

氏名	浅 原 洋 士
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 1443 号
学位授与の日付	平成8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	線維芽細胞増殖因子に対する歯根膜線維芽細胞の増殖と遊走に関する研究
論文審査委員	教授 村山洋二 教授 福井一博 教授 滝川正春

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

歯根膜線維芽細胞の増殖や遊走を調節する因子の役割は、歯根膜線維芽細胞の機能を解明する上で重要である。線維芽細胞増殖因子群（fibroblast growth factors : FGFs）は、その増殖や遊走を調節する因子のひとつとして注目されている。しかし、標的細胞に対し増殖因子が一律に作用するのか否か、あるいは増殖因子が及ぼす細胞の増殖と遊走という2つの機能がお互いに独立しているのか否かはわかっていない。そのため、FGFの増殖因子としての作用機序をさらに詳しく解明するには、FGFレセプター（FGFR）を介する細胞機能の発現がレセプターのタイプによって異なる可能性があることを追求することや、細胞の機能状態、例えば細胞周期を考慮して細胞の応答を見る必要がある。

本研究は、歯根膜線維芽細胞の遊走と増殖に及ぼすFGFの作用を明確にするために、FGF存在下での細胞の増殖と遊走を、発現しているFGFRの種類と細胞周期の観点から調べたものである。

【材料ならびに方法】

1. 供試細胞とその培養：線維芽細胞は、同一被験者の抜去歯および辺縁部歯肉から分離・調製した歯根膜線維芽細胞および歯肉線維芽細胞、ならびにヒト正常皮膚線維芽細胞（倉敷紡績株式会社、大阪）を用いた。細胞の培養はウシ胎児血清を10%の割合に含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）を用い、5% CO₂ 存在下、37℃で行った。
2. FGF：FGEはrecombinant human acidic FGF（aFGF）、basic FGF（bFGF）、およびkeratinocyte growth factor（KGF）（R&D systems, Minneapolis, MN, USA）を用いた。
3. DNA合成能：96穴プレートに播種した細胞をsubconfluentになるまで培養して、静止期に揃え、FGFを24時間作用させた後、³H-チミジンの細胞内への取り込み量を示標としてDNA合成を測定した。
4. 走化能：ポイデンチャンバーの変法を用いて測定した。すなわち、コラーゲンでコートしたポリカーボネートメンブレンをチャンバーの間に挟み、上層に対数増殖期にある細胞を、下層にFGFを含むDMEMを加え、5% CO₂ 存在下、37℃で5時間静置した後、

メンブレン下面に遊走した細胞数を示標として走化能を測定した。

5. FGFR 遺伝子の検出 : 細胞が発現する FGFR-1~5 の mRNA を、オリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法によって検出した。

6. 細胞周期の判定 : 細胞がいずれの細胞周期にあるかを以下の方法で調べた。

1) DNA 合成期 (S 期) : プロモデオキシウリジン (BrdU) を取り込ませ、免疫染色法を応用した BrdU Labeling and Detection Kit II (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) を用いて核が濃染した細胞を S 期の細胞とした。

2) 有糸分裂期 (M 期) : アセトカルミンで染色し、分裂像の見られる細胞を M 期の細胞とした。

3) 静止期 (G₀期) : *c-fos* および *c-myc* の mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって検出し、それらが発現していない細胞を G₀期の細胞、発現している細胞を G₀期以外の細胞とした。

【結果】

1. DNA 合成に及ぼす FGF の影響 : 歯根膜線維芽細胞の DNA 合成は、aFGF および bFGF に対して 0.1~10 ng/ml の範囲で濃度依存的に促進された。KGF には影響を受けなかった。

2. FGF に対する歯根膜線維芽細胞の走化性 : 歯根膜線維芽細胞の FGF に対する走化性は、供試したいずれの FGF に対しても 0.1~100 ng/ml の範囲で濃度依存的に増した。

3. 歯根膜線維芽細胞の FGF に対する遊走と FGFR mRNA の発現 : 遊走の有無に関わらず、すべての線維芽細胞に FGFR-1~5 の mRNA が発現した。

4. 歯根膜線維芽細胞の FGF に対する遊走と細胞周期 : FGF に対して遊走していない細胞の中には S 期、M 期および G₀期の細胞があるが、遊走した細胞には S 期、M 期および G₀期の細胞はなかった。ただし、遊走させる時間を 24 時間にすると、遊走した細胞に S 期の細胞がみられた。

なお、結果 1~4 に得た現象は、歯肉線維芽細胞および皮膚線維芽細胞においても見られた。

【考察および結論】

外胚葉系の細胞に特異的に作用すると考えられていた KGF が、細胞の遊走に関しては、中胚葉系の細胞である線維芽細胞にも作用した。レセプターについて調べた結果は、線維芽細胞は KGF に結合親和性をもつ FGFR-2 を含めた 5 種のレセプターの mRNA を発現しているというものであり、KGF が線維芽細胞の遊走のみを促し、増殖には影響を及ぼさないという結果を説明するには、より詳細な検討が必要であると考えられる。また、FGF に対して遊走する歯根膜線維芽細胞は G₁期にある可能性が高く、歯根膜線維芽細胞の遊走と増殖に関しては、細胞自体が両機能をスイッチングしながら独立して営んでいるものと考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は、歯根膜線維芽細胞の遊走と増殖に及ぼすFGFの作用を明確にするために、FGF存在下での歯根膜線維芽細胞の増殖と遊走を、発現しているFGFレセプター（FGFR）の種類と細胞周期との関連において調べたものである。論文には次の知見が記されている。

1. aFGF および bFGF は歯根膜線維芽細胞の DNA 合成と遊走を促進するが、KGF は遊走のみを促進する。
2. FGFに対し遊走しなかった歯根膜線維芽細胞と遊走した歯根膜線維芽細胞のいずれもが、FGFR-1～5 の mRNA を発現する。
3. FGF に対して遊走する歯根膜線維芽細胞は G₁ 期にある可能性が高い。
4. FGFによる歯根膜線維芽細胞の増殖と遊走は、互いに密接に関連しながらもそれぞれの機能が独立して営まれている可能性がある。

上述の知見は、歯根膜線維芽細胞の遊走という基本的機能のメカニズムの解明に細胞周期を関連づけた点で価値のある研究業績であり、歯周組織の治癒の概念あるいは歯の移植や再植などの新しい治療概念の確立に寄与するものである。したがって、本申請論文は、学位論文としてふさわしいものであると認める。