

## 〔学位論文〕

## FGF-2及びBMP-2がヒト歯根膜細胞群において組織再生に与える影響

上與那原 朝秀

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

## Effects of FGF-2 and BMP-2 on the tissue regeneration using PDL derived cells

Tomohide UEYONAHARA

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

Key words : ヒト歯根膜細胞群, FGF-2, BMP-2

## 緒 言

近年、塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）や骨形成タンパク（BMP-2）などのサイトカインが歯周組織再生療法において注目されている。FGF-2は、皮膚、血管、骨、軟骨など、さまざまな組織の形成に関与する細胞成長因子の一つであり、その働きは主に、創傷の治癒、血管新生を促すことである。BMP-2は、骨、軟骨の発生と維持に深く関与しており、それ以外にも多彩な機能を有しているタンパク質であるが、その働きは主に異所性の骨誘導能であると報告されている。FGF-2やBMP-2は歯根膜中の細胞増殖と分化を促進し、歯周病により失われた歯周組織を再生することに大きく関与することが報告されている。しかし、ヒト歯根膜細胞群（HPDL細胞群）においてFGF-2及びBMP-2の相互作用についての知見は少ない。そこで、本研究では、FGF-2及びBMP-2がHPDL細胞群において組織再生に、特に血管組織形成や骨様組織形成にどのような影響を及ぼすのか検討することを目的とした。

## 方 法

## 1. 実験動物と飼育

実験動物は4週齢の雄性ヌードマウス（BALB/c Slc-nu体重：約20g）を1週間の検疫期間をおき、実験に使用した。室温平均24℃、明暗12時間周期のもとで固形飼料と水を自由に与えて飼育した。本実験は北海道医療大

学動物実験の承認（承認番号：第014号）を得て行った。

## 2. HPDL細胞群の採取

HPDL細胞群は北海道医療大学歯科内科クリニックを受診した患者において、治療上抜歯が必要と判断し抜去した3本の歯の歯根膜組織からoutgrowth法にて増殖させ、3細胞群を採取し、それぞれHPDL 1, HPDL 2, HPDL 3とした。この実験計画は北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得ている（承認受付番号：18）。

## 3. ヒト凍結乾燥脱灰象牙質の製作

ヒト抜去歯を低温骨粉碎機（NS-101, 岡田鉄工所）を用いて液体窒素冷却下で粉碎し、完全脱灰12時間（2% HNO<sub>3</sub>, pH2.0）、洗浄60分（冷蒸留水）、凍結乾燥を12時間行い、凍結乾燥脱灰象牙質顆粒（Demineralized Dentin Matrix : DDM）を得た。

## 4. 成長因子

成長因子として、リコンビナントヒトBMP-2（R&D Systems）、リコンビナントヒトFGF-2（科研製薬）を使用した。溶媒としてPBSを用い、FGF-2溶液は2 µg/site, BMP-2溶液は5 µg/siteとなるように調整した。

## 5. 埋植体の調整

埋植体には、担体としてDDM（20mg/site）を用い、移植する細胞としてHPDL 1, HPDL 2, HPDL 3のそれぞれを用い、無細胞群も設定した。成長因子の付与には、①無添加群、②FGF-2群、③BMP-2群、④FGF-2+

受付：平成24年10月11日

BMP-2併用群の4条件を設定した。埋植体として、DDMと3つのHPDL細胞群および無細胞群からなる4群に4条件の成長因子を付与することによって、16条件の埋植体を調整した。

#### 6. 埋植体の皮下埋植法

ヌードマウスに全身麻酔を行った後、1匹あたり背部皮下に2カ所ポケットを形成し、1条件あたり4カ所、計32匹64カ所埋植体を埋植した。

#### 7. 薄切切片の作製

埋植4週後に屠殺し、埋植体を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液に24時間浸漬固定した。10%EDTA溶液中で脱灰した後、パラフィン包埋し、厚さ3 $\mu$ mの切片を作製した。

#### 8. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

摘出した組織をISOGEN (Nippon gene) に浸漬、ホモジナイズし、全RNAを添付プロトコールに従い抽出した後、cDNAをcDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) を用いて合成した。PCRはTaq PCR コアキット (Qiagen) を用いて行った。標的遺伝子としてヒトglyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) を用い、forward/reverseプライマーを作製した。PCR反応産物は1.5% (w/v) アガロース (Sigma-Aldrich) に電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、Light Capture (Atto) を用いて観察した。

#### 9. 摘出した埋植体の組織学的観察と血管数・新生骨形成割合の分析

作製した薄切切片にヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin: H-E) 染色を施し、光学顕微鏡で組織学的観察後、1条件あたり無作為に5視野 (倍率100倍) を選び1視野当たりのDDM周囲に存在する血球を含む管腔状構造を血管としその数を計測した。また、同様に1条件あたり無作為に5視野を選び1視野当たりのDDM周囲に存在する新生骨の面積およびDDMの面積をImage J (NIH) にて計測後、新生骨形成割合 (新生骨の面積/DDMの面積) を算出した。

#### 10. 統計解析

計測結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表示し、Steel-Dwass法およびWilcoxonの順位検定を用いて有意水準を0.05にて解析した。

## 結 果

GAPDH mRNAの発現を調べた結果、HPDL 1, HPDL 2, HPDL 3 の成長因子無添加群から摘出した組織の全てから、ヒトGAPDH mRNAの発現がみられた。HPDL

細胞群の有無に関わらずFGF-2群では無添加群、BMP-2群と比較して有意に多くの血管がみられたが新生骨形成はみられなかった。さらにFGF-2群では、無細胞群はHPDL細胞群を含む群よりも有意に多くの血管が観察された。HPDL細胞群を含むBMP-2群では無添加群、FGF-2群およびFGF-2+BMP-2併用群と比較して有意に新生骨形成割合が増加した。さらに、HPDL細胞群を含むBMP-2群では、無細胞BMP-2群と比較して有意に新生骨形成割合が増加していたが、血管数には差を認めなかった。HPDL細胞群を含むFGF-2+BMP-2併用群では、血管数は無添加群やBMP-2群と比較して有意に増加した。またFGF-2群と比較しても同程度の血管数であった。一方、同様の条件において、新生骨形成割合はBMP-2群と比較して有意に減少したものの、HPDL細胞群を含む無添加群と比較すると有意に増加した。HPDL 1, HPDL 2 を含むFGF-2+BMP-2併用群では血管を取り囲むように新生骨の形成がみられた。

## 考 察

RT-PCRの結果、HPDL細胞群を含む成長因子無添加群による埋植体から、ヒトGAPDH mRNAの発現が確認されたが、無細胞無添加群ではGAPDH mRNAの発現が認められなかった。このことより、ヌードマウス背部皮下に移植したHPDL細胞群が生着し組織形成に関与したことが考えられる。

無細胞無添加群とHPDL細胞群を含む無添加群では、ともに新生骨はみられず血管数も同程度であった。このことから、異所性にHPDL細胞群を移植しても血管新生や骨新生を促進しないということが考えられる。

埋植体中のHPDL細胞群の有無に関わらず、FGF-2を含む群ではFGF-2未添加群と比較して有意に多くの血管がみられた。本研究ではFGF-2を含む埋植体の働きによりhost由来、donor由来細胞両方に対して血管の形成を促すことにより血管数の増加に関与したことが考えられる。また、FGF-2群においてHPDL細胞群を含む群と無細胞群を比較すると、無細胞群の方が有意に多く血管がみられた。FGF-2はHPDL細胞群に対して作用するよりもヌードマウス背部皮下の場の細胞に働きかけた方が効果的に血管数は増加することが考えられる。

骨新生においては、無細胞群では各条件間において新生骨形成割合に有意な差はみられなかった。一方、HPDL細胞群を含む4群のうち、BMP-2群は他群と比較して有意に高い新生骨形成割合を示した。また、FGF-2+BMP-2併用群における新生骨形成割合は無添加群と比較して有意に高い値を示したが、BMP-2群より有意

に低い値を示した。BMP-2はHPDL細胞群中に存在する未分化間葉系細胞と骨芽細胞に作用し骨分化を促したが、FGF-2+BMP-2の併用群ではFGF-2が未分化間葉系細胞に作用し、BMP-2の骨芽細胞への分化および骨形成促進作用を抑制したものと考えられる。BMP-2群では、新生骨形成割合は無細胞群よりもHPDL細胞群を含む群で統計学的に有意に高い値を示した。HPDL細胞群中には骨芽細胞や骨芽細胞に分化しうる未分化間葉系細胞など様々な細胞を含むとされており、BMP-2による骨分化促進効果が際立って出現したと考えられる。

本研究によりヒト歯根膜細胞群にFGF-2とBMP-2を併用添加すると、担体のみと比較して血管および骨形成を増加させ、内部に新生血管を含む骨新生が形成されることが示された。また増加した血管および骨形成はヒト歯根膜細胞群に由来する可能性が示唆された。以上のことからHPDL細胞群を含むFGF-2及びBMP-2の併用による移植は組織再生に有用である可能性が示された。



上與那原 朝秀

平成19年 3 月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成24年 3 月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成24年 4 月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系  
歯周歯内治療学分野 任期制助手