

細胞増殖因子がラット歯髄由来線維芽細胞に及ぼす影響：特にPDGF-BBとIGF-Iの作用について(北海道医療大学博士論文の内容および審査の結果要旨(平成8年度))

著者名(日)	蔵口 潤
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	16
号	1
ページ	176-178
発行年	1997-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008252/

細胞によること、破歯細胞に隣接・近接している単核小型間葉系細胞は破歯細胞の誘導・分化・機能活性化に関与している可能性を示唆した。

骨組織の研究に比較し、解明が進んでいないヒト乳歯歯根吸収過程において、本研究は複数の観察方法と組織細胞化学的手法を組み合わせて、幾つかの重要な機序・

機構を示唆または明らかにした。これらの知見は今後、乳歯歯根吸収過程を研究・考察する上で、有益な基礎を築いたものといえる。また、実験方法および結果・考察・解釈も妥当である。

以上のことから、本論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと判定した。

氏名・(本籍)	藏 口 潤 (東京)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第46号
学位授与の日付	平成9年3月21日
学位授与の要旨	学位規則第5条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	細胞増殖因子がラット歯髓由来線維芽細胞に及ぼす影響 —特にPDGF-BBとIGF-Iの作用について—
論文審査委員	主 査 教 授 賀 来 亨 副 査 教 授 市 田 篤 郎 副 査 教 授 武 田 正 子

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

歯髓は象牙質の機能維持を司る組織であり、歯髓の機能維持には細胞増殖因子が重要な役割を果たしていることが示唆されている。PDGF-BBおよびIGF-Iは、間葉系細胞の代表的増殖因子として知られ、*in vitro*において間葉系細胞の増殖および遊走能を刺激することが知られている。また*in vivo*においては間葉系組織の創傷の治癒を促進することが報告されているが、両者の作用の違いについては、不明な点が多い。本研究では、PDGF-BBとIGF-Iの歯髓における作用をより詳細に知ることはそれらを歯髓創傷治癒促進薬として応用する上できわめて重要と考え、PDGF-BBとIGF-Iの歯髓由来線維芽細胞の*in vitro*における作用の違いを明らかにすることを目的に行われた。

材料および方法

1. 歯髓細胞の分離；5週齢ラットの上顎前歯を抜去、歯牙を切断後、歯冠部歯髓（中央部）を無菌的に分離、10%FBS-DMEM (penicillin G 100 μ g/ml, amphotericin B 3 μ g/ml含有)にて培養、outgrowth法により増殖した細胞を継代し、ラット歯髓由来線維芽細胞とした。なお、実験には継代3～5代目の細胞を用いた。

2. 分離歯髓細胞の性状；1) 形態学的観察・分離細胞が形態学的に歯髓細胞としての特性を有しているか否かを調べるため、位相差顕微鏡、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡により形態学的観察を行った。2) 生化学的特性・同様に分離細胞が歯髓細胞の生化学的特性を供えているか否かを調べるため、pNPPを基質とした細胞Alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定した。

3. 細胞増殖に及ぼす影響；PDGF-BBおよびIGF-Iの歯髓由来線維芽細胞における細胞増殖に及ぼす影響を、XTTを用いた細胞増殖assayにより濃度依存性 (0～100ng/ml) に調べた。すなわち、96wellのdishに細胞3000個/wellを播種し、10%FBS含有DMEMにし24時間培養した後、無血清培地 (0.2%BSA-DMEM) に交換、さらに24時間培養した。その後、各々の増殖因子 (PDGF-BB, IGF-I) を0～100ng/ml添加し、24時間培養、XTT assayを行った。

4. 細胞分化に及ぼす影響；PDGF-BBおよびIGF-Iが

歯髄由来線維芽細胞の細胞分化に及ぼす影響についてpNPPを基質とした細胞ALPassayにより濃度依存性に調べた。なお、細胞ALP活性は細胞蛋白量で標準化し算出した。

5. 化学走化性（細胞遊走性）に及ぼす影響；同様に、PDGF-BBおよびIGF-Iが歯髄由来線維芽細胞の化学走化性に及ぼす影響を、ポイデンチャンバーの原理を応用した方法により検索した。すなわち、Biocoat Cell Culture Inserts (Becton Dickinson社製) でメンブレンのpore sizeが80 μ mのものを用いた。チャンバー下室に種々の濃度のPDGF-BBあるいはIGF-Iの入った無血清培地を、上室中に細胞懸濁液を入れ、12時間培養した。その後フィルターを移動し、フィルター反対側の下面に付着した細胞を固定染色後、細胞数を算定した。

6. BMP-1～5ならびにTGF- β 1のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響；PDGF-BBおよびIGF-Iが、歯髄細胞を含めた間葉系細胞の細胞分化調節因子である増殖因子（BMP-1～5ならびにTGF- β 1）のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響を調べるため、RT-PCR法により濃度依存性と時間依存性（15分、60分、12時間、24時間）に検索した。

結 果

1. 本研究でラット歯髄より分離した細胞は形態学的生化学的に従来報告されている歯髄由来線維芽細胞の特性を備えていた。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

歯髄は象牙質の機能維持を司る組織であり、歯髄の機能維持には細胞増殖因子が重要な役割を果たしていることが示唆されている。PDGF-BBおよびIGF-Iは、間葉系細胞の代表的増殖因子として知られ、in vitroにおいて間葉系細胞の増殖および遊走能を刺激することが知られている。またin vivoにおいては間葉系組織の創傷の治癒を促進することが報告されているが、両者の作用の違いについては、不明な点が多い。本研究は、PDGF-BBとIGF-Iの歯髄における作用をより詳細に知ることはそれらを歯髄創傷治癒促進薬として応用する上できわめて重要と考え、PDGF-BBとIGF-Iの歯髄由来線維芽細胞に対するin vitroにおける作用の違いを明らかにすることを目的に行い、以下の結果を得た。1. 本研究でラット歯髄より分離した細胞は、従来報告されている歯髄由来線維芽細胞の生化学的形態学的特性を備えていることが示された。2. ラット歯髄由来線維芽細胞においてPDGF-BBとIGF-Iは、細胞増殖能と化学走化性を有意に刺激した

2. ラット歯髄由来線維芽細胞においてPDGF-BBとIGF-Iは、細胞増殖能と化学走化性を有意に刺激したが、その作用はPDGF-BBの方がより強力であることが示された。

3. PDGF-BBはラット歯髄由来線維芽細胞の細胞分化を濃度依存性に抑制した。IGF-Iにはこのような細胞分化抑制作用を認めなかった。

4. IGF-Iは短時間作用（15～60分）で濃度依存性にBMP-4やTGF- β 1のmRNAの遺伝子発現を上昇させたが、PDGF-BBにはこのような効果は認められなかった。

考 察

ラット歯髄由来線維芽細胞においてPDGF-BBとIGF-Iは、ともに細胞増殖能と化学走化性を有意に刺激したことから、これらは歯髄の創傷治癒過程の初期に特に作用し、その治癒過程を早める可能性が考えられた。またIGF-Iは短時間作用において、濃度依存性にBMP-4とTGF- β 1のmRNAの発現を上昇させたのに対し、PDGF-BBにはこのような効果は認められなかったことから、両者のin vitroにおける作用の違いにはBMP-4やTGF- β 1などの二次的に調節される因子に及ぼす作用の違いが関与している可能性も推察された。

本研究はラット歯髄由来線維芽細胞においてPDGF-BBとIGF-Iの作用の違いを調べた最初の報告であり、PDGF-BBあるいはIGF-Iを歯科臨床に応用する上で、非常に有用であると考えられた。

が、その作用はPDGF-BBの方がより強力であることが示された。3. PDGF-BBとIGF-Iは共に細胞分化促進作用を認めず、特にPDGF-BBでは、細胞分化抑制作用を有していることが示された。4. IGF-Iは、短時間の作用で濃度依存性にBMP-4やTGF- β 1のmRNAの遺伝子発現を上昇させた。これらの結果より、本研究では、PDGF-BBとIGF-Iの細胞増殖や細胞分化、および遊走能に及ぼす作用の違いに、二次的なBMP-4やTGF- β 1の調節作用の有無が関与している可能性が推察された。

BMPsなどの細胞増殖因子の臨床応用が注目されている現在、本研究は、ラット歯髄由来線維芽細胞においてPDGF-BBとIGF-Iの作用の違いを1. 細胞増殖、2. 細胞分化、3. 化学走化性および4. BMP-1～5, TGF- β 1の遺伝子発現に及ぼす影響の4点について検索し、明らかにした最初の報告であり、これらの細胞増殖因子の歯科臨床への応用が有用であることを示唆する研究と考えられる。

よって、審査の結果、本論文は歯科医学の進歩発展に
寄与するところが大きく、学位授与に値すると判定し

氏名・(本籍)	齊藤正人(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第47号
学位授与の日付	平成9年3月21日
学位授与の要旨	学位規則第5条1項該当(課程博士)
学位論文題目	ハムスター舌粘膜上皮におけるギャップ結合蛋白コネクシン発現, 局在についての検討
論文審査委員	主査 教授 賀来 亨 副査 教授 武田 正子 副査 教授 有末 眞

論文内容の要旨

緒言

口腔粘膜表層の重層扁平上皮は、種々の機械的刺激に対応すべく調和のとれた分化、増殖を営んでいるが、その恒常性維持の重要な因子のひとつとしてギャップ結合が注目されている。ギャップ結合の本体は、構成蛋白であるコネクシンが集合することにより形成されるチャンネルで、これを通じ物資の交換、すなわち細胞間コミュニケーションが、生体の恒常性の維持に携わっていると考えられている。コネクシンは現在までラット、マウスで12種類クローニングされており、多くの場合個々の細胞において2種類以上発現していることが明らかにされている。

近年、組織の再生過程や癌化過程においてコネクシンの発現変化、局在変化がみられ、細胞間コミュニケーションが低下、消失することが確認されているが、細胞の増殖、悪性化との詳細な関係は明らかではなく、また口腔粘膜におけるコネクシン検索は未だなされていない。

そこで本研究では、ハムスター舌粘膜重層扁平上皮にて、まず正常状態でのコネクシンの発現、局在を明らかにし、次いで創傷治癒過程および発癌過程での発現、局在変化を免疫組織化学的手法、分子生物学的手法を用い比較検討し、口腔粘膜の分化、増殖および悪性化とギャップ結合の関与を検索することを目的とした。

方法

研究材料として7週齢雄シリアンコールテンハムスターの舌粘膜組織を用いた。創傷治癒過程の検索では、舌下面に幅約2mm、深さ約0.5mmの創傷を与え、治癒過程にある舌組織を摘出した。なお屠殺1時間前にbromodeoxyuridine (BrdU) 1ml/100g wtを腹腔内投与しDNA合成期にある細胞を標識した。発癌過程では0.1%DMBAアセトン溶液を週3回、24週間舌下面に塗布し、生じた腫瘍を摘出した。摘出物はそれぞれ急速凍結し、northern blot analysis, western blot analysisおよび凍結切片を作製し免疫組織化学染色に使用した。また摘出物の一部は4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン切片を作製した後、in situ hybridizationに用いた。蛋白の検索には、抗ラットコネクシン26 (Cx26)、コネクシン32 (Cx32) ポリクロナール抗体および抗ラットコネクシン43 (Cx43) モノクローナル抗体を用い、mRNAの検索には、ラットCx26, Cx32, Cx43 cDNAをdigoxigenin RNA labeling kitにてantisense RNAプローブを作製し使用した。またコントロールにそれぞれのsenseプローブを用いた。

結果

正常重層扁平上皮ではCx26, Cx43の蛋白および