

学 位 論 文 題 名

Chemotactic Response of Periodontal Ligament
Cells toward rhBMP-2

（歯根膜細胞の rhBMP-2 に対する走化性について）

学位論文内容の要旨

【目的】

歯周組織のなかでも、歯根膜は、歯根膜細胞（PDL 細胞）、セメント芽細胞や骨芽細胞など種々の細胞成分を有する組織である。歯周組織の再建には、これらの細胞（１）が自ら分泌した細胞外基質（２）の上でサイトカイン等の刺激（３）、脈管系からのミネラルの供給（４）、さらにメカニカルストレス（５）の５つの要素の適切な組み合わせが重要である。歯根膜再生過程の主役は PDL 細胞が担い、この細胞は、未分化な間葉系細胞から分化するものとされている。歯根膜を再建させる過程の第１の段階としては、PDL 細胞の前駆細胞が、サイトカインなどの刺激により再生を必要とする局所に移動して集合し、増殖ならびに分化を開始することであると考えられる。そこで、本研究では、各種の成長因子、特に骨形成タンパク質（BMP）に対する PDL 細胞の走化性について検討し、歯根膜の再建機構を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

PDL 細胞は、矯正治療のため便宜抜歯を必要とする患者に同意を得て、抜去した歯牙より歯根中央 3 分の 1 の歯根膜を採取し、川瀬らの方法に従い培養し、培養 5 継代 5 日目のものを PDL 細胞として用いた。マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様株化細胞である MC-3T3E1（E1）細胞は α -MEM 培地で培養した。各種成長因子に対する細胞の走化性の測定は、ボイデンチャンバー法により測定した。すなわち、ボイデンチャンバーの下室に、各々 200 μ l のヒト組換え BMP-2（rhBMP-2）ならびに線維芽細胞増殖因子（bFGF）をそれぞれ、0.01、0.1、1、10、50、100 ng/ml、1、5、10 μ g/ml の 9 段階の濃度となるように満たした。活性対照としては血小板由来増殖因子（PDGF）-BB を用い、また非活性対照としては α -MEM 培地単独を用いた。ボイデンチャンバーの上室と下室の間は、直径 13 mm、孔径 8 μ m のポリカーボネートフィルターメンブレンを

2枚重ねにしたものを用い、上室に適正に調整された PDL 細胞ならびに E1 細胞の細胞浮遊液 (2.0×10^5 cells/ml) を 200 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂・95% 湿潤下にて4時間培養した。その後、下側のメンブレンのみを採取し3回洗浄、10% 中性ホルマリンにて固定後、ギムザ染色液にて染色を行った。染色後、1枚のメンブレンにつき無作為に10視野 (1mm $\times$ 1mm) 選択し細胞数を光学顕微鏡にてカウントを行い、それらの平均値により、細胞の走化性の評価とした。実験は1回の操作で3チャンバーずつ行い、日を変えて同一の実験を3回繰り返し、分散分析および Donnet 法にて統計処理を行った。

細胞播種後の日数の増加による細胞の状態の変化と走化性について検討するため、以下の実験を行なった。培養5継代目の PDL 細胞ならびに E1 細胞について、播種後3、5、10、15日後のシャーレから分離した細胞を使用して、同様に rhBMP-2、bFGF ならびに PDGF-BB に対する走化性を測定した。また、播種後の細胞の経時的変化を調べるため、播種後3、5、10、15日後の細胞の DNA 量を Bradford 法にて測定し、それらの細胞・基質層中のタンパク量ならびにアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性について、それぞれ Labalca and Paigen 法ならびに Kind and King 法を用いて測定した。

【結果および考察】

PDL細胞はrhBMP-2に対する走化性を有しており、その濃度が5.0 μ g/mlにおいて最大であった。また、bFGFならびにPDGF-BBを用いた場合は、それぞれ10 ng/ml、3 ng/mlの濃度において走化性は最大となるピークであった。E1細胞については、rhBMP-2ならびにbFGFに対して、それぞれ50 ng/ml、1 ng/mlで走化性が認められるようになり、それぞれ100 ng/mlならびに10 ng/mlの濃度においてピークとなり、濃度に対する走化性の程度は、Bell-shapeを呈した。すなわち、PDL細胞が最大の走化性を示すためのrhBMP-2濃度は、bFGFやPDGFの濃度よりも500倍から1,700倍高い濃度が必要であった。

また、PDL細胞はbFGFとPDGF-BBに対して、一方、E1細胞はrhBMP-2に対して、より強い走化性を有していた。本研究から、PDL細胞がBMP-2に対して走化性を持つこと、細胞により最大の走化性を示す成長因子の最適な濃度が異なることが示された。

細胞播種後の経時的変化については、両細胞の経時的DNA量の変化は、どちらの細胞もほぼ同じ傾向で上昇しており、5日目を境にグラフの傾斜がなだらかになっていることと、単位細胞当たりのALP活性量が10日目を境に上昇していることより、10日目以降は、分化の方向に細胞が変化していることが推測された。播種後の日数と走化性については、培養5継代目の播種後3、5及び10日目のPDL細胞を用いると、rhBMP-2、bFGFならびにPDGF-BBに対

する走化性は日数とともに上昇したが、15日目の細胞の走化性は有意に低下するという結果が得られた。一方、E1細胞についてrhBMP-2、bFGFならびにPDGF-BBに対する走化性は、15日目の細胞まで日数とともに増加し続けた。これらの結果は、いずれの細胞においても、その分化度または成熟度の違いによって、rhBMP-2、bFGFならびにPDGF-BBに対する走化性反応が変化することを意味すると考えられた。

BMP-2は、骨原性細胞以外にもさまざまな細胞の分化を促進する活性を有することが知られている。従来多くの研究から、BMP-2が生体での歯根膜の再建に極めて有効であることが示されており、おそらくBMP-2はPDL細胞に対して増殖または分化を促進する能力を持つことが推測されてきた。また、*in vitro*の研究から、rhBMP-2はPDL細胞に対してALP活性やオステオカルシンの発現を促進し、骨芽細胞様の細胞に分化させることが報告されている。本研究から、PDL細胞がBMP-2に対して走化性を有していることが明らかになり、PDL細胞の歯根膜組織における遊走についてもBMP-2が機能していること、ならびにPDL細胞には多能性あるいは多様性があることを示唆すると考えられた。また、成長因子の濃度に対する細胞の走化性の違いから、歯周組織において外部から高濃度のBMP-2を投与すると骨芽細胞よりもPDL細胞が強い走化性を示す可能性が考えられ、用いる成長因子の種類と濃度を使い分けることが、組織の再建にとって重要な意味を持つ可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 畑 昇
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 川 浪 雅 光

学 位 論 文 題 名

Chemotactic Response of Periodontal Ligament Cells toward rhBMP-2

(歯根膜細胞の rhBMP-2 に対する走化性について)

審査は大畑、田村、および川浪審査委員全員が出席のもとに、学位申請者から本論文の概要について説明させた後、各審査委員から口頭試問の形式で行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

歯周組織のなかでも、歯根膜は、歯根膜細胞 (PDL 細胞)、セメント芽細胞や骨芽細胞など種々の細胞成分を有する組織である。歯周組織の再建には、これらの細胞 (1) が自ら分泌した細胞外基質 (2) の上でサイトカイン等の刺激 (3)、脈管系からのミネラルの供給 (4)、さらにメカニカルストレス (5) の5つの要素の適切な組み合わせが重要である。歯根膜再生過程の主役は PDL 細胞が担い、この細胞は、未分化な間葉系細胞から分化するものとされている。歯根膜を再建させる過程の第1の段階としては、PDL 細胞の前駆細胞が、サイトカインなどの刺激により再生を必要とする局所に移動して集合し、増殖ならびに分化を開始することであると考えられる。本研究は、各種の成長因子、特に骨形成タンパク質 (BMP) に対する PDL 細胞の走化性について検討し、歯根膜の再建機構を明らかにすることを目的としたものである。

【材料および方法】

PDL 細胞は、川瀬らの方法に従い矯正治療のため便宜抜歯を必要とする患者に同意を得て、抜去した歯牙より採取し、培養5継代5日目のものを PDL 細胞として用いた。マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様株化細胞である MC-3T3E1 (E1) 細胞も同様に α -MEM 培地で培養した。各種成長因子に対する細胞の走化性の測定は、ポイデンチャンバー法により測定した。すなわち、ポイデンチャンバーの下室に、各々200 μ l のヒト組換え BMP-2 (rhBMP-2) ならびに線維芽細胞増殖因子 (bFGF) をそれぞれ、0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100 ng/ml, 1, 5, 10 μ g/ml の9段階の濃度となるように満たした。ポイデンチャンバーの上室と下室の間は、直径13 mm, 孔径8 μ m のポリカーボネートフィルターメンブレンを2枚重ねにしたものを用い、上室に

適正に調整された PDL 細胞ならびに E1 細胞の細胞浮遊液 (2.0×10^5 cells/ml) を 200 μ l 加え、37℃、5% CO₂ 下にて 4 時間培養した。その後、下側のメンブレンのみを採取し 3 回洗浄、10% 中性ホルマリンにて固定後、ギムザ染色液にて染色を行った後、1 枚のメンブレンにつき無作為に 10 視野 (1mm $\times$ 1mm) 中の細胞数を光学顕微鏡にてカウントを行い、それらの平均値により、細胞の走化性の評価とした。

細胞播種後の日数の増加による細胞の状態の変化と走化性について検討するため、培養 5 継代目の PDL 細胞ならびに E1 細胞について、播種後 3, 5, 10, 15 日後のシャーレから分離した細胞を使用して、同様に rhBMP-2, bFGF ならびに PDGF-BB に対する走化性を測定した。また、播種後の細胞の経時的变化を調べるため、播種後 3, 5, 10, 15 日後の細胞の DNA 量を Bradford 法にて測定し、それらの細胞・基質層中のタンパク量ならびにアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性について、それぞれ Labalca and Paigen 法ならびに Kind and King 法を用いて測定した。

【結果および考察】

1. PDL 細胞は rhBMP-2 に対し走化性を示し、その走化性は bFGF や PDGF-BB に比べ弱いことが明らかとなった。
2. PDL 細胞は、bFGF と PDGF-BB に対し、一方骨芽細胞は、rhBMP-2 に対しより強い走化性を示した。
3. 両細胞ともその分化度または成熟度により走化性反応は変化することがわかった。

BMP-2 は、骨原性細胞以外にもさまざまな細胞の分化を促進する活性を有することが知られている。従来多くの研究から、BMP-2 が生体での歯根膜の再建に極めて有効であることが示されており、おそらく BMP-2 は PDL 細胞に対して増殖または分化を促進する能力を持つことが推測されてきた。また、*in vitro* の研究から、rhBMP-2 は PDL 細胞に対して ALP 活性やオステオカルシンの発現を促進し、骨芽細胞様の細胞に分化させることが報告されている。本研究から、PDL 細胞が BMP-2 に対して走化性を有していることが明らかになり、PDL 細胞の歯根膜組織における遊走についても BMP-2 が機能していること、ならびに PDL 細胞には多能性あるいは多様性があることを示唆すると考えられた。また、成長因子の濃度に対する細胞の走化性の違いから、歯周組織において外部から高濃度の BMP-2 を投与すると骨芽細胞よりも PDL 細胞が強い走化性を示す可能性が考えられ、用いる成長因子の種類と濃度を使い分けることが、組織の再建にとって重要な意味を持つ可能性が考えられた。

各審査委員が行った主な質問事項は以下の通りである。

1. BMP-2 のレセプターとシグナル伝達系について述べよ。
2. 走化性の経時的变化が起こるのは何が原因か？
3. 走化性の経時的变化が PDL 細胞と E1 細胞とでは走化性の傾向が違うのはなぜか？
4. 細胞が遊走するメカニズムについて述べよ。
5. 歯根膜採取時、歯根中央 1/3 のみを採取するのはなぜか？
6. ALP 活性、タンパク量を測ったのはなぜか？
7. 2 種類以上のサイトカインを混ぜて作用させると走化性はどうなるか考えるか？
8. 歯根膜細胞と骨芽細胞の特性について述べよ。
9. 今後、この研究をどう発展させていくのか述べよ。

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答ならびに説明が得られ、更に今後の研究についても明確な方向性をもっていると判定した。

審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。