The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	塩基性線維芽細胞増殖因子がヒト歯髄細胞の生物学的機能に及ぼす影響
Author(s)	植田, 真紀
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46406
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

氏　　名　植田真紀（うえだ まき）

博士の専攻分野の名称　博　士（歯　学）

学位記番号　第　20230　号

学位授与年月日　平成18年3月24日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

歯学研究科分子病態口腔科学専攻

学位論文名　**塩基性線維芽細胞増殖因子がヒト歯髄細胞の生物学的機能に及ぼす影響**

論文審査委員　（主査）
教　授　村上　伸也

（副査）
教　授　脇坂　　聡　　助教授　山城　　隆　　講　師　和田孝一郎

論文内容の要旨

［研究目的］

歯科医療において、象牙質・歯髄複合体の損傷に遭遇した場合には、残存歯髄を保護し保存することを目的として、種々の覆髄剤を局所投与することがなされている。近年の *in vitro* の研究から、歯髄組織中には象牙質様硬組織や骨組織を再生できる能力を有した未分化間葉系幹細胞の存在が報告されている。さらに、象牙質を含む歯の形成過程は、種々のサイトカインで制御されていることから、サイトカイン等により歯髄組織の生物学的機能を活性化することにより、う蝕や外傷により失われた象牙質や歯髄を再生させる治療法の開発が試みられている。塩基性線維芽細胞増殖因子（以下 FGF-2 と称す）は、多くの生物学的な活性を有するとともに、歯の発生過程においては、上皮・間葉系細胞間相互作用を通じて象牙質やエナメル質の形成制御を行っていると考えられている。また、FGF-2 は、萌出後の象牙芽細胞、象牙質基質および歯髄細胞にその発現が認められ、象牙質・歯髄複合体のホメオスタシスにも関与していると考えられている。これまでに、我々の研究室では、FGF-2 の強力な細胞増殖作用および血管新生作用に着目し、FGF-2 が歯周組織再生を強く促すことを示してきた。このことは、硬組織新生を伴う他の組織再生においても、FGF-2 が有効であることを示唆している。そこで、本研究では、FGF-2 の象牙質・歯髄複合体再生治療剤としての有効性について検討を行うとともに、その再生メカニズムの一端を明らかにする目的として、ヒト歯髄細胞（以下 HDP と称す）の増殖、遊走、分化ならびに細胞外基質産生に及ぼす FGF-2 の影響について検討を行った。

［材料と方法］

1）ビーグル犬を用いた FGF-2 による象牙質・歯髄複合体再生効果の検討：ビーグル犬の犬歯唇側面に窩洞を形成後、1/2 ラウンドバーで歯髄へ穿孔し、露髄面へ 0.4%FGF-2 含有ゼラチン、コントロールとしてゼラチン基剤単独あるいはダイカル® を貼付し、レジンにて充填を行った。1ケ月後、歯冠を切断し、脱灰固定後 HE 染色を施し病理組織学的検索を行った。2）HDP の分離と培養：HDP は、本実験への協力に同意を得た歯科矯正中の患者から便宜抜歯を行った歯の歯髄を採取後、初代培養し、組織より outgrowth してきた細胞を継代し、HDP として本研究に供した。3）試薬：リコンビナント FGF-2、β-グリセロリン酸、L-アスコルビン酸マグネシウム塩水和物、ビオチン化ヒアルロン酸結合タンパク、Alexa Fluor 568 標識ストレプトアビジンを本研究に供した。また、細胞増殖阻害剤としてマイトマイシン C を実験に用いた。4）DNA 合成量（増殖反応）の測定：HDP を種々の条件下にて培養し、培養終了後、[^{3}H]-thymidine にてパルスラベルし、[^{3}H]-thymidine の細胞内への取込みを指標とし、HDP の増殖反

応を定量した。5）ALPase 活性の検討：HDP を種々の条件下にて培養し、培養終了後、5 mM パラニトロフェニル-2-リン酸ナトリウム（pNP）を加え 37℃ 30 分間反応させた後、水解された pNP 量を求めた。なお、本研究では、30 分間に 1 nmol の pNP を水解する ALPase 活性を 1 U として DNA 量当たりのユニット値で示した。6）石灰化ノジュール形成の検討：HDP を種々の条件下にて培養し、形成される石灰化ノジュールをアリザリン染色にて検出した。7）各種 mRNA の検出：HDP を種々の条件下にて培養を行った後、全 RNA を抽出し、半定量性 RT-PCR 法にて mRNA 発現量の定量を行った。8）遊走試験：細胞排除用のシリコンシート（7 mm×3 mm）を敷いたガラスボトム dish に HDP を播種し、コンフルエントに達した時点でシートを除去することで cell free space を作成し、種々の条件下で 24 および 48 時間培養後、1 mm 幅の cell free space に遊走してきた細胞数を 3 部位以上計測し、定量化した。9）培養上清中のヒアルロン酸量の検出：HDP を種々の条件下で培養後、培養上清を回収し、同上清中のヒアルロン酸量を測定キットを用いて定量した。10）培養上清中のヘパラン硫酸量の検出：HDP を種々の条件下で培養後、培養上清を回収し、同上清中のヘパラン硫酸量を測定キットを用いて定量した。11）cytochemistry によるヒアルロン酸の検出：8）と同様の方法で cell free space を作成し、FGF-2 存在下あるいは非存在下で 24 時間培養後、2％パラホルムアルデヒドにて固定後、ビオチン化ヒアルロン酸結合タンパクを反応させた後、Alexa Flour 568 標識ストレプトアビジンを反応させた。その後、DAPI を含む PBS 溶液にて核染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。

［結果］

1）実験的に作製したビーグル犬の露髄面へ FGF-2 を貼付した群では、ゼラチン基剤単独貼付群あるいはダイカル処理群に比べ第 3 象牙質の形成量が多いことが示された。また、FGF-2 貼付群では、形成された窩洞部にも及ぶ象牙質様硬組織形成が認められた。2）HDP を石灰化誘導培地にて長期培養すると、bone sialoprotein（以下 BSP と称す）、osteopontin、dentin matrix protein-1（以下 DMP-1 と称す）、dentin sialophosphoprotein（以下 DSPP と称す）mRNA の発現が上昇することが確認された。3）HDP は、FGF 受容体の FGFR-1、2、3、4 mRNA を発現していた。4）HDP を石灰化誘導培地にて長期培養すると、ALPase 活性が上昇し、石灰化ノジュールを形成することも確認された。FGF-2 による刺激は、石灰化誘導培地にて培養された HDP の ALPase 活性および石灰化ノジュール形成を可逆的に抑制した。5）FGF-2 は、HDP による DMP-1、DSPP、タイプ I コラーゲン、オステオネクチン、BSP、デコリン、バイグリカン mRNA の発現を抑制し、ラミニン α3 の発現を亢進した。6）FGF-2 は、濃度依存的に HDP の増殖活性を促進し、1％FCS 存在下では、その効果は、相乗的に促進された。7）FGF-2 は、HDP の cell free space への遊走を促進することが明らかとなった。また、cytochemistry によるヒアルロン酸発現は、遊走していない細胞層で比較すると、無刺激に比し FGF-2 刺激された細胞においてヒアルロン酸の発現が高いことが明らかとなり、cell free space に検出される遊走中の細胞では、FGF-2 刺激の有無に関わらずヒアルロン酸の強い発現が認められた。8）FGF-2 は、HDP のヘパラン硫酸合成関連酵素群 mRNA の発現および培養上清中に放出されるヘパラン硫酸量ともに、影響を与えなかった。9）FGF-2 は、HDP のヒアルロン酸合成酵素-1、2 mRNA の発現を亢進し、HDP からのヒアルロン酸産生を促進することが示された。

［結論と考察］

FGF-2 は、象牙質・歯髄複合体の再生誘導剤として、有効である可能性が示唆された。HDP を用いた *in vitro* の解析から、FGF-2 は、ヒト歯髄細胞の硬組織形成細胞への分化および石灰化に関連して発現する細胞外基質の発現を可逆的に抑制し、一方で歯髄細胞の増殖、遊走、および遊走と関連の深いヒアルロン酸産生を促進させることが明らかとなった。従って、FGF-2 は、う蝕や外傷により失われた象牙質・歯髄複合体欠損部への歯髄細胞の遊走および増殖を促進するのみならず、細胞外基質産生制御を通じて、象牙質・歯髄複合体再生に有利な局所環境を創出することにより、同部の再生を促進する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）が歯髄細胞の生物学的機能に及ぼす影響について解析を試みたものである。その結果、ビーグル犬に作製した露髄面へ FGF-2 を貼付することにより、第三象牙質の形成が著明に認め

られた。また、FGF-2は、ヒト歯髄細胞の硬組織形成分化過程を可逆的に抑制する一方で、ヒト歯髄細胞の増殖および遊走、また遊走と関連の深いヒアルロン酸産生を促進させることが明らかにされた。本知見は、FGF-2が種々の歯髄細胞機能を制御することにより象牙質・歯髄複合体を再生し得る可能性を示唆したものであり、FGF-2を用いた新規象牙質・歯髄複合体治療剤を開発する上で重要な情報を提供したものと考えられる。よって、本研究は博士（歯学）の学位を得るに値するものと認める。