The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 歯根膜細胞のプロテオグリカン産生に及ぼす塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の影響に関する研究 |
| Author(s) | 市川, 朋生 |
| Citation | 大阪大学, 2004, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/45160 |
| 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

【41】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 市川朋生（いちかわともお） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（歯　学） |
| 学位記番号 | 第　18612　号 |
| 学位授与年月日 | 平成16年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>歯学研究科分子病態口腔科学専攻 |
| 学位論文名 | **歯根膜細胞のプロテオグリカン産生に及ぼす塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の影響に関する研究** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　村上　伸也<br>（副査）<br>教　授　雫石　聰　助教授　原田　英光　講　師　墨　哲郎 |

## 論文内容の要旨

【研究目的】

近年、サイトカインを局所投与することにより、歯周病により破壊された歯周組織を再生させる試みがなされている。我々の研究室では塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の生物学的活性に注目し、*in vivo* の系において FGF-2 が歯槽骨やセメント質の新生を伴う歯周組織再生を誘導し、*in vitro* の系においてはヒト歯根膜細胞（HPDL）のコラーゲン産生や石灰化能を FGF-2 が制御し得ることをこれまでに明らかにしてきた。一方、細胞外基質は、細胞間隙を埋める構成成分としてだけではなく、各々の細胞外基質は種々の生物学的活性を有し、細胞の増殖、遊走や分化、組織の創傷治癒に主要な役割を演じることが明らかとなってきている。細胞外基質はコラーゲン、非コラーゲンタンパク、プロテオグリカン（グリコサミノグリカン）に分類されるが、FGF-2 がグリコサミノグリカンの産生に及ぼす影響についての詳細は未だ明らかとなっていない。本研究では、グリコサミノグリカンのうち、創傷治癒過程においてとりわけ重要な役割を果たしていると考えられているヒアルロン酸（HA）およびヘパラン硫酸（HS）に焦点をあて、HPDL のこれら両グリコサミノグリカン産生に及ぼす FGF-2 の影響について解析を行った。

【材料および方法】

1. HPDL の培養：Somerman らの方法に準じ、矯正治療に伴い便宜抜歯された小臼歯の歯根中央部に付着している歯根膜組織を採取し、同組織から outgrowth した細胞を HPDL とした。実験には、6-11 代継代した細胞を用いた。2. 試薬：ヒトリコンビナント FGF-2（科研製薬株式会社より供与）、HA 合成阻害剤として 4-methylumbelliferone（4-MU）を用いた。3. 細胞培養上清中の HA 濃度測定：HA 結合蛋白（HABP）を用いた結合阻害測定法により定量した。4. 細胞培養上清中の HA 分子量測定：HPDL の培養上清をセファデックス G25 カラムで脱塩後、エバポレーターにより濃縮し、GPC カラム（TSK-GER G6000PWXL）を装着した HPLC 装置に、濃縮した試料を注入して分離溶出を行った。その後各分画の HA 濃度測定を(3)の方法に従って行った。5. 細胞培養上清中の HS 濃度測定：Heparan Sulfate ELISA Kit（生化学工業株式会社）を用いた酵素免疫測定法により定量した。6. HPDL における各種 mRNA 発現の解析：HA 合成酵素（HAS）及び HS 合成に関与する酵素群（GlcNAcT-1、HS2ST、NDST-1、NDST-2、epimerase）の各 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 を行うことにより解析した。7. 細胞表面上の HS の発現解析：マウス抗-

ヒトシンデカン-1 抗体およびヤギ抗-ヒトシンデカン-2 抗血清を用いてフローサイトメトリー及び免疫染色法にて解析した。

【結果】

(1)FGF-2 刺激による HPDL からの HA 産生とその産生機序について検討した。HPDL 培養上清中の HA 量は、FGF-2 濃度依存的に上昇するが、グリコサミノグリカンの一つでありヒアルロン酸と類似の組成を持つコンドロイチン硫酸量は殆ど変化が見られなかった。加えて FGF-2 は HPDL における高分子量型 HA 合成に関与する HAS1 および HAS2 mRNA 発現を亢進させることが明らかとなった。そこで FGF-2 刺激時の HPDL 培養上清中の HA 分子量を測定したところ、FGF-2 の濃度依存的に高分子量型 HA の産生が認められた。さらに HPDL を HA 合成阻害剤 4-MU にて HPDL 処理を行うと、FGF-2 によって誘導される HA 産生は無刺激のレベルまで抑制され、また FGF-2 によって誘導された HAS1 および HAS2 mRNA の亢進も抑制されることが明らかとなった。これらのことから、FGF-2 は HPDL の HAS1 および HAS2 の発現上昇を介して、HPDL の細胞表面および培養上清中の HA 産生を亢進させることが示唆された。(2)次に、HPDL における FGF-2 刺激による HS 産生とその産生機序について検討した。FGF-2 刺激によって HPDL 培養上清中の HS 濃度は濃度依存的に上昇した。次に HS 合成に関与する酵素群（GlcNAcT-1、HS2ST、NDST-1、NDST-2、epimerase）の mRNA 発現におよぼす FGF-2 刺激の影響について検討したが、これら酵素群の mRNA 発現に対して、FGF-2 は著明な変化を誘導しなかった。最近の報告から、細胞表面上の HS プロテオグリカンは種々の刺激を受け shedding を受けることが知られている。そこで HPDL 表面上の HS プロテオグリカン発現について検討したところ、FGF-2 はシンデカン-1 の発現を著明に変化させないのに対し、シンデカン-2 の発現を著明に減少させることが免疫染色法およびフローサイトメトリーを用いた解析から明らかとなった。これらのことから、FGF-2 刺激による HPDL 培養上清中の HS 量の亢進には少なくとも部分的に細胞表面上のシンデカン-2 の shedding が寄与している可能性が示唆された。

【結論と考察】

今回の研究において FGF-2 が HAS の発現上昇を介して HPDL の高分子量型 HA 産生を亢進するのに対し、培養上清中の HS の産生は少なくとも部分的には細胞表面 HS プロテオグリカンの shedding によって誘導される可能性が明らかとなった。HA は分子量の違いによって生物学的活性が異なり、高分子量型 HA は抗炎症的に作用することが報告されている。一方細胞表面に存在する HS プロテオグリカンは、他の細胞外基質結合受容体あるいは HS 結合性増殖因子の co-receptor として機能するとともに、幾つかの刺激や創傷時に細胞表面上に存在する HS プロテオグリカンの shedding が亢進すること、さらには、この遊離 HS プロテオグリカンが、炎症時の各種プロテアーゼと結合しプロテアーゼ活性を制御すること、あるいは HS 結合性増殖因子との結合によりその作用を制御することなどが報告されている。これらの知見と今回の研究結果を合わせ考えると、FGF-2 は種々のグリコサミノグリカンに対し異なった機序で細胞外の産生を誘導し、歯周外科時の創傷治癒あるいは組織再生にふさわしい微小環境の創生に深く関与しているものと考えられる。今回の研究成果は FGF-2 による歯周組織再生誘導に対する作用機序を理解する上で、重要な知見を提供するものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト歯根膜細胞のヒアルロン酸（HA）およびヘパラン硫酸（HS）産生に及ぼす塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の影響について解析を行なったものである。その結果、FGF-2 は同細胞に対して HA 合成酵素 1 および 2 の発現上昇を介し高分子量型 HA の産生を強く誘導することが明らかにされた。さらに FGF-2 は歯根膜細胞表面上のシンデカンの発現パターンを変化させることにより培養上清中の HS 量を増加させることが示された。これらの知見は FGF-2 の局所投与により誘導される歯周組織再生の分子機構を理解する上で重要な知見を提供するものと考えられ、本研究は博士（歯学）の学位を得るに値するものと認める。