

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	徳永 尚子
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
脳由来神経栄養因子 (BDNF) のヒト歯髄細胞に対する細胞機能制御能の検討			
論文審査担当者			
主 査 教授 兼松 隆 印			
審査委員 教授 柴 秀樹			
審査委員 教授 谷本 幸太郎			
〔論文審査の要旨〕			
<p>歯の機能を長期的に維持するうえで、歯髄の保存は非常に重要である。現在、深在性齲蝕の除去時や窩洞形成中に露髄した場合、MTA セメントや水酸化カルシウム製剤を直接覆髄剤として用いて、歯髄を保存する。これらの治療法は、歯髄の感染がないこと、露髄面が小さいことなどの適用制限がある。今後、歯の長期保存を目的として、歯髄再生・保護治療を発展させるためには、歯髄構成細胞の機能を積極的に制御する治療法が有用と考えられる。ニューロトロフィンの一つである脳由来神経栄養因子(以下 BDNF)は、神経系において神経細胞の分化、成熟、生存・維持に関与している。また、BDNF は骨、軟骨、腎臓などの非神経系組織や、骨芽細胞、歯周靭帯細胞、免疫細胞、そして血管内皮細胞等の細胞にも発現している。これまでに、BDNF が歯周靭帯細胞、セメント芽細胞、血管内皮細胞の増殖や分化といった細胞機能を制御することで、歯周組織再生を促進することを <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> の研究で明らかにされている。本研究は、BDNF の新規直接覆髄材としての臨床応用を目的として、BDNF の歯髄細胞に及ぼす影響を検討することとした。材料及び方法は以下に記す。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 供試細胞：ヒト歯髄細胞 (HP cells) を Lonza から購入し、10%牛胎児血清を添加した DMEM (培地 A) で培養した。3~4 代継代した HP cells を以下の実験に供した。 2. BDNF のレセプター：高親和性レセプターである TrkB, 低親和性レセプターである p75 の発現を western blot 法によって調べた。 3. Peptidoglycan (PGN) のレセプター：Toll-like receptor (TLR) 2 の発現を、western blot 法によって調べた。 			

4. 炎症性サイトカイン発現：培地 A で 11 日間培養した HP cells を DMEM で 2 回洗浄した後、無血清下で PGN (10 μ g/ml) を 3 時間前処理し、BDNF (50 ng/ml) を 24 時間作用させた。HP cells から総 RNA を回収、精製した。また細胞培養上清を回収した。Interleukin (IL) -6, IL-8 の発現を Real-time PCR 法, ELISA 法によって解析した。そのシグナル伝達を PD98059 (ERK1/2 阻害剤), SP600125 (JNK 阻害剤), SB203580 (p38 阻害剤) 及び PDTC (NF- κ B 阻害剤) を用いて調べた。
 5. 抗炎症性サイトカイン発現：培地 A で 11 日間培養した HP cells を DMEM で 2 回洗浄した後、無血清下で BDNF (50 ng/ml) を 0, 3, 6, 12, 24 時間作用させ、IL-4, IL-10 の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって調べた。さらにそのシグナル伝達を PD98059 (ERK1/2 阻害剤), SP600125 (JNK 阻害剤), Ro-318220 (PKC 阻害剤) を用いて調べた。
 6. コラーゲン代謝関連蛋白質発現：培地 A で 11 日間培養した HP cells を DMEM で 2 回洗浄した後、BDNF (50 ng/ml) を 0, 3, 6, 12, 24 時間無血清下で作用させ、I 型コラーゲン, Matrix metalloproteinase (MMP)-1 の発現を Real-time PCR 法, および ELISA 法によって調べた。
 7. 骨・象牙質関連蛋白質発現：培地 A に Ascorbic acid (50 μ g/ml), β -glycerophosphate (10 mM), Dexamethasone (0.1 μ M) を加えた培地で HP cells を 11 日間培養後、DMEM で 2 回洗浄した後、BDNF (50 ng/ml) を 0, 3, 6, 12, 24 時間無血清下で作用させた。HP cells から総 RNA を回収、精製後、Dentin Matrix Protein (DMP) -1, Osteopontin (BMP-2), Alkaline phosphatase (ALP) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって調べた。その結果、以下のことが明らかになった。
 1. HP cells は TrkB, p75, TLR2 を発現していた。
 2. PGN は HP cells の IL-6, IL-8 mRNA 発現を促進し、そのシグナル伝達には p38 を介していることが示唆された。
 3. BDNF は PGN 刺激で誘導された HP cells の IL-6, IL-8 の mRNA 発現およびタンパク質発現を抑制した。そのメカニズムとして、BDNF が PGN による p38 のリン酸化を抑制することが示唆された。
 4. BDNF は HP cells の IL-4, IL-10 mRNA 発現を促進した。そのシグナル伝達には ERK1/2, JNK を介していることが示唆された。さらに MAPK 脱リン酸化酵素である MAP Kinase phosphatase (MKP-1) によるネガティブフィードバックが関与する可能性が示唆された。
 5. BDNF は、PGN 刺激による MMP-1 産生を抑制し、PGN 刺激によって減弱した I 型コラーゲンの mRNA 発現を回復した。
 6. BDNF は、HP cells において、象牙質関連蛋白質である DMP-1, OPN, OC, BMP-2, ALP の mRNA 発現を促進した。
- 以上の結果から、ヒト歯髄細胞が BDNF レセプター (TrkB, p75) を有し、BDNF によって生理的な細胞機能を制御出来ると考えられた。BDNF は、歯髄細胞に対して炎症制御、コラーゲン代謝、象牙質関連蛋白質発現に関与し、新規歯髄覆髓材として有用である可能性が示唆された。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

