



Title	ヒトセメント質に存在する新しい成長因子の精製
Author(s)	米村, 幸城
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38057
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 よね米 むら村 こう幸 き城

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 10693 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 5 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

歯学研究科歯学臨床系専攻

学 位 論 文 名 ヒトセメント質に存在する新しい成長因子の精製

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 岡田 宏

(副査)
教 授 栗栖浩二郎 助教授 滝川 正春 助教授 小川 裕三

論 文 内 容 の 要 旨

(研究目的)

歯周治療による理想的な治癒形態は結合組織性付着の再生である。しかし、これを獲得する術式はいまだ確立されていない。それはこの再生の機構が解明されていないためである。セメント質が歯周組織の再生に重要な役割を果たしていると推察されるので、その分子生物学的機構を明らかにする一端として以下の実験を行った。即ち近年、石灰化組織の細胞外マトリックス中にインスリン様成長因子 (IGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β) など、種々のサイトカインの存在が認められ、これが組織のリモデリングや再生に深く関与していることが示唆されている。そこで、セメント質に存在する成長因子 (Cementum-derived Growth Factor: CGF) を精製、単離し、その生物学的および物理化学的特性の解析を行い、他の既知のサイトカインとの異同を比較検討した。

(材料と方法)

1. セメント質抽出物の精製：歯周疾患の認められないヒト抜去歯よりセメント質をキュレットを用いて採取し、1.0 M 酢酸による 4℃、7 日間の抽出操作を加えた。このセメント質の酢酸抽出物を透析、濃縮後、ヘパリン親和性高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に展開した。DNA 合成促進活性を有する画分の精製は、10%トリクロロ酢酸 (TCA) により沈殿回収の後、陽イオン交換 HPLC、そして C18 逆相 HPLC を用いて行った。
2. 生物学的活性の検索：CGF および各種成長因子による、ヒト歯肉線維芽細胞への [^3H] - チミジンの取込み、あるいは細胞数の増加量を比較検討した。
3. CGF の物理化学的处理：CGF に熱処理、還元処理あるいはトリプシン処理を行い、その生物学的活性への影響を検索した。
4. 上皮細胞成長因子 (EGF) のラジオレセプターアッセイ：コンフルエントに達した歯肉線維芽細胞に、種々の濃度の CGF, EGF, PDGF, IL-1 を加え、4℃で 2 時間インキュベートした後、[^{125}I] - EGF (0.25ng/ml) を加え、さらに 1 時間のインキュベートを行った。細胞を PBS でよく洗浄した後、1% TritonX-100 にて細胞を可溶化し放射活性を測定した。
5. SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)：蛋白質は Laemmli の方法に従って 15% ポリアクリルアミドゲルに展開した。

(研究結果)

1. CGFの精製: 1.0 M 酢酸によるセメント質の抽出物をヘパリン親和性 HPLC に展開すると, NaCl 濃度 0.4~0.6 M の画分に歯肉線維芽細胞に対する DNA 合成促進活性のピークが認められた。この画分を 10% TCA を用いて沈殿回収した後, 陽イオン交換 HPLC に展開したところ, NaCl 濃度 0.55~0.75 M の画分に DNA 合成促進活性のピークが検出された。この画分をさらに C18 逆相 HPLC に展開すると, 35~40% アセトニトリルの画分に DNA 合成促進活性は溶出された。この活性画分を SDS-PAGE にて分析すると, 還元, 非還元条件下とも分子量 23 kDa を示すバンドが得られた。さらにゲルスライスからの抽出物の DNA 合成促進活性を測定したところ, 分子量 23 kDa に相当するゲルスライスのみに活性が認められた。

2. CGF の生物学的性質: CGF の DNA 合成促進活性は, 他の成長因子, 特に EGF の共在下において著明に増強された。CGF は歯肉線維芽細胞以外にも, 歯根膜細胞, 皮膚線維芽細胞, 動脈の平滑筋細胞に対して DNA 合成促進活性を示した。抗 PDGF 抗体および抗 FGF 抗体による DNA 合成促進活性の阻害は認められなかった。また, PDGF, IL-1 は EGF レセプターの [125 I]-EGF に対する結合親和性を低下 (transmodulate) させたのに対して, CGF は低下させなかった。

3. CGF の物理化学的性質: 60°C, 20 分間の熱処理に対して CGF の DNA 合成促進活性は安定であったが, トリプシン処理および還元処理により活性は消失した。

(結論および考察)

本研究により, CGF は分子内部の S-S 結合が生物学的活性に必須である分子量 23 kDa の単鎖のポリペプチドで, EGF レセプターを transmodulate しない成長因子であり, PDGF, EGF, FGF, IL-1, IGF, TGF- β , BMP などの既知のサイトカインとは異なった因子であることが明らかになった。さらに CGF が歯肉線維芽細胞以外にも, 歯根膜細胞, 皮膚線維芽細胞, 動脈の平滑筋細胞に対して DNA 合成促進活性を示したことより, CGF は種々の細胞に対し生物学的活性を有するサイトカインであり, また, セメント質に存在するという部位特異性から, セメント質のリモデリングや歯周組織の再生機構において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は歯周組織の再生機構に深く関与しているセメント質に着目し, 同組織内に存在する成長因子 (cementum-derived growth factor, CGF) を精製し, その特性を既知の他の成長因子と比較検討したものである。

その結果, CGF は分子内の S-S 結合が生物学的活性に必須である分子量 23 kDa の単鎖のポリペプチドで EGF レセプターを transmodulate せず, また広く歯肉線維芽細胞, 歯根膜細胞, 皮膚線維芽細胞, 動脈の平滑筋細胞などに対して DNA 合成促進活性を有すること, しかもこの DNA 合成促進活性はとりわけ EGF の共在下において著明に増強されることなどから新しい成長因子であることを確認した。

これらの知見は歯周組織の再生療法を開発するにあたって基礎的な手掛かりとなるものであり, 博士 (歯学) の学位請求に充分値するものと認める。