



Title	FGF-2とIGF-IによるMAPキナーゼ経路を介した歯根膜由来細胞の増殖・分化の制御機構
Author(s)	樋口, 高広
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42461">https://hdl.handle.net/11094/42461</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	樋口高広
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第16132号
学位授与年月日	平成13年3月23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	FGF-2とIGF-IによるMAPキナーゼ経路を介した歯根膜由来細胞の増殖・分化の制御機構
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 宏
	(副査) 教授 米田 俊之 教授 森崎市治郎 講師 岩本 容泰

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

歯根膜組織由来の細胞が増殖するとともに、それが歯根膜、歯槽骨、セメント質を形成する細胞へと分化しなれば、歯周炎によって失われた歯周組織の再生は完全にはおこらない。健全な歯周組織の基質中に塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)やインシュリン様細胞増殖因子-I(IGF-I)が存在することが確認されており、歯周組織再生を促進する細胞増殖因子として期待される。

個々の細胞増殖因子は細胞膜表面上にある特異的受容体と結合することによりシグナルを細胞内に伝え、それぞれ特徴的な作用を引き起こす。しかしながら、細胞増殖因子によって受容体が異なっているにもかかわらず、共通の経路を介してシグナルが伝達されていることはめずらしくなく、またシグナル伝達経路が共通であっても、その作用のあらわれ方は様々である。mitogen activated protein kinase(MAPキナーゼ)カスケードは、多くの細胞増殖因子がシグナル伝達経路として利用している代表的カスケードの一つであり、FGF-2やIGF-Iも種々の細胞でこのカスケードを介してシグナルを核へ伝えている。

本研究では、培養ヒト歯根膜由来細胞(HPDL)の増殖、分化に対するFGF-2およびIGF-Iの個々の作用と両因子の協調作用を検討した。さらに、FGF-2やIGF-Iの刺激によるHPDLのMAPキナーゼの活性化の程度やその持続性を調べるとともに、MAPキナーゼキナーゼであるMAPK/ERK kinase(MEK)の特異的阻害剤U0126による上記増殖因子で刺激されたHPDLの増殖、分化への影響を検討した。

## 【材料および方法】

- 1) HPDLの樹立: 矯正治療目的で便宜抜歯された健全な臼歯の歯根表面から、通法により歯根膜組織を剥離し、この組織片よりoutgrowthしてきた細胞をHPDLとし、継代数5~12代のものを実験に用いた。
- 2) HPDLの増殖に関する検討: 血清飢餓により静止期に同調したHPDLを各種濃度のFGF-2、IGF-IおよびFGF-2+IGF-Iで刺激し、<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みを指標としてDNA合成促進活性を検討した。
- 3) HPDLの分化に関する検討: 10%ウシ胎児血清(FCS)を含む培地でコンフルエントで7~9日間培養し分化段階への移行期に当たるHPDLを準備した。同上細胞をFGF-2、IGF-IおよびFGF-2+IGF-Iで刺激し、48時間後のアルカリリフォスファターゼ活性(ALPase活性)を指標として硬組織形成細胞への分化促進活性を比較した。また、コンフルエントに播種したHPDLを2日間10%FCS存在下で培養後、2%FCS、10mMβ-

glycerophosphate を含む培地に上記増殖因子群を添加し、3日毎に12日間刺激し石灰化ノジュール形成をアリザリン染色にて検討した。

- 4) MAP キナーゼの発現量および活性化 MAP キナーゼ発現の検討：増殖促進活性の検討の実験と同様に上記増殖因子群で HPDL を刺激し、MAP キナーゼ (extracellular-signal regulated kinase : ERK 1 / 2) あるいは活性化 MAP キナーゼ (active ERK 1 / 2) に対する特異的抗体を用いて、MAP キナーゼの発現量と活性化 MAP キナーゼの発現をウエスタンプロットにより比較した。
- 5) MAP キナーゼの活性化阻害による影響の検討：MAP キナーゼキナーゼである MEK の特異的阻害剤 U0126 を持続的に HPDL に添加し、上記増殖因子群による HPDL の増殖、ALPase 活性への影響に変化が生じるか否かを同様の方法で比較した。

#### 【結果】

- 1) FGF-2 刺激は濃度依存的に HPDL の増殖を強く促進するのに対して、IGF-I 刺激は高濃度でもわずかに増殖を促進するのみであった。しかし、FGF-2 共存下においては IGF-I の濃度依存的かつ相乗的に、HPDL の増殖を促進した。
- 2) IGF-I 刺激は、HPDL の ALPase 活性や石灰化ノジュール形成を促進したのに対し、FGF-2 および FGF-2 + IGF-I 刺激はこれらを抑制した。
- 3) HPDL の ERK 1 と ERK 2 は同程度に発現していたが、いずれの増殖因子で刺激を行った場合においても、活性化 ERK 2 の方が活性化 ERK 1 よりも強く発現していた。また、FGF-2 刺激や FGF-2 + IGF-I 共刺激によって、HPDL の活性化 ERK 1 / 2 は長時間強い発現がみられたのに対し、IGF-I 刺激では活性化 ERK 1 / 2 は弱い発現が短時間みられただけであった。
- 4) U0126 によって MAP キナーゼの活性化を抑制している時間が長い程、HPDL の増殖活性はより強く抑制された。
- 5) U0126 によって MAP キナーゼの活性化を抑制しても HPDL の ALPase 活性に与える影響は軽微であった。

#### 【結論および考察】

IGF-I は FGF-2 と共に存在することで、HPDL の増殖を相乗的に促進するものの、FGF-2 による硬組織形成細胞への分化抑制には大きな影響を与えたかった。また、IGF-I 単独では HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進した。MAP キナーゼカスケードは、HPDL において FGF-2 と IGF-I の共通のシグナル伝達経路としてこれらの増殖シグナルの伝達に深く関与しており、とりわけ FGF-2 および FGF-2 + IGF-I による増殖促進効果やその相乗効果には、MAP キナーゼの活性化の強度のみならず、その活性化の持続が重要であることが示された。一方、MAP キナーゼの活性化は、HPDL の硬組織形成細胞への分化には大きな影響を及ぼさず、他のシグナル伝達経路の関与が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト歯根膜由来細胞の増殖や硬組織形成細胞への分化に対する、FGF-2 と IGF-I の作用を検討し、これらの作用と MAP キナーゼの活性化のパターンとの関連性を明らかにしたものである。すなわち、FGF-2 と IGF-I の共刺激は相乗的に増殖を促進する一方、硬組織形成細胞への分化は、IGF-I が促進し、FGF-2 が抑制した。さらに、両細胞増殖因子による相乗的増殖促進には MAP キナーゼの強い持続的活性化が必須であるが、分化制御と MAP キナーゼとの関連性は非常に弱いことが示された。この様な知見は、歯周組織の再生治療に FGF-2 と IGF-I の利用を考える上で貴重な情報を提供するものであり、博士（歯学）の学位請求に値するものと認める。