

学位論文題名

Matrix metalloproteinase 2 suppresses the proliferation of human periodontal ligament fibroblasts

(MMP-2によるヒト歯根膜線維芽細胞増殖の抑制)

学位論文内容の要旨

【目的】

マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinase: MMP) は、細胞外基質タンパクを分解する酵素であり、白血球、線維芽細胞、および上皮細胞など種々の細胞によって産生されることが知られている。このうちの1つであるMMP2は、タイプIコラーゲンや変性タイプIコラーゲンであるゼラチンを分解することによって、組織の恒常性の維持に貢献していると考えられている。

一方、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor : FGF) は、ヘパリン結合性の線維芽細胞成長因子であり、現在までに23種類が報告されている。このうちの1つである塩基性線維芽細胞成長因子 (basic FGF: bFGF) は、骨細胞や歯根膜細胞を含む間葉細胞の分裂・増殖に関与し、その受容体である fibroblast growth factor receptor (FGFR) を有する細胞に作用して分裂・増殖に関与する成長因子であることが明らかとなっている。また、FGFRはチロシンキナーゼ受容体であり、細胞外リガンド結合ドメイン (3種の免疫グロブリン様ドメインを含む)、膜貫通ドメインと細胞内ドメインで構成されており、現在までにFGFR1-4の4種類が報告されている。FGFRを有する代表的な細胞は線維芽細胞であるが、このうち歯根膜線維芽細胞 (periodontal ligament fibroblast: PDLF) はFGFR1とFGFR2を発現することが報告されている。

したがって、歯根膜では、PDLFを含む種々の細胞が産生するMMP2によって細胞外基質の分解が行われ、bFGFとその受容体であるFGFR1およびFGFR2が結合することでPDLFの分裂・増殖が起こり、組織恒常性の維持に貢献すると考えられている。しかし、PDLFがどのようにして細胞分裂・増殖を調節しているかについては不明な点が多い。

ところが近年、MMP2がFGFR1の細胞外ドメインを切断することが明らかにされた。

このことは、MMP2 が bFGF と FGFR1 との結合を阻害することによって PDLF の細胞分裂・増殖の調節に関与している可能性があることを示唆している。そこで本研究では、PDLF において MMP2 による FGFR1 細胞外ドメインの切断は生じているのか、またこの切断によって細胞分裂・増殖の抑制が起こるのかを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

培養細胞には、矯正治療のため便宜抜去された小臼歯の歯根膜組織を培養することによって得られた第 5 継代の PDLF を用いた。

本実験の開始に先立ち、本実験における実験条件を確立するために、予備実験として MTT assay により至適血清濃度と APMA による細胞毒性の影響を、また zymography により MMP2 標品のゼラチン分解活性を検索した。

その結果、MTT assay による検索から、1%の血清存在下で bFGF 処理した PDLF は bFGF 単独処理した PDLF と比較して有意に細胞が増殖することが明らかとなった。また、APMA については、MMP2 を活性化させるために必要な APMA 濃度 (7nM) であれば、ほとんどの細胞株において細胞毒性を示すことはないが、14nM 以上になると次第に細胞毒性の影響を受けることが明らかになるとともに、細胞株によっては 7nM であっても細胞毒性の影響により 24 時間以内に死滅させることがあることも分かった。一方、zymography による検索から、購入した MMP2 標品は活性型がほとんどであり、APMA 処理によっても MMP2 の活性はこれ以上増大しないことが明らかとなった。

以上の予備実験の結果を受けて、本実験での血清濃度はすべて 1%とし、MMP2 標品は APMA 処理を施さずに使用することにし、以下の検討を行った。

- ① MMP2 による FGFR1 切断効率の検索：MMP2 処理した PDLF、および MMP2 未処理の PDLF を培養 1 時間後に回収し、抗 FGFR1 抗体を用いた免疫染色と Cell ELISA により、MMP2 による FGFR1 および FGFR2 の細胞外ドメインの切断を検索した。
- ② MMP2 による細胞分裂・増殖の抑制効果の検索：bFGF 処理後に MMP2 処理した PDLF、ならびに bFGF 処理後に MMP2 処理しない PDLF を培養 5 日後に回収し、抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色および MTT assay により、MMP2 による PDLF の分裂・増殖の抑制効果を検索した。

【結果と考察】

① MMP2によるFGFR1切断について

Cell ELISAによる検索結果から、PDLFはFGFR1およびFGFR2を通常発現するが、FGFR2の発現量は、FGFR1の約20%であること、またPDLFをMMP2で処理するとFGFR1の発現量は有意に減少するものの、FGFR2の発現量には変化がないことが明らかとなった。また、抗FGFR1抗体を用いた免疫染色の結果から、PDLFをMMP2で処理することによって、細胞膜および核内におけるFGFR1の反応が非常に微弱となることも明らかとなった。

これらの結果は、MMP2が存在することによってPDLFが発現するFGFR1の細胞外ドメインが切断されること、ならびにMMP2の存在はFGFR2の細胞外ドメインには影響を与えないことを示している。

② MMP2による細胞分裂・増殖の抑制について

MTT assayによる検索結果、ならびに抗Ki-67抗体を用いた免疫染色の結果から、PDLFはbFGF単独刺激で著明な細胞分裂・増殖を示すが、bFGF単独刺激後にMMP2処理を施すと細胞分裂・増殖が有意に抑制されること、および細胞数も有意に減少することが明らかとなった。

以上の①、②の結果とを考え併せると、PDLFにおいてはbFGFとFGFR1との結合が細胞の分裂・増殖に重要な役割を果たすこと、ならびにMMP2は選択的にFGFR1の細胞外ドメインを切断することによってbFGFとFGFR1との結合を阻害し、PDLFの細胞分裂・増殖を抑制する可能性のあることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎

副 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

Matrix metalloproteinase 2 suppresses the proliferation of human periodontal ligament fibroblasts

(MMP-2によるヒト歯根膜線維芽細胞増殖の抑制)

審査は飯田、進藤審査委員は一同に、また吉田委員は個別に、口頭試問の形式によって行われた。まず論文の概要の説明を求めるとともに適宜解説を求め、次いでその内容および関連分野について試問した。

申請者から、まず以下のような説明がなされた。

【目 的】

矯正力を受けた際の歯根膜組織の維持には、細胞外基質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) が重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。なかでも注目されているのは、線維芽細胞自身によって産生され、線維芽細胞成長因子 (FGF) の1つである塩基性 FGF (bFGF) の受容体 (FGFR1) の細胞外ドメインを切断し、bFGF との結合を阻害することが知られている MMP2 であるが、MMP2 が果たして本当に線維芽細胞の増殖を抑制するか否かについては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、歯根膜線維芽細胞 (PDLF) を用い、MMP2 による細胞増殖抑制効果、FGFR1 の細胞外ドメイン切断効果、ならびに細胞分裂阻止効果を検索した。

【材料と方法】

bFGF と MMP2 処理した PDLF、および bFGF 単独で MMP2 処理しない PDLF を 5 日間培養後に回収し、MTT 法により細胞増殖抑制効果を検索した。また、MMP2 処理した PDLF、および MMP2 処理しない PDLF を 1 時間培養後に回収し、抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色により細胞分裂阻止効果を、免疫染色と cell ELISA により FGFR1 細胞外ドメインの切断効率を検索した。

【結果と考察】

PDLF は bFGF 単独刺激で細胞増殖を示した。しかし、bFGF による PDLF の増殖は

MMP2 処理によって抑制され、細胞膜上に存在する FGFR1 も減少した。また、抗 Ki-67 抗体に反応陽性を示す細胞も減少していた。なお、PDLF における発現量が FGFR1 の約 20% である FGFR2 は、MMP2 処理によっても抑制されることはなかった。以上のことから、PDLF においては bFGF と FGFR1 との結合が細胞増殖に重要な役割を果たすこと、ならびに MMP2 は FGFR1 の細胞外ドメインを切断することにより PDLF の増殖を抑制する可能性が示唆された。

以上の説明の後に以下の試問をした。

1. MMPの種類とそれぞれのMMPを発現する細胞について
2. 歯根膜線維芽細胞が発現するMMPについて
3. bFGFの作用とその受容体について
4. FGFR1, およびFGFR2を切断する物質について
5. APMAの毒性が細胞により異なる原因について
6. 細胞の分裂・増殖をコントロールする機構について
7. 今後の研究の展開
8. その他, 組織学的研究に関する一般的事項

本研究は、歯根膜線維芽細胞の表面に存在し、その増殖に関与する塩基性線維芽細胞成長因子bFGFに対するリセプターのうち、FGFR1およびFGFR2に対して、マトリックスメタロプロテアーゼ2 (MMP2) がどのように作用しているかを明らかにしたものである。すなわち、これまで歯根膜線維芽細胞においては不明であったbFGFの細胞増殖作用に対する制御機構の一端を明らかにしたものである。この成果は歯科矯正学における歯の移動の機構、あるいは保定の際の歯根膜における組織変化を理解する上で重要な意味があるだけでなく、基礎歯科医学あるいは歯周病学における臨床の上からも、歯根膜の恒常性を理解する上で貴重な情報を提供している。歯科医学の発展に寄与するところが大きいものと高く評価できる。加えて、試問の結果から、申請者は本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野における基礎的、臨床的な広い学識を有していると認められた。また研究の将来展望に関しても、本研究を元にして今後ますます発展してゆく可能性が高いと思われる。よって、申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。