

学 位 論 文 題 名

Desmosomal proteins in cultured
and intact human periodontal ligament fibroblasts

(培養及び組織内ヒト歯根膜線維芽細胞における
デスモゾーム構成蛋白の検索)

学位論文内容の要旨

【目的】細胞間結合装置には tight junction, adherens junction, desmosome, および gap junction の 4 種類があることが知られている. このうち desmosome は, 一般には上皮細胞のみに存在し, 心筋細胞, 胎生期の細胞や培養細胞, あるいは癌化した細胞などの特殊な細胞を除いて, 間葉系細胞には存在しないとされてきた. ところが, 1981年に Shore らは, ラット歯根膜の線維芽細胞間に desmosome によく似た構造 (simplified desmosome) が存在することを報告した.

通常, desmosome は膜貫通蛋白である desmoglein と desmocollin, これらの蛋白を固定する細胞内 plaque を構成する plakoglobin, および細胞内 plaque と中間径 filament である keratin とを連結する desmoplakin によって構築されている. これに対して, Shore らがラット歯根膜の線維芽細胞間に存在すると報告した simplified desmosome では, 通常のデスモゾームとは異なり, 隣接する細胞膜間に電子密度の高い領域は観察されず, 中間径 filament の細胞内 plaque に対する結合も見られないと言われている.

しかしながら, 現在までのところ, ラットと同様にヒトの歯根膜線維芽細胞においても, Shore らが報告した simplified desmosome のような細胞間結合装置が存在するか否かについては, これまで全く明らかにされていない. また, 歯根膜線維芽細胞における desmosome 構成蛋白の発現について検索した報告も, *in vivo*, *in vitro*を問わず全く存在しない. そこで今回, ヒト歯根膜組織ならびにヒト培養歯根膜線維芽細胞における desmosome 構成蛋白の発現を検索した.

【材料と方法】矯正的理由により抜去された18歳から20歳のドナー4名の歯牙, ならびに歯周疾患の既往のある40歳のドナー1名の歯牙を材料として, 歯根中央部1/3より歯根膜を採取し, 一部を組織切片標本の作成に, 残りを細胞培養に用いた.

組織切片標本については, 歯根膜を採取後ただちに厚さ約10 μ m の凍結切片を作成し, desmosome 構成蛋白である desmoplakin, desmoglein, desmocollin I および desmocollin III のそれぞれに対する特異抗体を用いて免疫染色を施した後, 光学顕微鏡で観察を行った.

細胞培養については, 培地として α -MEM を用い, 第2継代細胞に対して

Hematoxylin-Eosin 染色と抗 vimentin 抗体による免疫染色を施して上皮細胞の混入がないことを確認した後、第3継代細胞に組織切片標本で使用したのと同じ抗体を用いて免疫染色を施して光学顕微鏡で観察した。また、培養細胞における desmosome 構成蛋白の発現量を比較するために ELISA を行った。ELISA では、第3継代細胞を収穫後、炭酸緩衝液に溶解して microplate の well に分注し、免疫染色と同じ抗体を用いて免疫反応させた後に microplate reader で吸光度を測定し、Scheffe's F-test により差の検定を行った。

【結果と考察】免疫染色の結果、ヒト歯根膜組織切片標本の歯根膜細胞 (*in vivo*)、ならびにヒト培養歯根膜線維芽細胞 (*in vitro*) の両者で、desmosome 構成蛋白である desmoplakin, desmoglein, desmocollin I および desmocollin III の発現が明瞭に観察された。また、ELISA による検索からも、実験に用いたすべてのヒト培養歯根膜線維芽細胞が、これら desmosome 構成蛋白を発現することが明らかとなった。

以上の結果は、従来、一部の例外を除いて間葉系細胞には存在しないと言われてきた desmosome、あるいはラット歯根膜線維芽細胞に存在すると言われる simplified desmosome と同じ様な細胞間結合装置が、ヒト歯根膜線維芽細胞にも存在する可能性を強く示唆するものである。

また、ヒト培養歯根膜線維芽細胞における検索から、desmosome 構成蛋白である desmoplakin, desmoglein, desmocollin I および desmocollin III の発現は、同一シャーレ内に存在する培養細胞であっても、その発現の強さに差があり、これらの蛋白を強く発現する細胞とほとんど発現しない細胞が混在していることが明らかとなった。このような差が生じる原因としては、それぞれの培養歯根膜線維芽細胞における性質の違いや分化の程度、分裂回数の違いなどが関係しているものと考えられる。

一方、ELISA による検索結果から、40歳のドナー由来の培養細胞と18歳から20歳のドナー由来の培養細胞との間における desmoplakin と desmoglein の発現には、危険率 0.0001 という非常に大きな有意差が認められることが示された。この結果だけをみると、ヒト歯根膜線維芽細胞における desmoplakin と desmoglein の発現は、加齢によって増加するように思われる。しかしながら、40歳のドナー由来の培養細胞が歯周病の既往を有していることを考えあわせると、このような有意差が生じた原因が単に加齢だけであるとは言えないように思われる。また、20歳のドナー由来の培養細胞と18歳のドナー由来の培養細胞との間における desmoplakin と desmoglein の発現にも、1%の危険率で有意差がみられた。しかし、これらはすべて便宜抜去の小臼歯であり、年齢も近いということを考えると、有意差が存在すると言うよりは、むしろ個体差が存在すると思った方が良くはないかと思われる。

いずれにしても、本研究は、ヒト歯根膜線維芽細胞における desmosome 構成蛋白の発現を検索することを目的として行われたものであるので、現段階ではこれら本研究を行った結果に付随して新たに生じた事柄を考察するだけの十分なデータを有していない。これらの疑問を解決するためには、今後さらに、ヒト歯根膜線維芽細胞における desmosome 構成蛋白の発現の加齢的変化や、炎症との関連性などについて検索する必要があると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生

副 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Desmosomal proteins in cultured and intact human periodontal ligament fibroblasts

(培養及び組織内ヒト歯根膜線維芽細胞における

デスモゾーム構成蛋白の検索)

審査は吉田、松本および川崎審査委員全員が出席のもとに、まず論文申請者に対して申請論文の内容の要旨を説明させ、論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に申請論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文申請者は現在ヒト歯根膜線維芽細胞に存在する細胞間接着蛋白の検索を目的として実験を行っているところであるが、本論文においては細胞間結合装置の1つである desmosome に存在するタンパク質 (desmoglein、 desmocollin、 desmoplakin) について報告したものである。細胞間結合装置には tight junction、 adherens junction、 desmosome、 および gap junction の4種類があることが知られており、このうち desmosome は、一般には上皮細胞のみに存在し、線維芽細胞など間葉系細胞には存在しないとされてきた。ところが、1981年に Shore らは、ラット歯根膜の線維芽細胞間に desmosome によく似た構造 (simplified desmosome) が存在することを報告した。しかしながら、現在までのところ、ラットと同様にヒトの歯根膜線維芽細胞においても、Shore らが報告した simplified desmosome のような細胞間結合装置が存在するか否かについては、全く明らかにされていない。また、歯根膜線維芽細胞における desmosome 構成蛋白の発現について検索した報告も、in vivo、in vitro を問わず全く存在しないため、論文申請者はヒト歯根膜組織ならびにヒト培養歯根膜線維芽細胞を用いて、desmosome 構成蛋白の発現を検索した。

【実験方法および材料】

矯正的理由により抜去された18歳から20歳のドナー4名の歯牙、ならびに歯周疾患の既往のある40歳のドナー1名の歯牙より歯根膜を採取し、一部を組織切片標本の作成に、残りを細胞培養に用いた。組織切片標本については、歯根膜の凍結切片を作成し、desmosome 構成蛋白である desmoplakin、desmoglein、desmocollin I および desmocollin III のそれぞれに対する特異抗体を用いて免疫

染色を施した後、光学顕微鏡で観察を行った。

細胞培養については、組織切片標本で使用したのと同じ抗体を用いて免疫染色を施して光学顕微鏡で観察すると共に、培養細胞における desmosome 構成蛋白の発現量を ELISA を用いて検定した。

【結果および考察】

免疫染色の結果、ヒト歯根膜組織切片標本の歯根膜細胞、ならびにヒト培養歯根膜線維芽細胞の両者で、desmosome 構成蛋白である desmoplakin、desmoglein、desmocollin I および desmocollin III の発現を確認した。また、ELISA による検索からも、実験に用いたすべてのヒト培養歯根膜線維芽細胞が、これら desmosome 構成蛋白を発現することが明らかにした。desmoplakin および desmoglein の発現量は 40 代の被験者から採取したヒト培養歯根膜線維芽細胞とそれ以外で有意な差を認めたが、本実験から加齢もしくは歯周疾患罹患の既往が原因であると断定できなかった。

本研究結果は、一部の例外を除いて間葉系細胞には存在しないと言われてきた desmosome、あるいはラット歯根膜線維芽細胞に存在すると言われる simplified desmosome と同じ様な細胞間結合装置が、ヒト歯根膜線維芽細胞にも存在する可能性を強く示唆するものである。

現在、論文申請者はこの発現量の差の原因に関して実験を進めている所である。本研究は歯根膜線維芽細胞の特性を検索しており、歯科領域における歯根膜線維芽細胞の特性に関して、さらなる発展が期待される研究分野である。

今後の展望に関してもしっかりとした研究計画をもっており、将来性の点においても高く評価されるものであった。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。