

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	https://hdl.handle.net/11094/40900
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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小白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、 $[^3\text{H}]$ -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 の破砕液の一部を 2 M 塩化ナトリウム (NaCl), 50mM トリシュー塩酸緩衝液, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 の破砕液の一部に 0.5M トリシュー塩酸緩衝液, 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、1 M 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、 $[^3\text{H}]$ -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、 $[^{125}\text{I}]$ -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。1 N NaOH で同細胞を処理し, 細胞表面に結合した [¹²⁵I]-bFGF の放射活性をγ-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 [³H]-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 10mM β-グリセロリン酸, 50 μg/ml アスコルビン酸リン酸を添加し 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, [¹²⁵I]-bFGF を用いた radioreceptor assay を行ったところ, コンフルエントの HPDL 1 個あたり 1.0x10⁵ 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。