

Title	FGF-2により誘導される血管新生に対する歯根膜細胞の関与
Author(s)	兒嶋, 由子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59290
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

【38】

氏 名	こ じま ゆう こ 児 嶋 由 子
博士の専攻分野の名称	博 士（歯学）
学 位 記 番 号	第 2 5 0 4 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 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	FGF-2 により誘導される血管新生に対する歯根膜細胞の関与
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村上 伸也 (副査) 教 授 豊澤 悟 准教授 西村 理行 准教授 杉村 光隆

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

当研究室では、FGF-2（塩基性線維芽細胞増殖因子）の局所投与がセメント質・歯根膜・歯槽骨の新生を伴う理想的な歯周組織再生を促進することを種々の動物実験において明らかにしてきた。また *in vitro* の実験結果をもとに、FGF-2 が歯根膜細胞の増殖や遊走を促進し、細胞外基質産生を制御することにより、歯周組織再生を促進している可能性が示唆されている。一方、組織再生の場において細胞の増殖・遊走・分化を誘導・維持するためには、同局所に栄養を供給する毛細血管の新生が不可欠である。本研究では、FGF-2 誘導性の歯周組織再生過程における、歯根膜細胞の血管新生への関与について着目し、FGF-2 刺激後の、歯根膜細胞を起点とした血管新生機構について検討することを目的とした。

【材料および方法】

1) マウス歯根膜細胞における VEGF（血管内皮細胞増殖因子）および VEGF 受容体の発現の解析

本研究では、2.5 週齢 BALB/c マウス歯根膜より樹立した歯根膜クローン細胞の中で、高い分化能を有する細胞株 MPDL22 を歯根膜細胞として用いた。MPDL22 に FGF-2 を添加した際の VEGF およびその受容体の mRNA 発現を RT-PCR およびリアルタイム PCR 法にて、VEGF 産生量を ELISA 法にて検討した。

2) VEGF がマウス歯根膜細胞に及ぼす影響についての解析

①MPDL22 の増殖能に及ぼす FGF-2 および VEGF の影響 : MPDL22 に FGF-2 および VEGF を添加した際の細胞増殖能を、WST-1 assay 法にて評価した。

②MPDL22 の遊走能に及ぼす FGF-2 および VEGF の影響 : MPDL22 に FGF-2 および VEGF を添加した際の細胞遊走能について、チャンパー法および Wound healing assay 法にて検討を行った。

3) FGF-2 および VEGF 刺激が血管管腔形成に及ぼす影響についての検討

3次元マトリゲル内にて、FGF-2 および VEGF 存在下で bEnd5 (マウス脳内皮細胞) を単独培養、あるいは MPDL22 と共培養し、血管管腔形成能に及ぼす影響を検討した。また、bEnd5 と MPDL22 の共培養時の血管管腔形成能について共焦点顕微鏡および Time-lapse assay 法にて解析した。さらに VEGF 中和抗体存在下での血管管腔形成能の変化を検討した。加えて、共培養時における bEnd5・MPDL22 両細胞からの VEGF 産生量を ELISA 法にて測定した。

【結果】

1) FGF-2 刺激により、MPDL22 における *Vegf* mRNA 発現は、濃度依存的に上昇した。また、VEGF 産生量も mRNA 発現に相関して上昇した。さらに、FGF-2 は MPDL22 における *Vegfr-1* の mRNA 発現を濃度依存的に誘導した。

2) VEGF は FGF-2 と協調的に働き、MPDL22 の増殖を促進した。また、VEGF 単独刺激では MPDL22 の遊走能は著明な変化を認めなかったものの、FGF-2 と VEGF の共刺激により、MPDL22 の遊走能は相乗的に亢進した。

3) FGF-2 と VEGF の共刺激は、bEnd5 の管腔形成を促進させた。また、MPDL22 と共培養することにより bEnd5 の著明な管腔形成が観察された。さらに、bEnd5 と MPDL22 共培養時の VEGF 産生量は、それぞれの細胞単独時と比べて相乗的に上昇した。また、同共培養にて亢進した血管管腔形成は、VEGF 中和抗体存在下で阻害された。共培養時の細胞を共焦点顕微鏡にて観察したところ、管腔形成を行う bEnd5 の周囲に MPDL22 がペリサイト様に結合する像を認めた。同様の実験を Time-lapse assay 法にて観察すると、MPDL22 が bEnd5 の管腔形成を裏打ちするように遊走・配列することを示唆する像が得られた。加えて、MPDL22 の表面抗原分子を検討したところ、ペリサイトマーカである NG2 (NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン) 及び PDGFR- β (血小板由来増殖因子受容体 β) が mRNA およびタンパクレベルで発現していることが確認された。

【考察】

本研究において、血管内皮細胞増殖因子である VEGF およびその受容体が、FGF-2 濃度依存的に歯根膜細胞から発現誘導されることが明らかとなった。また、歯根膜細胞が血管内皮細胞周囲に結合して VEGF を産生することで、FGF-2 と相乗的に血管管腔形成を促進している可能性が示唆された。加えて、歯根膜細胞が VEGF・FGF-2 の共刺激によりペリサイト様の形質を持つことから、歯根膜細胞が微小周囲環境により歯周組織再生に関与す

る細胞群へと分化し得る間葉系幹細胞として機能する可能性が示唆された。本研究結果は、現在知られている FGF-2 による組織再生の誘導機序としての直接的作用、すなわち“歯根膜細胞に直接作用し歯根膜細胞の増殖・遊走と細胞外基質産生を促す”機序に加え、血管新生の誘導機序として、“FGF-2 自身が血管内皮細胞からの VEGF 産生を促し血管新生を促進する”作用、さらに FGF-2 により歯根膜細胞より産生された VEGF が、間接的に細胞増殖・細胞遊走に関わることで、組織再生の場を最適な条件に整えているという可能性を示すものである。

以上より、本研究において、FGF-2 添加を起点とした歯根膜細胞と血管内皮細胞との相互作用が、血管新生という観点から歯周組織再生にふさわしい局所環境の創出に寄与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、FGF-2 誘導性の歯周組織再生過程における、歯根膜細胞 (PDL) の血管新生への関与に着目し、FGF-2 刺激後の歯根膜細胞を起点とした血管新生機構について検討した。その結果、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) と受容体である VEGFR-1 が PDL に発現し FGF-2 濃度依存的に上昇すること、FGF-2 と VEGF は協調的に PDL の増殖・遊走を増強させることを見出した。さらに PDL と血管内皮細胞を共培養することにより、内皮細胞の管腔形成の促進と、PDL のペリサイト様変化を認め、結果として血管新生を支持する事が明らかとなった。

以上の知見は、FGF-2 刺激により PDL から誘導された VEGF と FGF-2 が協調的に働き、FGF-2 投与部位の血管新生を促進し、歯周組織再生にとって好ましい局所環境を整備するという可能性を示唆するものであり、博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認める。