

〔原 著〕

## PDGF-BBとIGF-Iがラット歯髓由来線維芽細胞に 及ぼす影響

藏口 潤, 中出 修, 安彦 善裕, 賀来 亨

北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 賀来 亨教授)

## Effects of PDGF-BB and IGF-I on rat dental pulp fibroblasts

Jun KURAGUCHI, Osamu NAKADE, Yoshihiro ABIKO and Tohru KAKU

Department of Oral Pathology, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Tohru KAKU)

### Abstract

Dental pulp cells are able to differentiate into odontoblasts and to form dentin when stimulated by external irritation. Growth factors such as platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF), and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) as well as bone morphogenetic proteins (BMPs) have been implicated in the regulation of the wound healing of pulp *in vitro*, but the effects of these growth factors on the function of dental pulp fibroblasts *in vitro* still remain to be established.

This study examined the effects of the best characterized growth factors in mesenchymal cells, PDGF-BB and IGF-I on cell proliferation, cell differentiation, chemotactic activity and the gene expression of other growth factors, such as BMP-1~5 and TGF- $\beta$ 1 in rat pulp fibroblasts *in vitro*.

The results are as follows.

1. Both PDGF-BB and IGF-I significantly stimulated cell proliferation and chemotactic activity in rat pulp fibroblasts *in vitro*, and more pronounced effects were observed in PDGF-BB.
2. Mitogenic doses of PDGF-BB inhibited the alkaline phosphatase (ALP) activity, significantly, while mitogenic doses of IGF-I did not have significant effect on ALP.

3. Short term treatment with mitogenic doses of IGF-I increased mRNA levels of BMP-4 and TGF- $\beta$ 1 in a dose-dependent manner, while long term treatment did not result in significant effects on the mRNA levels of BMPs and TGF- $\beta$ 1.
4. There were no significant effects on the gene expression of BMP-1~5 and TGF- $\beta$ 1, when the cells were treated with PDGF-BB.

These results indicate that both PDGF-BB and IGF-I are mitogenic to rat dental pulp fibroblasts, but that they act in different manners to regulate the function of the dental pulp.

**Key words :** Pulp fibroblasts, Platelet-derived growth factor (PDGF), Insulin-like growth factor (IGF), Transforming growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1), Bone morphogenetic proteins (BMPs)

## I 緒 言

歯髄は象牙質の機能維持を司る組織であり<sup>1,2)</sup>, 歯髄由来線維芽細胞は, 歯髄組織より分離培養された線維芽細胞様細胞を指す<sup>3,4)</sup>。歯髄由来線維芽細胞は, in vitroで石灰化能を有し<sup>5)</sup>, 象牙芽細胞への種々の分化段階の間葉系細胞の集合体からなると考えられている<sup>4,6)</sup>。歯髄由来線維芽細胞は歯髄組織のin vitro modelとして象牙質-歯髄に用いられる種々の薬物材料の毒性試験や前臨床応用的検討に用いられ<sup>7)</sup>, その有用性が指摘されている。一方, 歯髄組織はその発生過程, 創傷の治癒過程などにおいて種々の増殖因子が関与することが報告されており<sup>8-13)</sup>, 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。このような中, 近年Transforming Growth Factor(以下TGF) superfamilyに属し, 異所性の骨誘導活性を有するBone Morphogenetic Protein(s) (以下BMP(s)) が, 象牙質や骨などの硬組織の再生促進剤として歯科領域において注目されている<sup>14)</sup>。Platelet derived growth factor-BB(以下PDGF-BB)およびInsulin-like growth factor-I(以下IGF-I)は, 間葉系細胞の代表的増殖因子として知られ<sup>15-20)</sup>, 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<sup>17,18)</sup>。またin vitro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, 両者を同時に用いるとその効果は相乗的に促進されると報告されている<sup>21)</sup>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の歯髄における作用をより詳細に検討することは基礎科学の分野においてのみならず, こ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のin vitroにおける作用の違いを明らかにする目的で行われた。

## II 材料および方法

### 1. 歯髄細胞の分離

動物は歯髄組織の安定供給が可能で取り扱いが比較的容易なラットを用いることとし, 3週齢Sprague-Dawley系ラット(三協ラボサービス)を購入した。一回の細胞分離に要したラットは約5匹であった。購入より2週間飼育後, 5週齢となったところで, エーテル麻酔下にてラット上顎前歯を70%エタノールにて消毒後歯科用ワックスアップスパチュラを改良したものを上顎切歯口蓋側遠心隅角部に挿入し, 上顎切

歯を脱臼後抜去した。抜去した歯牙は上下1/3部、計2カ所で水平的に滅菌ダイヤモンドディスクで切断後、クリーンベンチ内に移し、歯冠部中央1/3部の歯髓のみを滅菌されたリーマーにて取り出し、細胞分離に用いた<sup>4)</sup>。得られた歯髓組織は $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ を含まないDulbecco's phosphate buffered saline [以下PBS(-); 日水製薬]中で、十分に洗浄後、眼科用ハサミにて約 $1\text{mm}^3$ の大きさに細切した。細切した歯髓組織は100mm tissue culture dish (岩城硝子) 内で15%牛胎仔血清 (Flow) 含有Dulbecco's modified Eagle's medium (以下DMEM; GIBCO/BRL) に抗生剤〔ペニシリンG (明治製薬) 100 IU/ml, ゲンタマイシン (Sigma)  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ , ファンギゾン (プリストール-マイヤースクライブ社)  $3\mu\text{M}/\text{ml}$ ]を添加したものをを用い培養、歯髓組織からoutgrowthした細胞を以後の実験に使用した<sup>4)</sup>。培養条件は温度 $37^\circ\text{C}$ 、湿度100%、5% $\text{CO}_2$ -95%空気的环境下で行い、細胞の継代にはPBS(-)にtrypsin (Flow) とEDTA (Flow) を各々0.01%および0.04%含有させたものをを用い、confluentに達した時点で1:4の希釈率で継代培養した。同様にラット背部皮膚より皮膚由来線維芽細胞を分離しコントロールとして用いた。両細胞ともに実験には継代3~5代目の細胞を使用した。

## 2. 分離歯髓細胞の性状

分離細胞が、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、形態学的観察と生化学的検索を行った。

### 1) 形態学的観察

#### (1) 位相差顕微鏡による観察

初代培養から約2週間後。歯髓組織からoutgrowthした初代細胞を位相差顕微鏡により観察した<sup>4)</sup>。

#### (2) 走査型電子顕微鏡による観察

継代3代目の細胞の形態学的観察を走査型電

子顕微鏡により行った。すなわち、細胞を継代24時間後(約50% confluent), mediumをPBS(-)で一回洗浄, 変法Karnovskyの固定液(pH7.4, 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde)で2時間浸漬固定を行った。通法の上昇エタノール系列により脱水後, クリティカルポイントドライヤー(HCP-2, 日立)にて臨界点乾燥を行い, エイコー社製イオンコーターにより厚さ100-200Åの金蒸着を行い, 日立社製走査型電子顕微鏡(S-650)による形態観察を行った<sup>4)</sup>。

### (3) 透過型電子顕微鏡による細胞超微構造の観察

約50%confluentの状態の細胞をラバーポリスマンで集め、遠沈し上清の培養液を捨て、PBS(-)にて細胞を洗浄後、変法Karnovskyの固定液にて12時間固定した。緩衝液で洗浄後、2%オスミウム酸で1時間後固定を施し、2%酢酸ウランでブロック染色を行い、Epon 812により包埋した。LKB超薄切片用ミクロトームにガラスナイフあるいはダイヤモンドナイフを用い、超薄切片を作製した。超薄切片はさらに酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡(日立H-800)により観察撮影した<sup>4)</sup>。

### 2) 生化学的特性

分離細胞が歯髓細胞の特徴の一つである高Alkaline phosphatase活性(以下ALP活性)を有しているか否かを<sup>3-5)</sup>、p-nitrophenyl phosphate(以下pNPP; Sigma)を基質としたassayにより測定した<sup>23)</sup>。すなわち継代2代目のラット歯髓細胞あるいは皮膚線維芽細胞がconfluentに達した時点で96well-dishに細胞数 $5 \times 10^3/\text{well}$ を播種、上記抗生剤血清添加培養液にて24時間培養した後、PBS(-)で一回洗浄、PBS(-)吸引後、各wellに100 $\mu\text{l}$ の0.1%Triton-X(関東化学)を添加後、各well、約1分間pipettingし細胞を可溶化した。細胞ALP活性および

細胞蛋白量の計測には各々40 $\mu$ lづつ用いassayを行った。

細胞蛋白量はWiechelmanら<sup>24)</sup>の方法に準じ計測した。なお、ここで用いた1 Uは室温で1分間に1  $\mu$ MのpNPPを加水分解させる酵素量を指し<sup>23)</sup>、細胞ALP活性は細胞蛋白量で標準化し算出した。

### 3. 細胞増殖に及ぼす影響

PDGF-BB (recombinant Human PDGF-BB; ベクトンディッキンソン社) およびIGF-I (recombinant Human IGF-I; マリンクロット社) が、ラット歯髓由来線維芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響を、濃度依存性に0~100ng/mlの範囲でmitochondrial dehydrogenaseを指標とした細胞増殖assay<sup>25)</sup>により調べた。すなわち96well-dishに細胞数 $3 \times 10^3$ /wellを播種、上記抗生剤血清添加培養液にて24時間培養した後、0.2%BSA含有DMEMに交換、さらに24時間培養した。その後PDGF-BBとIGF-Iをそれぞれ濃度依存性に添加、さらに24時間培養後、mediumを吸引、XTT (Sigma) 溶液を添加した。さらに4時間培養後、吸光度をマイクロプレートリーダー(コロナ)にて492nmで測定した。

### 4. 細胞分化に及ぼす影響

96well-dishに細胞数 $5 \times 10^3$ /wellを播種、上記抗生剤および血清添加培養液にて24時間培養した後、0.2%BSA含有DMEMに交換、さらに24時間培養した。その後PDGF-BBとIGF-Iをそれぞれ濃度依存性に添加、48時間作用させた後、上記の方法で細胞ALP活性を算出した。

### 5. 化学走化性(細胞遊走能)に及ぼす影響

PDGF-BBおよびIGF-Iがラット歯髓由来線維芽細胞の化学走化性に及ぼす影響を、ボイデンチャンバーの原理を応用した化学走化性assayにより検索した<sup>7,8)</sup>。

すなわちベクトンディッキンソン社製Biocoat Cell Culture Insertsでメンブレンのpore sizeが8.0 $\mu$ mのものをを用い、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0.2%BSA含有DMEM、上室中に細胞数 $5 \times 10^5$ /mlの細胞懸濁液を入れ、12時間培養した。70%エタノール溶液に30分間浸し細胞を固定した後、フィルターを移動通過し、フィルターの反対側下面に付着した細胞を0.4%トリパンブルー溶液により染色、光学顕微鏡下200倍率で観察、10視野をランダムに選び細胞数を計測した。

### 6. BMP-1~5ならびにTGF- $\beta$ 1のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響

次に本実験では、PDGF-BBおよびIGF-Iの作用の比較として特に細胞分化に及ぼす影響に違いが出たため、そのメカニズムを明らかにする目的で間葉系細胞の分化に影響を与える増殖因子すなわちBMP-1~5<sup>26-32)</sup>ならびにTGF- $\beta$ 1<sup>27,33,34)</sup>のmRNAの遺伝子発現に与える影響を、濃度依存性および時間依存性にRT-PCR法<sup>35)</sup>により検索した。Total RNAの分離はAcid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform法<sup>36)</sup>により行い、逆転写酵素(Life Technologies Co.)によりcDNAにconvertさせた。BMP-1, 3, 4, 5のprimerはOgoseら<sup>35)</sup>のデザインに従い作製した。TGF- $\beta$ 1のprimerはClone Tech社製のマウスTGF- $\beta$ 1のprimerを用いた。またBMP-2のprimerは、マウスBMP-2のDNA sequenceをもとに、独自に設計し作製した。各々のsequenceおよびPCR product sizeはTable 1に示す。

### 7. 統計処理

対照群と実験群の有意差検定は、Studentのt検定により評価した。なお、危険率が0.05以下の場合を有意差ありとした。

Table 1 PCR primers

Primer	Sequence (5'to 3'onentation)	Product size (dp)
Human BMP-1(3')	TCACAGCTGCACTTGTAGCTGCC	286
Human BMP-1(5')	TTGAGATTGAGCGCCACGACAGC	
Mouse BMP-2(3')	TCTCCCACTGACTTGTGTTC	289
Mouse BMP-2(5')	GTGCGCACGTTCCATCAACT	
Human BMP-3(3')	TCAAATGAGTTCTTTGCCAGGTTATC	330
Human BMP-3(5')	CGCCAGGAGATACCTCAAGGTAGA	
Human BMP-4(3')	GCTGAAGTCCACATAGAGCGAGTG	346
Human BMP-4(5')	ACTGGTCCACCACAATGTGACACG	
Human BMP-5(3')	CCGAGATAACTGTATGCGACGAG	305
Human BMP-5(5')	GGAGACAATCATGTTCACTCCAG	
Rat TGF- $\beta$ 1(3')	CACGATCATGTTGGACAACTGCTCC	298
Rat TGF- $\beta$ 1(5')	CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC	

### III 結 果

#### 1. 形態学的観察

##### 1) 位相差顕微鏡による観察

初代細胞は骨芽細胞類似の多角形あるいは星形を呈し、分化型線維芽細胞様の形態を示していた (Fig. 1)。

##### 2) 走査型電子顕微鏡による観察

同様に継代3代目の細胞も骨芽細胞類似の多角形を呈し、分化型線維芽細胞様の形態を示していた (Fig. 2)。

##### 3) 透過型電子顕微鏡による細胞超微構造の観察

透過型電子顕微鏡による観察で継代3代目の細胞は、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官が比較的良好に発達しており、脂肪滴の出現も散見され、分離細胞は歯髄由来線維芽細胞の超微構造にほぼ一致した形態学的特徴<sup>4)</sup>を供えていることが示された (Fig. 3)。

#### 2. 生化学的特性

継代3代目のラット歯髄細胞は細胞ALP活性において $35.6 \pm 1.2$  (mU/mg protein) であり、ラット皮膚由来線維芽細胞のALP活性



Fig. 1 Phase-contrast microscopic appearance of primary rat pulp fibroblasts showing osteoblast-like polygonal cell-shape.

$25.8 \pm 3.2$  ( $\mu$ U/mg protein) と比較して1,000倍以上の高い値を示した。

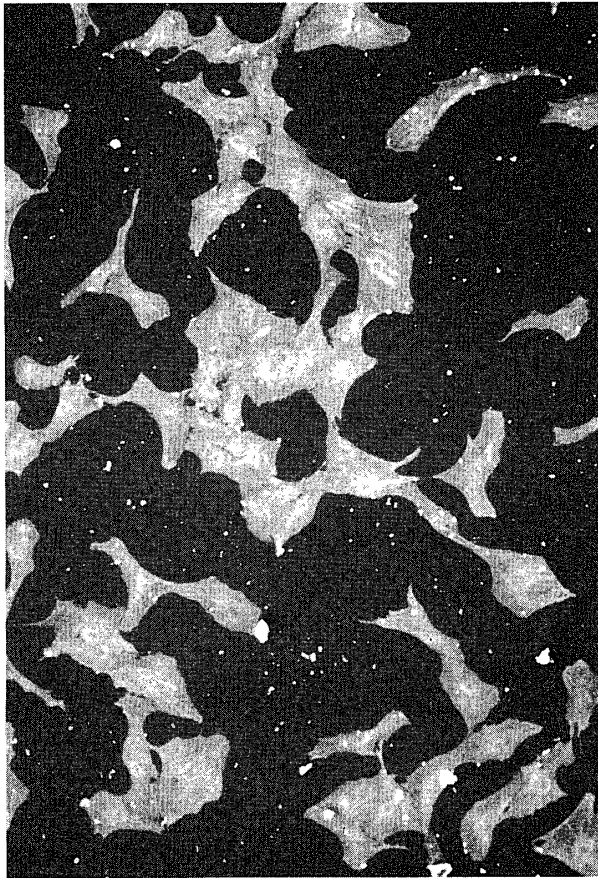


Fig. 2 Scanning electron micrograph of rat pulp fibroblasts from passage 3 also showing polygonal cell-shape

以上の形態学的・生化学的特徴から、分離細胞は、歯髄由来線維芽細胞としての特性を供えていると考えられ、以後の実験に用いることとした。

### 3. 細胞増殖に及ぼす影響

PDGF-BBおよびIGF-Iが、ラット歯髄由来線維芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。

PDGF-BBは、10~100ng/mlで濃度依存性に、再現性をもってラット歯髄由来線維芽細胞の細胞増殖を有意に刺激した (Fig. 4)。最適濃度は50~100ng/mlであり、コントロールとの比で約320%の増殖促進効果を示した。同様にIGF-Iは濃度依存性にラット歯髄由来線維芽細胞の細胞増殖を有意に刺激した (Fig. 4)。最

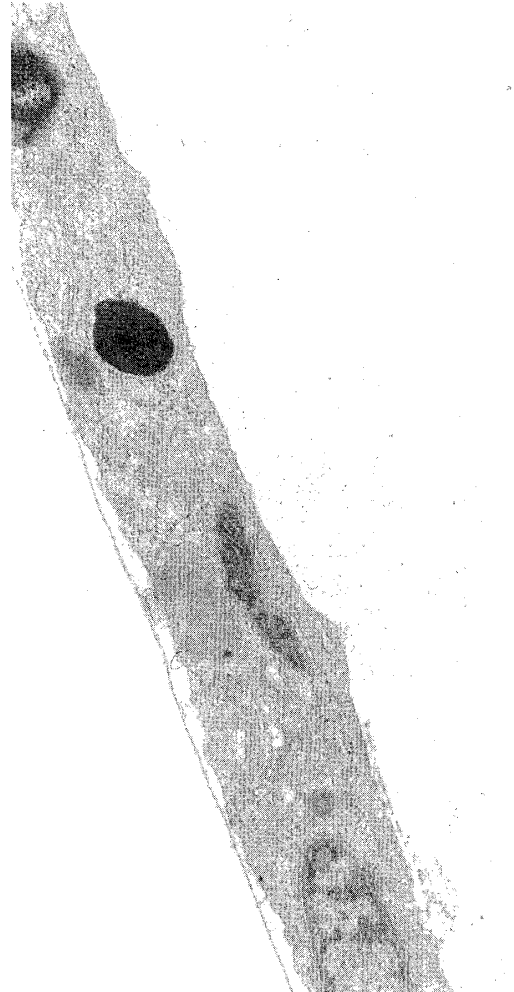


Fig. 3 Transmission electron micrograph of rat pulp cells from passage 3.

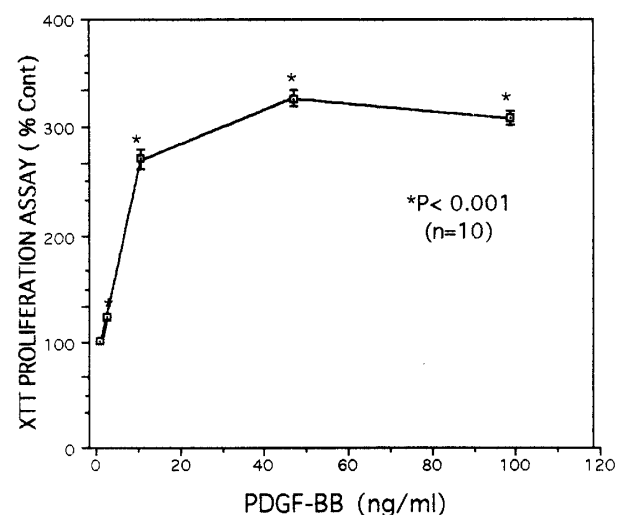


Fig. 4 PDGF-BB stimulates cell proliferation of rat dental pulp fibroblasts *in vitro*

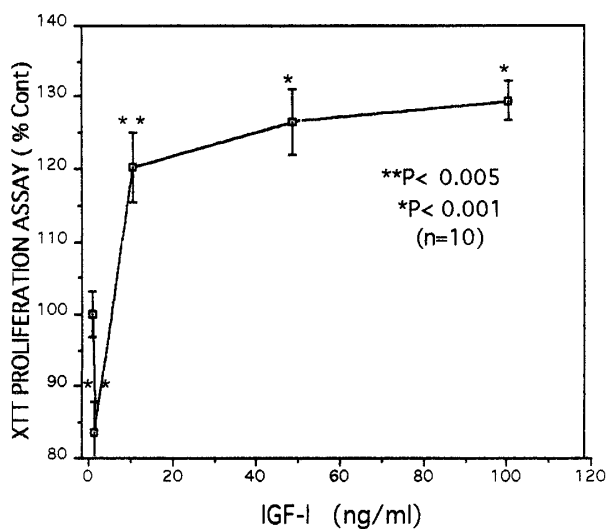


Fig. 5 IGF-I stimulates cell proliferation of rat dental pulp fibroblasts *in vitro*

適濃度は10~100ng/mlであり、コントロールとの比で約130%の増殖促進効果を示した (Fig. 5)。

#### 4. 細胞分化に及ぼす影響

Fig. 6 に示すようにPDGF-BBは、10~100 ng/mlで有意にALP活性を抑制した (約50%コントロール比)。それに対しIGF-Iでは、有意差は認められないものの、わずかにALP活性を上昇させる傾向が認められ (約110%コントロール比)、少なくともALP活性を抑制する効果は認

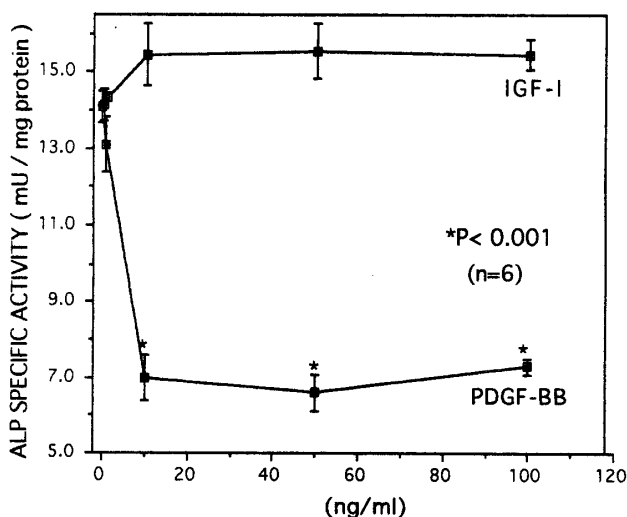


Fig. 6 PDGF-BB but not IGF-I inhibits ALP activity in rat dental pulp fibroblasts *in vitro*

められなかった。これらの結果からPDGF-BBは*in vitro*においてラット歯髓由来線維芽細胞の細胞分化を抑制する作用があることが示された。

#### 5. 化学走化性 (細胞遊走能) に及ぼす影響

PDGF-BBおよびIGF-Iは、各々の細胞増殖および分化に影響を与えない低濃度 (1 ng/ml) から高濃度 (100ng/ml) の広い範囲で濃度依存

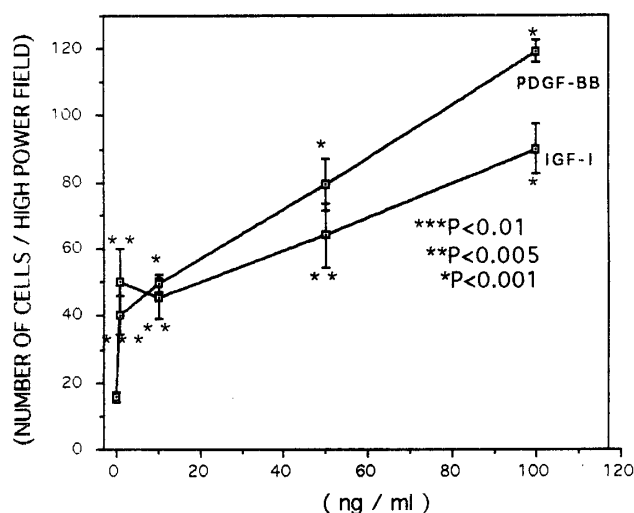


Fig. 7 Chemotactic response of the rat dental pulp fibroblasts toward PDGF-BB or IGF-I

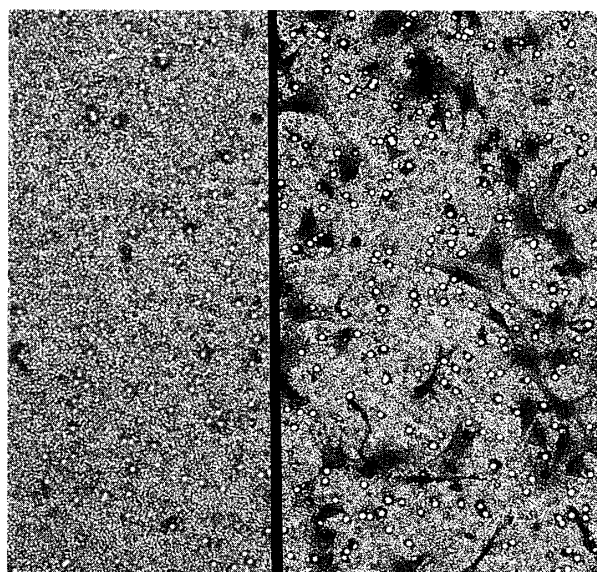


Fig. 8 Migrated rat dental pulp fibroblasts by PDGF-BB

Left panel : PDGF-BB (0ng/ml)  
Right panel : PDGF-BB (100ng/ml)

性に化学走化性を有意に刺激した (Fig. 7) が、刺激の程度はPDGF-BBの方が若干強力である傾向が見られた。Fig. 8にPDGF-BBのコントロール (0 ng/ml) および高濃度で作用 (100ng/ml) させた時のフィルター通過細胞のトレパンブルー染色像を示す。

## 6. BMP-1～5ならびにTGF- $\beta$ 1のmRNAの遺伝子発現

以上の結果から、PDGF-BBおよびIGF-Iの作用の比較として、特に細胞分化に及ぼす影響に違いが出たため、そのメカニズムを明らかにする目的で間葉系細胞の分化に特に影響を与えている増殖因子、すなわちBMP-1～5ならびにTGF- $\beta$ 1のmRNAの遺伝子発現に与える影響を検討した。Table 2はラット歯髄由来線維芽細胞のbasal conditionにおけるBMP-1～5ならびにTGF- $\beta$ 1のmRNAの遺伝子発現を示す。ラット歯髄由来線維芽細胞のbasal conditionにおいて、BMP-1, 2, 4およびTGF- $\beta$ 1でmRNAの遺伝子発現が認められた。しかしながらBMP-3, 5においてmRNAの遺伝子発現は、認められなかった。Fig. 9は短時間作用のIGF-IがBMP-4のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響をみたもので、15-60分において10～100ng/mlのIGF-Iは濃度依存性にBMP-4のmRNAの発現を増加させた。同様に10～100 ng/mlのIGF-IはTGF- $\beta$ 1のmRNAの遺伝子発現を濃度依存性に増加させた (Fig.10)。

しかしながら、これらのIGF-Iの効果は12時

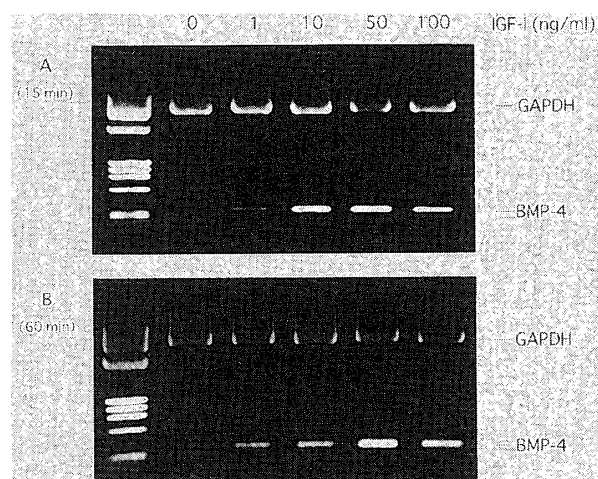


Fig. 9 Short-term treatment with mitogenic concentrations of IGF-I increases levels of BMP-4 mRNA in a dose dependent manner in rat dental pulp fibroblasts *in vitro*. (A : 15 min, B : 60 min)

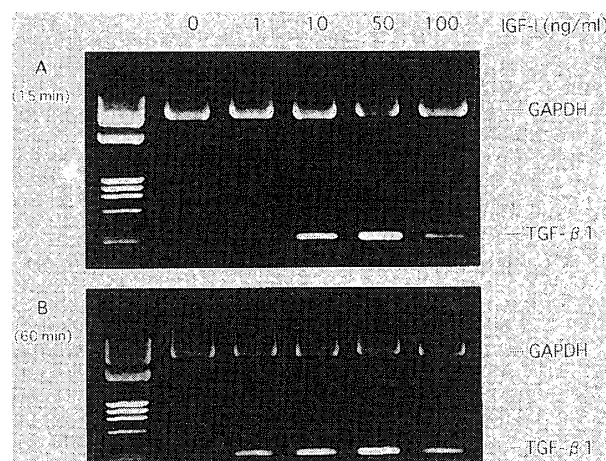


Fig. 10 Short-term treatment with mitogenic concentrations of IGF-I increases levels of TGF $\beta$ -1 mRNA in a dose dependent manner in rat dental pulp fibroblasts *in vitro*. (A : 15 min, B : 60 min)

Table 2 Expression of BMPs and TGF- $\beta$ 1 mRNA in cultured rat pulp cells under the basal condition

Primer	BMP-1	BMP-2	BMP-3	BMP-4	BMP-5	TGF- $\beta$ 1
	+	+	-	+	-	+

Products were detected by 35 cycles of PCR

+ ; expression of mRNA

- ; products were not expression of mRNA



**Table 3** Summary of short term effect of IGF-I on gene expression of BMPs and TGF- $\beta$ 1 mRNA

IGF-I(ng/ml)	0	1	10	50	100	(15 or 60min)
BMP-1	+	+	+	+	+	(15 or 60min)
BMP-2	+	+	+	+	+	(15 or 60min)
BMP-3	-	-	-	-	-	(15 or 60min)
BMP-4	+	++	+++	+++	+++	(15min)
	+	++	++	+++	++	(60min)
BMP-5	-	-	-	-	-	(15 or 60min)
TGF- $\beta$ 1	+	+	++	+++	+	(15min)
	+	++	++	+++	++	(60min)

+ ; products were detected by 35 cycles of PCR

++ ; products were detected by 30 cycles of PCR

+++ ; products were detected by 25 cycles of PCR

**Table 4** Summary of long term effect of IGF-I on gene expression of BMPs and TGF- $\beta$ 1 mRNA

IGF-I(ng/ml)	0	1	10	50	100	(12 or 24h)
BMP-1	+	+	+	+	+	(12 or 24h)
BMP-2	+	+	+	+	+	(12 or 24h)
BMP-3	-	-	-	-	+	(12 or 24h)
BMP-4	+	+	+	+	+	(12 or 24h)
BMP-5	-	-	-	-	-	(12 or 24h)
TGF- $\beta$ 1	+	+	+	+	+	(12 or 24h)

+ ; products were detected by 35 cycles of PCR

++ ; products were detected by 30 cycles of PCR

+++ ; products were detected by 25 cycles of PCR

間および24時間の長時間作用においては認められなかった。またその他の因子に及ぼす影響に関しては短時間、長時間ともに特に効果は認められなかった (Table 3, 4)。

PDGF-BBにおいては、IGF-Iで認められたようなBMP-4ならびにTGF- $\beta$ 1のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響あるいはその他の因子に及ぼす影響は、認められなかった。

#### IV 考 察

##### 1. ラット歯髓由来線維芽細胞の特性について

歯髓組織には、未分化間葉系細胞、線維芽細胞、前象牙芽細胞などの象牙芽細胞への分化能を有する細胞とそれらの終末分化細胞である象牙芽細胞に加え、毛細血管内皮細胞やマクロファージなどが存在する<sup>1,2)</sup>。歯髓組織を培養した場合、生育されてくる細胞の大部分は、象牙

芽細胞へのいろいろな分化段階にいる間葉系細胞がその主構成細胞と考えられており<sup>3-6)</sup>、これらを歯髓由来線維芽細胞と呼んでいる<sup>3-6)</sup>。

歯髓由来線維芽細胞の特性として形態学的にも生化学的にも骨芽細胞と多くの類似点が報告されている<sup>1-4)</sup>。形態学的類似点として、多角形を呈し、微細構造においては粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアなどの細胞小器官に富むことが挙げられてる<sup>4)</sup>。これらは歯髓由来線維芽細胞や骨芽細胞が非常に基質合成および分泌が旺盛であることを示している。本研究で分離されたラット歯髓由来細胞も形態学的にこのような特徴を有する細胞がほとんどであり、上皮様細胞、血管内皮細胞様の形態を示すものは特に観察されなかったことから、形態学的に歯髓由来線維芽細胞の特徴を備えた細胞群であると考えられた。骨芽細胞との生化学的類似点と

して1) 高い細胞ALP活性を有し, しかもそのアイソザイムは骨型であること<sup>3)</sup>, 2) Vitamin D<sub>3</sub>依存性にALP活性が上昇すること<sup>1)</sup>, 3) 副甲状腺ホルモンに反応し細胞内cAMPレベルを上昇させること<sup>1)</sup>, 4) 骨に特徴的蛋白質, すなわちオステオカルシンやbone sialoprotein, オステオネクチンなどを分泌すること<sup>9)</sup>, 5) 合成するcollagenはType Iが主であること<sup>1,4,5)</sup>, 6) in vitroで石灰化能を有する<sup>1-3)</sup>ことなどが挙げられる。現在のところ歯髄由来線維芽細胞と骨芽細胞を鑑別する手段としてはdentin sialoproteinなどの象牙質特有蛋白の発現の有無を調べるのが最も確実な手段と考えられる<sup>2)</sup>が, これは歯髄由来線維芽細胞の分化段階によって発現が左右され<sup>2)</sup>, 決して鑑別の決め手となるものとは言い難い。本研究では象牙質特有蛋白の発現は確認していないが, 組織採取部位が明確に歯髄組織に限定された部位であり, 骨芽細胞や歯根膜細胞の迷入の可能性がないことから, その細胞形態とALP活性から, 分離細胞を従来より報告されている歯髄由来線維芽細胞の性格を有する細胞として実験に使用することとした。

## 2. PDGF-BBおよびIGF-Iがラット歯髄由来線維芽細胞に及ぼす影響について

PDGF-BBとIGF-Iはともに間葉系細胞の代表的な増殖因子としてすでに知られている<sup>15-20)</sup>が, その作用の発揮され方にはかなり違いがある。PDGF-BBとIGF-Iは一般に歯髄細胞を含めた間葉系細胞において合成されているが, IGF-Iは成長ホルモン, 副甲状腺ホルモンやエストロゲンなどの内分泌ホルモンに応答して, 主として肝でのIGF-Iの産生が高まり, 血液循環を通して全身に回り, ホルモンの作用のmediatorとして局所で作用するのに対し<sup>37,38)</sup>, PDGF-BBにはホルモンのmediatorとしての役割は報告されていない。近年, 生活歯髄切断

法において, BMPsが術後のdentin bridgeの形成を促進する作用があることが報告され<sup>14)</sup>, 新しい歯髄創傷治癒促進薬としての可能性が注目されている。PDGF-BBおよびIGF-Iはともに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in vitroにおける作用の違いについては, 未だ不明な点が多い。本研究は, PDGF-BBとIGF-Iの歯髄細胞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。PDGF-BBとIGF-Iは, ともにラット歯髄由来線維芽細胞において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。

これまで種々の間葉系細胞においてPDGF-BBとIGF-Iを同時に作用させるとその増殖促進効果は相乗的に高められるとの報告がある<sup>17,18)</sup>が, 本研究においてはこのような相乗効果は認められなかった(data示さず)。この違いについては定かではないが, 動物種差や細胞の種類の違いが関係しているのかもしれない。細胞分化に及ぼす影響については, Fig. 6に示すようにPDGF-BBが10~100ng/mlで有意にALP活性を抑制したのに対しIGF-Iでは, ALP活性を抑制する効果は認められなかった。この違いはただ単にPDGF-BBのより強力な細胞増殖作用を反映しただけの可能性も考えられるが, PDGF-BBやIGF-Iによって二次的に調節される因子の修飾を受けた可能性も考えられ, 本研究では歯髄細胞の分化調節能の顕著な増殖因子であるBMPs<sup>27,32)</sup>およびTGF- $\beta$  1<sup>32)</sup>の遺伝子発現に及ぼす影響について調べることにした。その結果, 短時間作用(15-60分)の10~100 ng/mlのIGF-IがBMP-4 およびTGF- $\beta$  1の

mRNA の遺伝子発現を濃度依存性に増加させたが、PDGF-BBにはこのような効果が認められないことが示された。BMP-4 およびTGF- $\beta$  1 はともに間葉系細胞の細胞遊走能を促進させ<sup>39)</sup>、細胞増殖を調節する作用<sup>33)</sup>も報告されていることから、本研究ではIGF-Iの歯髄細胞における作用について、Fig.11のような仮説の提唱を試みた。すなわち、歯髄において細胞周囲のIGF-Iの濃度が高まるとそれにより、細胞増殖、細胞遊走能が高められ、細胞分化も多少影響を受けるがそれらの作用は、二次的に高められたBMP-4 やTGF- $\beta$  1 の産生のupregulationの修飾も反映している可能性があるというものであるが、仮説の域を脱するにはさらなる検討が必要と思われる。IGF-I, BMP-4 およびTGF- $\beta$  1 はいずれも歯牙の発生過程でもなんらかの役割を果たしていることが示唆され<sup>8-13)</sup>、本研究の結果を考え合わせれば、これらの増殖因子の相互調節機構が歯牙の発生過程においても重要なシグナルとして組織誘導に関わっている可能性が推察された。また歯髄創傷の治癒促進剤として現在、BMPsなどが実験に用いられているがIGF-Iを用いることにより、BMP-4 の産生も上昇する可能性が示唆され、今後、増殖因子の併用療法の可能性を示唆するものかもしれない。またIGF-Iが骨芽細胞や軟骨細胞など他の間葉系細胞においてBMP-4 お

よびTGF- $\beta$  1 の遺伝子発現に影響を及ぼすか否かは未だ明らかにされていない。この点に関しても今後の興味深い研究課題と思われる。

## V 結 論

1. 本研究において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特性を備えていると考えられた。
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にはラット歯髄由来線維芽細胞の細胞分化抑制作用を有していることが示されたが、IGF-Iにはこのような効果は認められなかった。
4. IGF-Iが短時間の作用で濃度依存性にBMP-4 やTGF- $\beta$  1 のmRNA の遺伝子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。

本研究はラット歯髄由来線維芽細胞を用い、in vitroにおいてPDGF-BBとIGF-Iの作用の違い、特にBMPsやTGF- $\beta$  1 のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響の違いについて調べた最初の報告であり、本研究で得られた成果は増殖因子を歯科臨床において応用する上で、非常に有用であると考えられた。

## 引用文献

1. Lindhe A, and Goldberg M: Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 4: 679-728,1993.
2. Souza RND, and Litz M: Odontoblast gene regulation during development and repair. In "Dentin/Pulp Complex"(Shimono M ed.). Chap. 2. Quintessence, Tokyo, Japan, p. 99-104, 1995.
3. Tojyo Y: A comparison of the alkaline phosphatases of rat dental pulp, bone, kidney, liver and intestine. Archs oral Biol 28: 103-107, 1983.
4. 陳 盛輝: In vitro における歯髄、歯根膜、骨髓細胞の骨形成能に関する研究. 歯科学報 91:

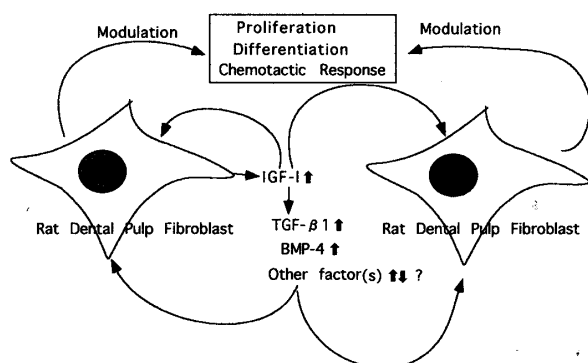


Figure. 11 A proposed model about the effect of IGF-I in normal rat dental pulp fibroblasts.

- 37-63, 1991.
5. Kasugai S., Shibata S., Suzuki S., Sumami T. and Ogura H.: Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Archs oral Biol.* 38 : 769-777, 1993.
6. Yamamura T : Differentiation of pulp cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 64 : 530-540, 1985.
7. Inoue T, Miyakoshi S, and Shimono M : Dentin pulp/adhesive resin interface. Biological view from basic science to clinic. In "Dentin/Pulp Complex "(Shimono M ed.). Chap. 2. Quintessence, Tokyo, Japan, p. 217-220, 1995.
8. Vaahtokari A, Vainio S, and Thesleff I: Associations between TGF- $\beta$ 1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development* 113:985-994, 1991.
9. Beque-Kirn C, Simith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, and Lesot H.: Comparative analysis of TGF- $\beta$ s, BMPs, IGF, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 38:405-420, 1994.
10. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, and Thesleff I.: Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75 : 45-58, 1993.
11. D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, and Butler WT.: Temporal and spatial patterns of transforming growth factor- $\beta$ 1 expression in developing rat molars. *Arch oral Biol* 35:957-965, 1990b.
12. Heikinheimo K : Stage-specific expression of decapentaplegic-Vg-related genes 2, 4 and 6 (bone morphogenetic proteins 2, 4 and 6) during human tooth morphogenesis. *J Dent Res* 73:590-597, 1994.
13. Joseph BK, Savage NW, Young WG, Gupta GS, Breier BH, and Waters MJ.: Expression and regulation of insulin-like growth factor-I in the rat incisor. *Growth Factors* 8 : 267-275, 1993.
14. Nakashima N : The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp to the dog by bone morphogenetic protein. *Archs oral Biol* 35 : 493-497, 1990.
15. Seifer RA, Schwartz SM, and Bowen-Pope DF : Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature* 311 : 699-701.
16. Ross R, Raines EW, and Bowen-Pope DF : The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46 : 155-169, 1986.
17. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho I and Genco RJ : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors *in vitro*. *J Periodontol* 63 : 515-525, 1992.
18. Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, and Ross R : Effects of growth factors *in vivo*. *Am J Pathol* 129 : 601-613.
19. Hughes FJ, Aubin JE and Heersche JN : Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor data. *Bone Miner* 19 : 63-74, 1992.
20. Tsukamoto T, Matsui T, Fukase M and Fujita T : Platelet-derived growth factor B chain homodimer enhances chemotaxis and DNA synthesis in normal osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Biochem Biophys Res Commun* 175 : 745-751, 1991.
21. Lunch SE, Colvin RB, and Antoniades HN : Growth factors in wound healing single and synergistic effects on partial thickness skin wounds. *J Clin Invest* 83 : 640-646, 1989.
22. Lunch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, and Antoniades HN : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regenerations. *J Clin Periodontol* 16 : 545-548, 1989.
23. Farley JR and Jorch UM : Differential effects of phospholipids on skeletal alkaline phosphatase activity in extracts, *in situ*, and circulation. *Arch Biochem Acta* 840 : 56-68, 1983.
24. Wiechelman K, Braun R and Fitzpatrick J : Investigation of bicinchoninic acid protein assay ; identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175 : 231-237, 1988.
25. Roem NW, Rodgers GH, Hatfield SM, and

- Glasebrook AL: An improved colormetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*. 142: 257-265, 1991.
26. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T and Yoshiki S: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 113: 681-687, 1991.
27. Zhou H, Hammonds RGJ, Findlay DM, Martin TJ, and Ng KW: Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. *J Cell Physiol* 155: 112-119, 1993.
28. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS and Kahdan I: Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161: 218-228, 1994.
29. Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, Sanma Y, Bentz H, Rosen DM, Asad A and Suzuki F: Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res* 6: 1373-1385, 1991.
30. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, and Wang EA: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1533, 1988.
31. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, and Greenspan DS: Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 271: 361-362, 1996.
32. Begue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, and Lesot H: Effects of dentin proteins, transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 36: 491-503, 1992.
33. Liang RF, Nishimura S, Hanazawa S, Kitano S, and Satao S: Effects of transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor on clonal rat pulp cells. *Arch oral Biol* 35: 7-11, 1990.
34. Liang RF, Nishimura S, and Sato S: Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\beta$  on insulin-induced differentiation in rat dental pulp cells. *Arch oral Biol* 37: 789-795, 1992.
35. Ogoe A, Motoyama T, Hotta T, and Watanabe H: Expression of bone morphogenetic proteins in human osteogenic and epithelial tumor cells. *Pathol Int* 46: 9-14, 1996.
36. Chomczynski P, and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
37. Hunziker EB, Wanger J, and Zapf J: Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *J Clin Invest* 93: 1078-1086, 1994.
38. Ernst M, and Rodan GA: Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presence of growth hormone (GH), positive correlation with the presence of the GH-induced IGF-binding protein BP-3. *Endocrinology* 127: 807-814, 1990.
39. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, and Reddi AH: Regulatory role of transforming growth factor- $\beta$ , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Development Biol* 162: 18-22, 1994.