



Title	ヒト歯根膜細胞の細胞機能に及ぼす塩基性線維芽細胞増殖因子の作用
Author(s)	高山, 真一
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40900">https://hdl.handle.net/11094/40900</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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	高 山 真 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 14002 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	「ヒト歯根膜細胞の細胞機能に及ぼす塩基性線維芽細胞増殖因子の作用」
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 宏
	(副査) 教授 米田 俊之 助教授 森崎市治郎 講師 岩本 容泰

### 論文内容の要旨

辺縁性歯周炎は、デンタルプラーク中の細菌群により引き起こされる慢性炎症疾患であり、その進行に伴い、歯周組織による結合織性付着および歯槽骨が破壊される。歯周炎を惹起する原因物質の除去療法では、このように一旦喪失された歯周組織を再生させることは困難であった。しかしながら、近年の研究により、歯根膜細胞の機能を積極的に活性化すれば、歯周炎の進行により失われた歯周組織を再生し得ることが明らかにされている。歯周組織の創傷治癒、再生の過程には種々の細胞増殖及び分化因子が関与しているものと考えられているが、その詳細はいまだ十分には解明されていない。我々の研究室では、幅広い種類の間葉系細胞に対して細胞増殖促進能を有し、かつ強力な血管新生作用を具備する塩基性線維芽細胞増殖因子 (Basic fibroblast growth factor; bFGF) に着目し、ビーグル犬に人工的に作成した様々な歯槽骨欠損形態を示す歯周疾患モデルにおいて、bFGF の局所応用が歯周組織再生を促進することをこれまでに見い出している。本研究では、bFGF のヒト歯周組織再生への応用の可能性を探ることを目的として、*in vitro* モデルにてヒト歯根膜細胞に対する bFGF の生物学的作用を詳細に検討した。

実験に供したヒト歯根膜細胞は、Somerman らの方法に準じ、矯正治療に伴い便宜抜歯された臼歯の歯根中央部に付着している歯根膜組織から outgrowth した細胞をヒト歯根膜細胞 (HPDL) とした。実験には、4~6 代継代した細胞を用いた。HPDL による DNA 合成量の測定は、<sup>[3]H</sup>-チミジンの細胞内取り込みを指標として行った。また、DNA 量の測定は、Paigen および Labarca らの方法に準じて HPDL の破碎液の一部を 2M 塩化ナトリウム (NaCl), 50mM トリス-塩酸緩衝液, 1 μg/ml ビスベンジミダゾールにて調製し、励起光波長 356nm, 蛍光波長 458nm にて蛍光光度を測定し DNA 量を測定した。アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性の測定は、Bessay および Lowry らの方法に準じ、HPDL の破碎液の一部に 0.5M トリス-塩酸緩衝液, 0.5mM 塩化マグネシウム, 0.5mM パラニトロフェニル 2 リン酸ナトリウムを加え、37°C にて 30 分間反応させた後、1M 水酸化ナトリウム (NaOH) にて反応を停止させ、410nm における吸光度を吸光光度計にて測定し ALPase 活性を求めた。石灰化物の観察は、Dahl らの方法に準じ、HPDL を 95% エチルアルコールにて固定後、石灰化物を 1% アリザリンレッド S 溶液にて染色し、位相差顕微鏡にて観察した。HPDL の培養上清中に含まれるコラーゲン量は The Sircol Collagen Assay Kit (Biocolor Ltd., Belfast, N.Ireland) を用いて測定した。また、細胞層に貯留されたコラーゲン量は、<sup>[3]H</sup>-プロリンの取り込み量を測定することにより解析した。さらに、FGF レセプター (FGFR) 数および bFGF と FGFR との親和性は、FGF radioreceptor assay によって検討した。すなわち、<sup>[125]I</sup> - bFGF と 0~500ng/ml の bFGF

存在下にて4℃、2.5時間HPDLを培養後、0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.8M NaCl、10mM n-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid溶液にて洗浄した。1N NaOHで同細胞を処理し、細胞表面に結合した [<sup>125</sup>I]-bFGFの放射活性をカウンターにて測定した。FGFR数およびbFGFとFGFRとの親和性の解析には、Scatchard解析法を用いて行った。一方、細胞外基質及びFGFRサブタイプmRNA発現の解析は、Type IおよびType IIIコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、FGFR-1、FGFR-2、FGFR-3、FGFR-4のmRNA発現を、各々に特異的なプライマーを用いて、通法に従いReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を行うことにより解析した。

bFGF存在下でHPDLを培養すると、HPDLの [<sup>3</sup>H]-チミジンの取り込み量はbFGF濃度依存的に増加し、10ng/mlで飽和に達した。一方、石灰化マーカーであるALPase活性の発現は、添加したbFGFの濃度に依存して抑制された。また、培地中に10mMβ-グリセロリン酸、50μg/mlアスコルビン酸リノ酸を添加しHPDLを培養し続けると石灰化物の形成が *in vitro*で認められたが、bFGF刺激によりこの石灰化物の形成は著明に抑制された。次に、HPDLによるコラーゲン合成に対するbFGFの効果を検討した。その結果、HPDLが培養上清中ならびに細胞外基質中に産生したコラーゲン量は、添加したbFGFの濃度に依存して減少した。さらにRT-PCR法を用いた解析から、bFGF刺激によりType IコラーゲンmRNA発現が抑制されるものの、Type IIIコラーゲンmRNA発現はほとんど影響を受けないことが明らかとなった。また、非コラーゲン性細胞外基質産生について検索したところ、興味深いことに、HPDLはbFGF刺激を受けると、血管新生に重要な役割を果たすラミニンのmRNA発現を亢進するが、フィブロネクチンmRNA発現には影響を及ぼさないことが明らかとなった。次に、細胞の分化に伴いbFGFに対する応答性がいかなる変化を示すのかを検討した。その結果、bFGFによるALPase活性抑制効果は、HPDLの分化過程が進むに連れて減少した。このことは、HPDLは分化に伴いbFGFに対する応答性が低下することを示している。そこで、次にこの応答性の低下がいかなる機構によるものかを明らかにするためにFGFRの発現の変化を解析した。その結果、 [<sup>125</sup>I]-bFGFを用いたradioreceptor assayを行ったところ、コンフルエントのHPDL1個あたり1.0×10<sup>5</sup>のFGFRが存在し、bFGFとFGFRとの親和性を示す解離定数dissociation constant (Kd) 値は120(pM)であり、さらにFGFR数はHPDLの分化過程が進むに連れて減少することが明らかとなった。また、RT-PCR法を用いた解析から、HPDLはFGFRサブタイプ中のFGFR-1およびFGFR-2のmRNAを発現していることが明らかにされた。

本実験結果から、bFGFはHPDLの増殖を促進する一方で、HPDLのALPase活性を抑制するとともに、石灰化物形成をも抑制し、さらにはコラーゲン産生を抑制することが明らかとなった。このことから、HPDLはbFGFの刺激を受けると硬組織形成細胞への分化が抑制され、未分化な状態を維持したままその細胞の増殖が促進されると考えられる。また、未分化なHPDLはより多くのFGFRを有し、bFGFに対する応答性も高いことから、bFGFは創傷治癒過程の初期の段階で未分化な歯根膜細胞の細胞密度を高め、その結果、歯周組織の再生がより効率良く誘導される可能性があるものと推察される。また、本研究からHPDLがbFGFにより刺激を受けた場合、ラミニンの産生が亢進することが明らかとなった。局所で産生亢進されたラミニンは、歯根膜細胞の遊走ならびに血管新生の促進に重要な役割を果たし、歯周組織再生を促進する可能性が考えられる。今後、歯周組織再生機構が詳細に解明されるとともにbFGFを用いた新しい歯周組織再生療法の確立が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周組織再生に不可欠なヒト歯根膜細胞(HPDL)の細胞機能に及ぼす塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の作用を詳細に検討したものである。その結果、bFGFはHPDLの硬組織形成能を有する細胞への分化を抑制しつつ、HPDLを未分化な状態のままで活発に増殖させることを明らかにした。また、bFGFはHPDLのコラーゲン産生を抑制するとともに、同細胞のラミニンmRNA発現を亢進させ、HPDLの細胞外基質産生を制御していることが示された。一方、培養初期ではHPDLはFGFレセプター(FGFR)を数多く有しておりbFGFに対し高い応答性を示すことが明らかとなった。しかしながら、硬組織形成能を有する細胞へとHPDLの分化過程が進むと

FGFR の bFGF に対する親和性は変化することなくその発現数は減少し, bFGF に対する HPDL の応答性は低下することが確認された。以上の知見は、今後 bFGF を用いた新しい歯周組織再生療法を確立する上で極めて有益な情報であり、博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認める。