった。6週後では重層扁平上皮が肥厚し、口腔粘膜の白板症と類似した。9週後では重層扁平上皮はさらに肥厚、角化し、異形成がみられ、上皮内癌および初期癌を認めた。12週後ではすべての症例において扁平上皮癌を認めた。

H-rasの変異はDMBA埋入後3および4週では認めなかった。5週後では7%、6週後では33%、9週後では87%および12週後では100%に変異を認めた。解析の結果、H-rasのexon1, codon12のGGAがGAAに変化していた。

<考察>

多段階発癌過程として、DNAの不完全な修復により損傷が固定化するイニシエーション期、この変化を受けた細胞が前癌病変となるプロモーション期およびそれらが増殖し癌を形成するプログレッション期がある。本実験ではDMBA埋入後3週でスポンジ周囲の結合組織中に上皮細胞の散在を認めた時期をイニシエーション期、6週後のスポンジ周囲に上皮の肥厚を認めるが異形成のみられない時期をプロモーション期および9週以降の癌が認められる時期をプログレッション期であると考えた。DMBA埋入後3週のイニシエーション期では対照群でみられなかった散在性の上皮細胞を認めたが、H-rasの変異は確認できなかったことより、同時期にはH-rasの変異の関与はないものと考えられた。6週後のプロモーション期で異形成のみられない上皮の肥厚を認めたが、形態的变化に先行してH-rasが変異することにより悪性化に関与することが示唆された。9週後のプログレッション期にH-rasの変異が高頻度で認められたことより、癌の増殖に関与していると考えられた。遺伝子の変異が段階的に増加していく結果となったが、これは組織学的変化によりH-rasの変異が発現するためと考えた。この結果より、DMBA埋入後6週で白板症類似の組織像が認められ、その組織学的変化に先行してH-rasの変異が認められることに注目した。白板症はWHOにより「摩擦によって除去できない白斑で、他の診断可能な疾患に分類で

きないもの。」と定義されている。広義の意味で白板症といわれるものの悪性転化率は3~6%という報告があり、また組織学的に白板症と診断される狭義の意味では36%であるという報告があった。それを本実験における5週および6週で認めた組織像とそれぞれ対比させると、臨床における白板症の悪性転化率と本実験H-rasの変異の発現率との近似を認めた。このことより白板症を前癌病変として発癌過程における重要な指標と考えた。また、全ての白板症が悪性化するわけではないので、そこに他の癌遺伝子抑制遺伝子が関与するものと考えた。H-rasの変異が週ごとに段階的に増加していく結果となったが、これはH-rasが発癌過程において先に述べたようにイニシエーション期には関与せず、同時期における組織学的変化により変異が発現してくる遺伝子であると考えた。

<結論>

H-rasの変異はラット顎下腺DMBA誘発癌において悪性化および増殖に関与することが示唆された。

(学位請求論文)

3. *Porphyromonas gingivalis* 線毛に対するヒト歯肉上皮細胞の認識・活性化機構の解析

大山 吉徳 (朝日大・歯・歯周病)

<目的>

歯周組織の構成細胞の一つである上皮細胞は、歯肉縁下プラーク中の病原細菌による歯周病の発症や進行に対して、防御的機能を発揮しているものと考えられる。また、歯肉上皮細胞は外来刺激に対するセンサーとして働き、その情報を上皮下の細胞へ伝達することが知られている。近年、宿主の自然免疫における微生物の認識に関わる受容体として、Toll-like receptor (TLR)の存在が注目されている。現在までに哺乳類において12種類のTLRが同定され、これらTLRファミリーはそれぞれ異なる菌体成分を認識することが明らかにされている。すなわち、TLR2は細菌細胞壁ペプチドグリカンやリポタンパク質、TLR4はグラム陰性菌外膜のリポ多糖体(lipopolysaccharide; LPS)、TLR5は鞭毛、TLR9は細菌由来非メチル化CpG DNAの認識にそれぞれ関与することが報告されている。本研究では、主たる歯周病原細菌の一つと目される*Porphyromonas gingivalis*の菌体周囲に分布する線維状構造体で、細菌の初期感染において宿主細胞への付着に関与する病原因子の一つと考えられる線毛および同部分活性ペプチドに対するヒト歯肉上皮細胞の認識ならびにその活性化機構について検討した。

<材料および方法>

1. ヒト歯肉組織は、本研究の主旨を理解し実験参加に同意した本学附属病院歯周病科外来を来院した患者より得た。得られた歯肉組織を酵素処理し、単離した上皮細胞にPapillomavirus 16 E6/E7 geneをリ