



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)	柳田, 学; 村上, 伸也
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2015, 60(1), p. 1-5
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60662">https://hdl.handle.net/11094/60662</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 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

柳田 学\*, 村上 伸也\*

(平成 27 年 6 月 8 日受付)

## はじめに

種々の疾患に対してリコンビナントサイトカインを治療薬として応用しようとする試みが進められている。歯周治療学の分野においても 1990 年代初頭より、サイトカインを局所投与することにより歯周組織欠損部周辺組織、特に歯根膜細胞を活性化して歯周組織再生を誘導しようとする検討がなされ、サイトカイン療法は次世代の歯周組織再生療法として大いに期待されている<sup>1,2)</sup>。我々の研究室では、ビーグル犬およびカニクイザルを用いた実験的歯周病モデルにおいて、歯周組織欠損部へリコンビナント塩基性線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor-2, 以下 FGF-2 と略す) を局所投与することにより、歯槽骨やセメント質の新生を伴った理想的な治癒像を呈する歯周組織再生を強く誘導することを明らかにしてきた<sup>3-5)</sup>。さらに、ランダム化比較試験による第 II 相臨床試験にて、2 壁及び 3 壁性骨欠損部への 0.3% FGF-2 の投与が、プラセボ群と比較して有意な新生歯槽骨新生を誘導すること、同治療中に安全性上問題になるような事例を認めないことを報告してきた<sup>6,7)</sup>。

FGF-2 はヘパリン結合タンパクファミリーの 1 つで、組織発生の過程における中胚葉誘導、血管新生、筋細胞の分化、軟骨細胞の増殖、細胞外基質産生の調節などに関与し、間葉系細胞や神経胚由来細胞に幅広く作用するサイトカインである<sup>8)</sup>。これまでの当研究室での

*in vitro* の解析から、FGF-2 による歯周組織再生誘導には、①歯根膜細胞に対する増殖促進作用と、②細胞外基質の産生制御と血管新生に代表される再生部位における局所環境整備<sup>9,10)</sup>、という 2 つの機序が関与しているとの仮説を立てている。すなわち創傷治癒や組織再生の場合においては、細胞増殖とそれを支える局所環境の整備が重要であり、増殖した細胞に栄養を供給するための血管新生は不可欠なイベントである。FGF-2 は血管内皮細胞に直接作用し、その遊走・増殖を促すことで血管新生を誘導する。我々の研究室においてもイヌ 3 壁性骨欠損部に FGF-2 を投与した際、FGF-2 投与 1 週間後に新生血管が強く誘導されることを組織学的に確認している<sup>11)</sup>。しかしながら、FGF-2 誘導性の歯周組織再生時における、FGF-2 とその他の血管新生誘導因子との関与、血管新生に関与する細胞動態については未だ十分には明らかとされていないのが現状であった。血管新生の過程においては FGF-2 のみならず様々なサイトカインの関与が知られており、その中でも中心的役割を果たすものとして血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, 以下 VEGF と略す) -A が挙げられる。VEGF-A は血管形成および脈管形成に関わる糖タンパクであり、主に血管内皮細胞上に存在する受容体型チロシンキナーゼの一種である VEGF 受容体と特異的に結合し、血管内皮細胞の増殖、透過性亢進や管腔形成促進、内皮細胞からの生理活性物質産生誘導を引き起こすことが知られている<sup>12)</sup>。

\* 大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)

本総説の一部内容は、平成 27 年 1 月 8 日に開催された大阪大学歯学会第 119 回例会において、平成 26 年度弓倉学術奨励賞の受賞講演 (対象論文: Yanagita, M. *et al.* (2014): Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. *J Dent Res*, **93**, 89-95.) として発表した。本研究は日本学術振興会科学研究費補助金 23249086, 23390452, 23390478, 23593057, 24890125 の支援のもと行われた。

さらに、創傷治癒や組織再生の過程を制御する重要な機序の一つとして、細胞間相互作用が挙げられる。生体内は多種多様な細胞種によって構成されており、その細胞同士の直接的な相互作用がその後の細胞動態に重要な役割を果たすことは明らかである<sup>13)</sup>。しかしながら、FGF-2により誘導される歯周組織再生の過程において、このような細胞間の相互作用がどのように関与しているのかについてはほとんど検討されていない。そこで本研究<sup>14)</sup>では、FGF-2により誘導される歯周組織再生過程において、血管新生部位に誘導される VEGF-A と歯根膜細胞が血管新生にどのように関与しているかについて注目し、FGF-2 刺激後の歯根膜細胞を起点とした血管新生に関する細胞動態について検討を行ったので概説する。

### FGF-2 が歯根膜細胞による VEGF-A 発現に及ぼす影響

マウスの歯根膜組織より樹立したクローン細胞 MPDL22 に FGF-2 刺激を加えた際の VEGF-A の発現を mRNA およびタンパクレベルで検討したところ、FGF-2 の濃度依存的にそれらの発現が誘導された。次に、VEGF 受容体の発現についても検討を行ったところ、MPDL22 において FGF-2 濃度依存的に VEGF 受容体の発現が誘導された。ヒト由来歯根膜細胞株においても同様の結果が得られた。以上の結果より、FGF-2 刺激により誘導された VEGF-A は血管内皮細胞に作用するのみならず、歯根膜細胞上に発現した VEGF 受容体を介して、オートクライン・パラクライン的に歯根膜細胞に結合している可能性が示唆された。

### FGF-2・VEGF-A 共刺激が歯根膜細胞の遊走活性および血管内皮細胞の管腔形成能に及ぼす影響

まず VEGF-A および FGF-2 存在下における MPDL22 の遊走能の変化について検討した。以前我々は、FGF-2 は MPDL22 の遊走能を増強すると報告している<sup>15)</sup>。本研究において、VEGF-A による MPDL22 遊走能を検討したところ、VEGF-A 単一刺激では MPDL22 の遊走能の変化はほとんど認められなかった。一方、FGF-2・VEGF-A 共刺激存在下での MPDL22 の遊走能は FGF-2、あるいは VEGF-A 単一刺激時と比較して相乗的に上昇した。図 1 (A) に細胞遊走能を評価する創傷治癒試

験の結果を示す。FGF-2, VEGF-A 単一刺激により中央の無細胞部への MPDL22 の遊走が促進するのみならず、FGF-2・VEGF-A 共刺激によりその細胞遊走が著明に刺激された。図 1 (B) は、図 1 (A) の遊走した細胞量を数値化したものである。

VEGF-A と FGF-2 は、共に直接血管内皮細胞に作用し、血管内皮細胞の増殖・遊走・血管管腔形成に影響を及ぼす。そこで我々は、FGF-2 誘導性の歯周組織再生過程において、投与された FGF-2 と FGF-2 刺激を受けた歯根膜細胞より産生される VEGF-A とが歯周組織局所において協調的に血管新生を制御するとの仮説を立て、FGF-2 および VEGF-A の共刺激が血管内皮細胞の形態変化に及ぼす影響について検討を行った。そこで、3次元培養を行うため Matrigel 内にマウス血管内皮細胞 b.End5 を播種し、細胞の形態変化について検討を行った。FGF-2 および VEGF-A 単一刺激による b.End5 の培養を行ったところ、FGF-2 および VEGF-A の濃度依存的に、血管内皮細胞の血管管腔様形態への

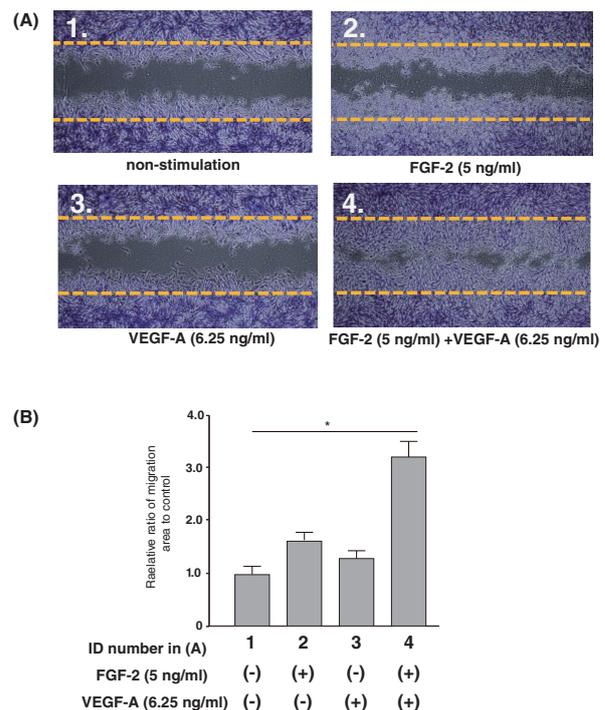


図 1 FGF-2 および VEGF-A 共刺激による MPDL22 の遊走能の亢進

(A) 創傷治癒実験の結果

(B) (A) における中央の無細胞部に遊走した細胞の画像解析を行い、遊走細胞面積を算出した。無刺激時に遊走した細胞面積を 1 とした。ID 番号はそれぞれ (A) における結果に相当する。平均値 ± 標準偏差を示す。\* $p < 0.05$  v.s. non-stimulation. 文献 14 より改変・転載

変化が認められた。また、それぞれ単一刺激では細胞形態に著変は認められない低濃度の FGF-2 あるいは VEGF-A は、その濃度における共刺激条件下では、血管内皮細胞の著明な管腔様形態変化を誘導した。以上の結果から、FGF-2 と VEGF-A は歯根膜細胞の遊走、血管内皮細胞の管腔形成能を協調的に誘導、促進させることが明らかとなった。

### 歯根膜細胞と内皮細胞の共培養により誘導される血管管腔様形態変化

生体内においては様々な細胞種の細胞間クロストークにより、生体内の複雑なイベントを制御している。すなわち FGF-2 を添加した際の歯周組織再生モデルを *in vitro* にて構築する上で、歯根膜細胞と周辺に存在する細胞との相互作用を考慮することは重要であると思われる。そこで、歯根膜細胞と血管内皮細胞を共培養することにより誘導される、異種細胞間の相互作用について検討を行った。

Matrigel で b.End5 を培養しても著明な形態変化を認めないが、MPDL22 と共培養した場合において、細胞の血管管腔様形態変化を認めた。また、この変化は FGF-2 を添加することにより、さらに増強した。生体内

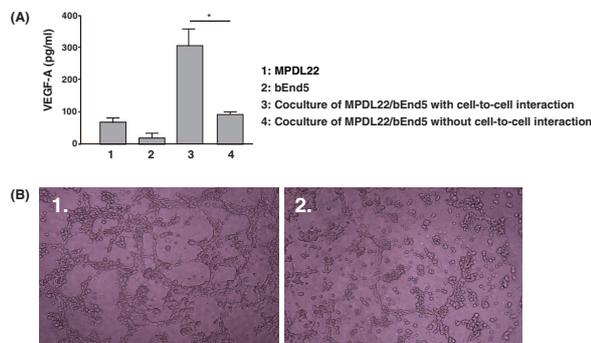


図2 MPDL22 との共刺激が3次元培養時の bEnd5 の形態変化に及ぼす影響

(A) MPDL22 単独, bEnd5 単独, あるいは MPDL22 と bEnd5 を共培養 (細胞接触の有無) して産生される VEGF-A タンパク量を測定した。グラフにおける番号 3 は MPDL22 と bEnd5 を同一 well 内に混ぜて培養したものの、番号 4 は Transwell を用いて上層に MPDL22 を、下層に bEnd5 を播種して他種間で細胞が接触しない条件下において同一培養液中で 48 時間培養したものである。

(B) 番号 1 は MPDL22 と bEnd5 を FGF-2 存在下で培養したものの。番号 2 は番号 1 にさらに抗 VEGF-A 中和抗体を添加したものの。番号 1 で形成された管腔が、番号 2 ではほとんど消失している。文献 14 より改変・転載

の成熟血管で見られるペリサイトと血管内皮細胞との比率は 1:1 から 1:10 と報告されており<sup>15)</sup>、本研究においても予備実験においてこの範囲内の比率である 1:4 にて細胞形態変化が最も顕著に認められたため共培養系実験においては、歯根膜細胞と血管内皮細胞との比率を 1:4 とし、以下の検討を行った。加えて、MPDL22 と b.End5 の共培養時における VEGF-A の発現量を検討した。

MPDL22 と b.End5 を共培養 (細胞間接触あり) した際、MPDL22, b.End5 単独群と比較して VEGF-A の有意な産生上昇が認められた (図 2A)。この結果から、歯根膜細胞・血管内皮細胞を共培養した系において血管管腔様形態変化を認めた一因として、MPDL22 と b.End5 の共培養により、異細胞間の接触・接着によって誘導された VEGF-A の関与が想定された。そこで、MPDL22 と b.End5 の共培養系に抗 VEGF-A 中和抗体を加えたところ、歯根膜細胞と内皮細胞との共培養によって誘導促進される管腔様形態変化は抑制された (図 2B)。以上の結果より、MPDL22, b.End5 の共培養によって誘導・産生される VEGF-A が細胞の形態変化の一端を担っている可能性が示唆された。

### 歯根膜細胞と血管内皮細胞の共培養時における細胞動態および歯根膜細胞のペリサイト様変化に対するについての検討

MPDL22 を緑色, b.End5 を赤色で染め分け、各々の細胞がどのように移動し配列してゆくかを共焦点顕微鏡を用いて検討を行った。興味深いことに、管腔形態を示す血管内皮細胞 (赤色) 周囲にペリサイト様に歯根膜細胞 (緑色) が付着する像を認めた (図 3)。さらに、MPDL22 と b.End5 の共培養により各々の細胞がどのように遊走・接着するのかを観察する目的で、Time-lapse assay を行った。その結果、管腔を形成する血管内皮細胞に近接して歯根膜細胞が遊走、配置される像を得た。

これまでの結果から、歯根膜細胞と血管内皮細胞間の共培養によって誘導される細胞間相互作用として VEGF-A 産生が亢進することと血管内皮細胞の管腔形成能を亢進することに加え、歯根膜細胞が管腔形成をする外傍に管腔を支持するように移動・配置することが明らかとなった。とりわけ、共培養時の歯根膜細胞の配置の様子が、毛細血管に付着するペリサイトと類似することから、歯根膜細胞が周囲微小環境の変化に

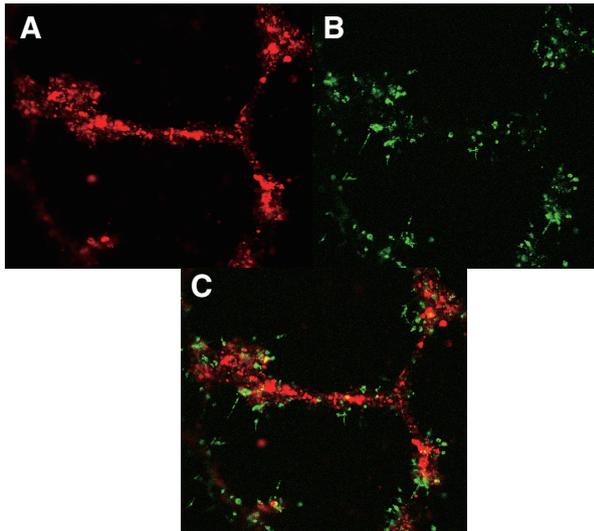


図3 MPDL22とbEnd5の共培養時の細胞動態の検討  
Matrigel内にMPDL22とbEnd5を播種し12時間後の細胞形態変化を観察した。AがbEnd5(マウス血管内皮細胞), BがMPDL22(マウス歯根膜細胞), CはAとBを重ねた像である。文献14より改変・転載

よりペリサイト様性質を有する細胞へと形質を変化させる可能性が考えられた。ペリサイトのみに発現する特徴的な表面分子は存在しないが、ペリサイトに顕著に発現している表面抗原として、Chondroitin sulfate proteoglycan NG2(以下NG2と略す)が挙げられる。

そこで、フローサイトメーターにて、MPDL22上のNG2の発現を確認した。またNG2の発現は、FGF-2とVEGF-Aの共刺激によりMPDL22上で有意に上昇した。以上の結果から、歯根膜細胞にはペリサイトと共通する遺伝子を発現し、周囲微小環境によってペリサイト様性質を有する可能性が示唆された。

### おわりに

本研究において、我々は血管新生という観点から、FGF-2投与を起点とした歯根膜細胞と内皮細胞の細胞間相互作用が、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を見出した。すなわち、FGF-2が直接血管内皮細胞に作用するだけでなく、FGF-2刺激により歯根膜細胞から産生誘導された血管新生因子(VEGF-A)が血管内皮細胞の遊走に関与するとともに歯根膜自身の増殖・遊走にも影響を及ぼすことが明らかとなった。このことはFGF-2誘導性歯周組織再生時、とりわけ血管新生時の細胞動態および歯根膜細胞の機能の一端を示しており、歯周組織再生の

メカニズムの解明に新たな情報をもたらすものと思われる。

### 謝辞

本研究遂行にあたり、多大なるご協力とご助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科口腔治療学教室の教職員各位に厚く御礼申し上げます。

### 文献

- 1) Lynch, S.E., de Catilla, G.R., Williams, R. C., Kiritsy, C.P., Howell, T. H., Reddy, M.S. and Antoniadis, H.N. (1991): The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*, **62**, 458-467
- 2) Sigurdsson, T.J., Lee, M. B., Kubota, K., Turek, T.J., Wozney, J. M. and Wikesjo, U.M. (1995): Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol*, **66**, 131-138
- 3) Murakami, S., Takayama, S., Ikezawa, K., Shimabukuro, Y., Kitamura, M., Nozaki, T., Terashima, A., Asano, T. and Okada, H. (1999): Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*, **34**, 425-430
- 4) Murakami, S., Takayama, S., Kitamura, M., Shimabukuro, Y., Yanagi, K., Ikezawa, K., Saho, T., Nozaki, T. and Okada, H. (2003): Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res*, **38**, 97-103
- 5) Takayama, S., Murakami, S., Shimabukuro, Y., Kitamura, M. and Okada, H. (2001): Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res*, **80**, 2075-2079
- 6) Kitamura M, Nakashima, K., Kowashi, Y., Fuji, T., Shimauchi, H., Sasano, T., Furuichi, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Shibutani, T., Iwayama, T., Takashiba, S., Kurihara, H., Ninomiya, M., Kido, J., Nagata, T., Hamachi, T., Maeda, K., Hara, Y., Izumi, Y., Hirofuji, T., Imai, E., Omae, M., Watanuki, M. and Murakami, S. (2008): Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One*, **2**, e2611
- 7) Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofuji, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M., Kido, J., Nagata, T., Kurihara, H., Takashiba, S., Sibutani, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Yamazaki, K., Yoshie, H., Ioroi, K., Arai, T., Nakagawa, T., Ito, K., Oda, S., Izumi, Y., Ogata, Y., Yamada, S., Shimauchi, H., Kunimats,

- K., Kawanami, M., Fujii, T., Furuichi, Y., Furuuchi, T., Sasano, T., Imai, E., Omae, M., Yamada, S., Watanuki, M. and Murakami, S. (2011): FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res*, **90**, 35-40
- 8) Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G. and Rifkin, D.B. (1997): Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*, **18**, 26-45
- 9) Shimabukuro, Y., Ichikawa, T., Takayama, S., Yamada, S., Takedachi, M., Terakura, M., Hashikawa, T. and Murakami, S. (2005): Fibroblast growth factor-2 regulates the synthesis of hyaluronan by human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*, **203**, 557-563
- 10) Terashima, Y., Shimabukuro, Y., Terashima, H., Ozasa, M., Terakura, M., Ikezawa, K., Hashikawa, T., Takedachi, M., Oohara, H., Yamada, S. and Murakami, S. (2008): Fibroblast growth factor-2 regulates expression of osteopontin in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*, **216**, 640-650
- 11) Murakami S. (2011): Periodontal tissue regeneration by signaling molecule (s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol 2000*, **56**, 188-208
- 12) Ferrara, N., Gerber, H.P. and LeCouter, J. (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, **9**, 669-676
- 13) Grellier, M., Bordenave, L. and Amédée, J. (2009): Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, **27**, 562-571
- 14) Yanagita, M., Kojima, Y., Kubota, M., Mori, K., Yamashita, M., Yamada, S., Kitamura, M., and Murakami, S. (2014): *J Dent Res*, **93**, 89-95
- 15) Shimabukuro, Y., Terashima, H., Takedachi, M., Maeda, K., Nakamura, T., Sawada, K., Kobashi, M., Awata, T., Oohara, H., Kawahara, T., Iwayama, T., Hashikawa, T., Yanagita, M., Yamada, S. and Murakami, S. (2011): Fibroblast growth factor-2 stimulates directed migration of periodontal ligament cells via PI3K/AKT signaling and CD44/hyaluronan interaction. *J Cell Physiol*, **226**, 809-21
- 16) Shepro, D. and Morel, N.M. (1993): Pericyte physiology. *FASEB J*, **7**, 1031-8