

氏名	浅 野 将 宏
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 2012 号
学位授与の日付	平成12年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	結合組織成長因子CTGF／Hcs24の歯根膜線維芽細胞の増殖，分化に与える影響
論文審査委員	教授 山本照子 教授 渡邊達夫 教授 滝川正春

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周組織の再生や修復，リモデリングの過程においては，歯根膜の線維芽細胞がその主要な役割を担っていることが知られており，またこれらの過程に種々の成長因子が関与することが報告されているが未だその詳細は明らかでない。

ところで，結合組織成長因子（CTGF）は，内軟骨性骨形成を全般的に広く促進するのみならず，線維芽細胞の増殖を促進することや，皮膚の創傷治癒過程で高発現すること，線維症で高発現して細胞外基質の産生を促進することなどが報告されている。したがって，CTGFは，歯根膜組織においても重要な役割を担っている可能性が考えられるが，未だ，この点を検討した報告はない。そこで，本研究では，歯根膜線維芽細胞の増殖と分化に与えるCTGFの影響，ならびに，*in vivo*におけるCTGF遺伝子の発現様式について調べた。

【材料および方法】

組換えCTGFタンパク質（rCTGF）は，CTGF cDNAを挿入した真核細胞発現ベクターをHeLa細胞に遺伝子導入して生産し，ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーと，抗CTGF抗体アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。マウス下顎臼歯の歯根膜から単離された歯根膜由来線維芽細胞株（MPL細胞）は，10%牛胎仔血清（FBS）含有 α -MEM培地で培養した。*In situ*ハイブリダイゼーションはジゴキシゲニン標識マウスCTGF断片リボプローブを用いてマウス下顎臼歯部，および，カルチャースライド上で培養したMPL細胞について施行した。ノーザンブロットには， $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 標識したマウスCTGF cDNA全長をプローブとして用いた。MPL細胞の増殖能は $[\text{H}]$ チミジンの取り込み，および細胞数を測定することにより判定した。RT-PCRは，CTGF遺伝子および，歯根膜に特徴的な分化マーカーとされる遺伝子としてアルカリホスファターゼ，オステオポンチン，オステオカルシン，I型コラーゲン，さらにペリオスチンおよび

Cbfa1遺伝子 (Pebp2 α A/Cbfa1とOsf-2) について、それぞれ特異的なプライマーセットを合成し、それぞれの至適条件下で半定量的に行った。アルカリホスファターゼ活性は、MajeskaおよびRodanの方法に準じてパラニトロフェノールを基質として測定し、タンパク質およびコラーゲン合成は、それぞれ $[^3\text{H}]$ プロリンの全タンパク質およびコラーゲン消化性タンパク質への取り込みにより測定した。

【結果】

(1) *In situ*ハイブリダイゼーション法の結果、CTGF遺伝子は、4週齢雄性マウス下顎臼歯部の歯根膜および、その近傍の歯槽骨に発現していた。

(2) マウス下顎臼歯部の歯根膜から単離された細胞株であるMPL細胞において、Cbfa1遺伝子の発現について調べたところ、Pebp2 α A/Cbfa1は発現していたが、Osf-2は発現していなかった。

(3) MPL細胞の対数増殖期およびコンフルエント期におけるCTGF遺伝子の発現をRT-PCR法で比較すると、対数増殖期での発現がコンフルエント期よりも多いことが判明した。

(2) MPL細胞培養系にTGF β を添加し、ノーザンブロット法でCTGF遺伝子の発現の経時的な変化を調べたところ、添加後3時間で著明な誘導がみられた。さらに、この誘導は対数増殖期のみならず、コンフルエント期でも見られた。

(4) rCTGFは濃度依存的にMPL細胞のDNA合成を促進し、50~500ng/mlで最大の促進効果が見られた。また、細胞増殖も濃度依存的に促進され、100ng/mlのrCTGFを添加して培養3日で対照の1.2倍に増加した。

(5) MPL細胞にrCTGFを100ng/mlの濃度となるよう添加して24時間培養後、I型コラーゲン、アルカリホスファターゼ、オステオポンチンおよびオステオカルシンのmRNAの発現量をRT-PCR法で調べると、すべて有意な増加が見られた。また、歯根膜、骨膜に特異的に発現し、歯根膜の分化マーカーと考えられるペリオスチンmRNAの発現も同様に上昇した。

(6) rCTGFを添加して48時間後にはMPL細胞のアルカリホスファターゼ活性は濃度依存的に促進され、10~100ng/mlで最大効果が見られた。

(7) MPL細胞にrCTGFを10~100ng/mlの濃度で添加して24時間後に、コラーゲン合成、および全タンパク質合成を測定すると共に促進効果が見られたが、その効果はコラーゲン合成でより顕著であった。

【考察】

以上の結果は、CTGFは、歯周組織（歯根膜、歯槽骨）が活発な代謝状態にあるときに歯根膜線維芽細胞において発現し、オートクリン・パラクリンのようにその増殖を促進すると共に、歯根膜線維芽細胞に特徴的な分化形質の発現を促進し、また、基質の産生も促進することを示している。したがって、CTGFは、歯周組織の再生や修復において、その過程を積極的に促進する役割を果たすことが示唆される。

論文審査結果の要旨

本研究は、*in vitro*においてマウス歯根膜由来線維芽細胞（MPL細胞）の増殖と分化に対して結合組織成長因子（CTGF）の与える影響を直接的に解明したものである。また、*in vivo*におけるCTGF遺伝子の発現容態についても検討した。

本研究の結果から、CTGFがMPL細胞の増殖を促進すると共に、Ⅰ型コラーゲン、アルカリホスファターゼ（ALPase）、オステオポンチン、オステオカルシン遺伝子等の骨芽細胞に共通する分化マーカーの遺伝子発現、及び歯根膜線維芽細胞に特異的な分化マーカーと考えられるペリオスチン遺伝子の発現を促進することを明らかにした。また、CTGFがタンパク質レベルにおいて、コラーゲン合成とALPase活性を上昇させることも明らかにした。さらに、CTGF遺伝子が、萌出過程にある4週齢マウスの下顎臼歯の歯根膜とその周辺の歯槽骨に発現することを示した。

これらの結果は、CTGFが歯根膜線維芽細胞の増殖および分化を促進する新たなオートクリン・パラクリン因子であることを示すと共に、歯根膜の構築や再生を促進する重要な因子であることを示唆している。本研究で得られた結果は、歯周組織の再生機序の解明や再生・再建にむけての重要な知見になると考えられる。

以上のことから、本論文は博士（歯学）の学位の授与に値するものと判定した。