The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	セメント質由来増殖因子の分子性状とその特性
Author(s)	池澤, 一彦
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41149
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

【 2 】

氏　　名	池　澤　一　彦（いけざわ　かずひこ）
博士の専攻分野の名称	博　　士（歯　　学）
学 位 記 番 号	第　14075　号
学位授与年月日	平成10年6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 名	**セメント質由来増殖因子の分子性状とその特性**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　岡田　宏 （副査） 教 授　恵比須繁之　助教授　開　祐司　助教授　脇坂　聡

論 文 内 容 の 要 旨

セメント質は歯根を被覆する硬組織であり，歯周組織における結合組織性付着の構成要素の一つとして，歯の支持に不可欠な役割を果たしている。歯周病は細菌感染による炎症疾患であり，歯周組織破壊を伴う。歯周組織破壊の進行と共にセメント質は壊死し，本来の機能を失うばかりか，その存在は治癒の妨げとなる。そのため現在の歯周治療では，壊死セメント質を除去することが原則とされている。このことが，歯周治療後の歯周組織再建を非常に困難なものにしており，セメント質新生なしには真の歯周組織再生は得られない。近年，セメント質中に種々の増殖因子および接着因子が含まれており，これらの因子がセメント質形成や結合組織性付着形成に関与しているのではないかと考えられている。Narayanan らはこれまで，セメント質に既知の増殖因子とは異なった性状を有する増殖因子が存在することを報告し，これを精製してセメント質由来増殖因子（CGF）と呼称した。今回はこの増殖因子のさらなる精製および分子性状の解析を目的として以下の実験を行った。

ヒト歯肉線維芽細胞は，ボランティアより健康な辺縁歯肉を採取し，組織から outgrowth してきた細胞を6～12代継代し，ヒト歯肉線維芽細胞とした。ヒト歯槽骨由来細胞は，神奈川歯科大学，川瀬俊夫教授より供与された初代培養株を6代継代した後，ヒトパピロマウイルス-タイプ16の E6E7 gene を含むレトロウイルスを用いて不死化したものを実験に供した。CGF の精製は，ウシ抜去歯よりセメント質を採取し，1.0 M 酢酸でタンパク質を抽出後，ヘパリンカラムにて中等度ヘパリン親和性分画を分離した。この分画から，陽イオン交換，ゲル濾過，C18逆相のカラムを用いて高速液体クロマトグラフ（HPLC）にてヒト歯肉線維芽細胞に対する増殖促進活性を指標として精製を行った。増殖促進活性の測定は，細胞を播種し，無血清培地で quiescent にした後に，各精製画分または精製 CGF で刺激し，[^{3}H]-チミジンの取り込みを測定することにより行った。CGF の分子量解析は，SDS-PAGE に展開し，銀染色法によりバンドを確認後，ゲルをスライスし，各分子量のタンパク質を電気的に抽出し，ヒト歯肉線維芽細胞に対する増殖促進活性を測定することにより行った。CGF の部分アミノ酸配列の決定は，TPCK トリプシンで分解し，C18逆相 HPLC で各ペプチドを分離後，ガスクロマトグラフィーにより部分アミノ酸配列を決定した。CGF の分解ペプチドからインシュリン様増殖因子-I（IGF-I）と同一の部分アミノ酸配列を得たことから，CGF と IGF-I のヒト歯肉線維芽細胞とヒ

ト歯槽骨由来細胞に対する増殖促進活性を上皮増殖因子（EGF）の共存下，非共存下で比較検討した。さらに，CGFの増殖促進活性の抗IGFI抗体および抗IGF-Iレセプター抗体による中和実験を行った。CGFとIGF-Iのヘパリン親和性の比較は，CGFおよびIGF-Iをヘパリンカラムに加え，各濃度のNaCl溶液で段階的に溶出し，それぞれの画分のヒト歯肉線維芽細胞に対する増殖促進活性を比較検討することにより行った。CGFの糖鎖修飾の検討は，CGFをN-グリコシダーゼで処理後，CGFを認識しうる抗IGF-I抗体を用いてImmunoblot法にて検討した。

その結果，CGFは，14-16 kDaおよび18-22 kDaの2本のメジャーなバンドからなっていた。増殖促進活性は11-22 kDaの範囲に見られたが，その活性中心は14-16 kDaに存在した。CGF由来のペプチドから，ヒツジIGF-I遺伝子の非翻訳部位を演繹翻訳した際の配列と高いホモロジーをもったアミノ酸配列およびIGF-Iのレセプター認識部位と共通のアミノ酸配列を得た。CGFはヒト歯肉線維芽細胞に対してはIGF-Iとほぼ同等の増殖活性を示したが，ヒト歯槽骨由来細胞に対してはIGF-Iより強い増殖活性を示した。CGFのヒト歯肉線維芽細胞に対する増殖促進活性は，IGF-IおよびIGF-Iレセプターに対する中和抗体により，中和された。IGF-Iはヘパリンに親和性を示さなかったが，CGFはヘパリンに対して中等度の親和性を示した。抗IGF-I抗体を用いたImmunoblot分析により，CGFの18-22 kDa formは，N-グリコシダーゼにより糖鎖が分解されて14-16 kDa formとなった。

CGFは，IGF-Iと共通のアミノ酸配列を有し，IGF-Iレセプターを介して歯周組織由来の種々の細胞に対し増殖促進活性を示すが，IGF-Iとは異なる分子量，ヘパリン親和性，糖鎖修飾を有し，さらに歯槽骨由来細胞に対してはIGF-Iより強い増殖促進活性を示す。これらのことから，CGFはセメント質基質特異的に存在し，IGF-Iと類似の増殖因子でありながら異なった種々の分子性状を有することにより，セメント質表面でセメント芽細胞の選択的増殖を促進するといったIGF-Iにはない固有の機能を発揮している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，セメント質基質中に主たる増殖因子として局在するセメント質由来増殖因子(cementum derived growth factor 以下CGFと略す)を分離精製し，その分子性状および生物学的特性を解析したものである。その結果，CGFはインシュリン様増殖因子-I (insulin-like growth factor-I 以下IGF-Iと略す）と共通のアミノ酸配列を有し，IGF-Iレセプターを介して歯周組織由来の種々の細胞に増殖活性を示し，上皮増殖因子（epidermal growth factor 以下EGFと略す）との共存により相乗効果あるいは相加効果を示すなどIGF-Iとの相同性が高い。しかし一方，IGF-Iとは異なる分子量，ヘパリン親和性，糖鎖修飾性を示し，また歯槽骨由来細胞に対してはIGF-Iより強い細胞増殖活性を示すなどIGF-Iとは異なる生物活性を有していることを明らかにした。これらの結果より，CGFはEGFやその他の血清因子と協調して歯周組織中の線維芽細胞の増殖をIGF-Iと同様に促進すると共に，IGF-Iとは異なる特性により，セメント芽細胞の選択的増殖をセメント質表面で促進するといったCGF特有の機能をも発揮している可能性が示唆された。本研究は歯周組織再生過程において，セメント質中の増殖因子が促進する歯根膜組織の再生，およびセメント質の新生機構に重要な知見をもたらしたものであり，博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認める。