

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 橘 竜 佑(大阪府)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 乙 第 260 号
学位授与年月日 平成 28 年 11 月 17 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目 Effect of Melatonin on Human Dental Papilla Cells
(ヒト歯乳頭細胞に対するメラトニンの影響)
International Journal of Molecular Sciences
第 15 巻 第 10 号 17304 頁～17317 頁掲載 平成 26 年 9 月 26 日発行
論文審査委員 主査 教授 山 越 康 雄
副査 教授 中 村 芳 樹 副査 教授 里 村 一 人

内容の要旨

【緒言および目的】

メラトニンは主に夜間松果体から合成、分泌されるホルモンであり、その分泌量は光により調整され、夜間に増え、日中では減少する。メラトニンは概日リズム形成作用、催眠作用、抗性腺作用、抗酸化作用、免疫賦活作用、抗腫瘍作用、血管新生作用など多くの生理的作用に関与しており、さらにメラトニンが骨芽細胞の増殖・分化の促進作用を有していることが知られている。近年、メラトニンが歯周病、口腔インプラントの骨結合の促進など口腔領域においても関与していることが報告されているが、口腔内における生理的役割について未だ不明な点が多い。メラトニンが骨芽細胞の増殖・分化を促進することや、口腔領域においても何らかの生理的作用を担っていると考えられることから、メラトニンが歯の形成・発育にも何らかの影響を及ぼしている可能性に着目した。そこで、本研究では、ヒト歯乳頭細胞を用いてメラトニンがヒトの歯の形成・発育に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

組織学的検討

歯科矯正学的治療のために摘出した鐘状期後期の下顎第三大臼歯歯胚を Mildform[®] で固定し、10% EDTA にて脱灰後、パラフィン包埋した。厚さ 5 μ m の切片を作製し、H-E 染色後、組織学的観察を行った。ヒト歯胚の切片の一部は脱パラフィン後、3% 過酸化水素を含むメタノールにより内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した後に 20% 正常ヤギ血清でブロッキングを行い、マウス抗 Mellar 抗体を一次抗体として、4℃ で一晩インキュベートした。PBS にて洗浄後、Histofine SAB-PO(M) キット(ニチレイ)と DAB 基質キット(ニチレイ)を使用して発色させた後、ヘマトキシリンにて対比染色した。

細胞培養

ヒト歯乳頭細胞を 10% FBS, 100 μ g/ml ascorbic acid (和光純薬工業), 1×Glutamax[®] (Invitrogen), 100 U/ml penicillin (Invitrogen), 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen) を含む α -MEM (Sigma-Aldrich) を用いて培養した。

RT-PCR 法

ヒト歯乳頭細胞を培養し、confluence 前, confluence 時, confluence 後 1, 3, 5, 7, 14 および 21 日目に TRIzol[®] (Invitrogen) にて RNA を回収後、SuperScript III First-Strand[®] (Invitrogen) を用いて c-DNA を作製し、通法に従い PCR を行った。

Western blot 法

ヒト歯乳頭細胞を培養して confluence に達した後、タンパク分解酵素阻害剤を含む RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology) を用いて溶解し、20 分間 (10,000 rpm, 4℃) 遠心した後に上清を 4-12% Bis-Tris gel を用いて電気泳動により展開

し、PVDF membrane に転写した。通法に従い、マウス抗 MellaR 抗体を用いて Western blot を行った。

細胞増殖

ヒト歯乳頭細胞に各濃度 (0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) のメラトニンを添加した培地を用いて培養を行い、1, 3, 5, 7, 14 および 21 日目に細胞を 1% glutaraldehyde にて固定した。0.02% Crystal violet を用いて 30 分間染色した。70% ethanol にて Crystal violet を抽出し、570 nm での吸光度を測定した。

Real-time PCR 法

ヒト歯乳頭細胞を上記と同様の条件にて培養した後、TRIzol[®]にて total-RNA を回収し、SuperScript III First-Strand[®] (Invitrogen)を用いて cDNA を作製した。この cDNA を Applied Biosystems StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, dentin matrix protein-1, dentin sialophosphoprotein の遺伝子発現につき検討した。

Alizarin red S 染色

ヒト歯乳頭細胞を confluence まで培養した後に培地に 10 mM β -glycerophosphate と 10^{-7} M dexamethasone を加え、さらに各濃度 (0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) のメラトニンを添加して 4 週間培養した。1% glutaraldehyde で固定し、Alizarin red S 染色を行った。

【結 果】

ヒトおよびラットの歯胚において、エナメル芽細胞、中間層細胞、象牙芽細胞および歯乳頭細胞にメラトニン受容体の発現を確認した。*in vitro* ではヒト歯乳頭細胞においてメラトニン受容体の mRNA ならびタンパク質の発現が認められた。ヒト歯乳頭細胞の増殖に対するメラトニンの影響は認めなかった。ヒト歯乳頭細胞の分化に関しては、メラトニンを 100 μ M 以上で添加すると象牙芽細胞の分化マーカーである osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, dentin matrix protein-1, dentin sialophosphoprotein の遺伝子発現が有意に増加した。また、200 μ M のメラトニン存在下において、細胞外基質の石灰化が促進されることが確かめられた。

【考 察】

ヒト歯胚のエナメル芽細胞、中間層細胞、象牙芽細胞および歯乳頭細胞にメラトニン受容体が存在し、メラトニンがヒト歯乳頭細胞の分化を促進することから、メラトニンが歯の発育・形成過程における制御因子として作用していることが強く示唆された。

審査の結果の要旨

概日リズム形成などの多くの生理的作用に関与するメラトニンは、骨芽細胞の増殖・分化促進作用も有しており、近年では歯周病、口腔インプラントの骨結合の促進など口腔領域においても関与していることが報告されている。しかしながら、口腔内における生理的役割については未だ不明な点が多いので、申請者は、口腔領域におけるメラトニンの生理的作用の知見を得るため、ヒトの歯の発育・形成に及ぼす影響について調べることを目的とした。

組織学的実験では、歯科矯正学的治療のために摘出した鐘状期後期のヒト下顎第三大臼歯歯胚から切片を作製し、メラトニン 1a 受容体 (MellaR) 抗体を用いた免疫組織染色を行った。次にヒト歯乳頭細胞における MellaR の mRNA 発現をリアルタイム PCR (qPCR) にて解析し、さらに歯乳頭細胞からタンパク質画分を抽出し、ウェスタンブロットによって MellaR を検出した。*In vitro* 実験では、異なる濃度のメラトニン添加に対する細胞増殖能をクリスタルバイオレット染色法によって評価した。次に歯乳頭細胞から象牙芽細胞の分化を qPCR によって象牙芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を調べることで評価した。さらに歯乳頭細胞をメラトニンが添加された石灰化誘導培地にて培養後、形成された石灰化物をアリザリンレッド染色にて観察した。

その結果、ラットの歯胚において、エナメル芽細胞、中間層細胞、象牙芽細胞および歯乳頭細胞に MellaR の局在が観察された。また、ヒト歯乳頭細胞では、MellaR の遺伝子発現およびタンパク質の存在が認められた。*In vitro* 実験では、ヒト歯乳頭細胞の増殖に対するメラトニンの効果は見られなかったが、分化に対しては 100 μ M 以上のメラトニン添加によって、象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子発現が有意に上昇した。さらに 200 μ M のメラトニン存在下では、細胞外基質の石灰化が促進されることが判明した。これらの所見は、メラトニンが歯乳頭細胞から象牙芽細胞への分化、さらには石灰化誘導を促進するための制御因子の一つであることを示唆していた。

以上、本研究はメラトニンがヒト歯胚中の歯原性細胞の機能を調節することによって、歯の発育や形成など口腔領域にお

いても生理的役割を演じていることを見出したことは、歯の発生学のみならず今後の歯科再生医療分野においても大いに寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値が有ると判定した。