

氏名	坪井佳子
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 乙 第 3645 号
学位授与の日付	平成 13 年 9 月 30 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	Mitogenic effect of neurotrophins on periodontal ligament cell line (ニューロトロフィンの歯根膜細胞株に対する増殖促進効果)
論文審査委員	教授 村山 洋二 教授 杉本 朋貞 教授 山本 照子

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

神経成長因子 (NGF) は brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3 (NT-3) と共に NGF ファミリータンパク質 (以下ニューロトロフィン) と呼ばれ、中枢及び末梢神経の分化・生存に必須の因子である。その受容体として、低親和性レセプター (LNGFR) 及び、3 種の高親和性レセプター tropomyosin-receptor-kinase A (TRKA)、TRKB、TRKC があることはよく知られている。近年、多様な末梢の非神経系組織におけるニューロトロフィン及び TRK の発現が明らかにされ、非神経系細胞の遊走、増殖、分化の促進あるいは免疫調節等の新しい機能が注目されている。一方歯根膜は、豊富な神経や血管の分布を備え、歯を支持しながら咬合力をを緩衝するという重要な役割を果たしている。また、矯正歯の移動における支持組織のリモデリングには歯根膜が中心的な役割を果たしていると考えられる。しかし、歯根膜に TRK の発現があることは示されているものの、ニューロトロフィン及び TRK が支持組織のリモデリングに果たす役割については全く明らかでない。本研究では、歯根膜細胞におけるニューロトロフィンとそのレセプターの発現及び機能を、マウス歯根膜細胞株 (MPL) を用いて *in vitro* で調べ、歯根膜再生におけるニューロトロフィンの生理的意義について考察を行った。

### 【材料と方法】

I 細胞培養：歯根膜細胞として、マウス下顎臼歯歯根膜片から田坂により basic fibroblast growth factor (bFGF) 存在下で限界希釈法にてクローニングされたマウス歯根膜細胞株(MPL)を用いた。MPL 細胞は 10%牛胎仔血清 (FBS) 含有アルファ変法 Eagle 培地 ( $\alpha$ MEM) 中で bFGF (10 ng/mL) を添加して 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。各実験において、MPL 細胞は継代数 10-20 代のものを使用し、継代に際しては  $1.6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で細胞を播種した。

II ニューロトロフィン及び高親和性レセプター TRK の発現：各培養日数の細胞より total RNA を経時的に回収、精製後 RT-PCR を行い、アガロースゲルで電気泳動した。各ニューロトロフィンの発現量は、検出されたバンドをデンシトメーターにて半定量して数値化し G3PDH との相対比をもって比較した。また、NGF の蛋白質レベルでの発現は、各培養日数における培養上清を経時的に回収し、その中に含まれる NGF 量を ELISA 法により定量する

ことによって確認した。高親和性レセプター TRKA、TRKB、TRKC の発現は、各培養段階における MPL 細胞を ABC 法で免疫組織化学的に染色を行って確認した。

III ニューロトロフィンの MPL 細胞に対する作用：ニューロトロフィンが MPL 細胞の増殖に及ぼす直接作用については、ニューロトロフィンを添加した細胞における 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の取り込み実験により DNA 合成能を、また、MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay により細胞数をそれぞれ検討した。

#### 【結果】

(1) RT-PCR より、MPL 細胞は day 2 (対数増殖期)、day 4 (コンフルエント期)、day 18 のいずれの培養段階においても NGF、BDNF、NT-3 を発現していることがわかった。その発現量は培養日数を追うに従って増大していた。

(2) ELISA 法により、MPL 細胞の培養上清中の NGF 蛋白質の存在が確認され、その 1 日当たりの産生量は培養日数に伴い増加することがわかった。

(3) 免疫染色により、高親和性レセプター TRK が MPL 細胞に発現していることを確認した。その発現様相は、培養日数に従って減少する傾向が認められ、ニューロトロフィンの発現様相と相反していた。

(4) ニューロトロフィンにより MPL 細胞の DNA 合成は対照群と比較して有意に促進され ( $P < 0.05$ )、その至適濃度は 0.1 から 1 ng/mL であった。

(5) (4) 項の結果よりニューロトロフィンの MPL 細胞に対する増殖促進至適濃度を 1 ng/ml と仮定し、この濃度の各ニューロトロフィンを培養系に添加して細胞数の変化を調べたところ、対照と比較して有意に細胞数の増加が認められた ( $P < 0.05$ )。

(6) ニューロトロフィンは confluent 以降の MPL 細胞の ALPase の発現には影響を及ぼさなかった。

#### 【考察】

MPL 細胞はニューロトロフィン及びその高親和性レセプター TRK を発現しており、かつニューロトロフィンは MPL 細胞の増殖を促進した。そのことから、次の考察を行った：1) MPL 細胞に発現している TRK は functional receptor である、2) ニューロトロフィンがオートクライン的に MPL 細胞に作用して増殖を促進する可能性がある、3) ニューロトロフィンが歯根膜細胞の活性を高めることで歯根膜の再構築に重要な役割を果たす。

#### 【結論】

ニューロトロフィンは、歯根膜細胞の増殖を促進する役割を担い、細胞の活性調節を通して歯根膜再生に重要な役割を果たすことを示唆した。

## 論文審査結果の要旨

歯根膜は、豊富な神経や血管の分布を備え、歯を支持しながら咬合力を緩衝するという重要な役割を果たす。矯正的歯の移動における支持組織のリモデリングには歯根膜が中心的な役割を果たしていると考えられる。しかし、歯根膜にニューロトロフィン及び TRK の発現があることは示されているものの、支持組織のリモデリングに果たす役割については全く明らかでない。

本研究では、歯根膜細胞におけるニューロトロフィンとそのレセプターの発現及び機能を、マウス歯根膜細胞株 (MPL) を用いて調べ、歯根膜再生におけるニューロトロフィンの生理的意義について検討を行った。

その結果、MPL 細胞は、NGF、BDNF、NT-3、及び TRKA、TRKB、TRKC を発現しており、また、ニューロトロフィンは MPL 細胞の増殖を促進した。そのことから、次の考察を行った：1) MPL 細胞に発現している TRK は functional receptor である、2) ニューロトロフィンがオートクライン的に MPL 細胞に作用して増殖を促進する可能性がある、3) ニューロトロフィンが歯根膜細胞の活性を高めることで歯根膜の再構築に重要な役割を果たす。

本研究は、ニューロトロフィンが歯根膜の再生に関わる様々な増殖因子の一つとして、歯根膜再生過程に参画していることを初めて明確にしたものであり、よって、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。