

原 著

ブタ乳切歯歯根膜の分化増殖因子について

松島友二

鶴見大学歯学部歯科保存学第二講座

(受付日：2009年11月10日 受理日：2010年1月18日)

Growth and differentiation factors exist in porcine periodontal ligament tissues

Yuji Matsushima

Department of Periodontics and Endodontics, School of Dental Medicine, Tsurumi University

(Received : November 10, 2009 Accepted : January 18, 2010)

Abstract : Emdogain[®] is a product used for regenerative therapy. The main components of Emdogain[®] are Enamel Matrix Derivatives (EMD). There are two growth and differentiation factors in EMD, TGF- β and BMP-2. Both TGF- β 1 and BMP-2 are growth and differentiation factors found in the normal cementum and dentin. However, there have so far been only a few reports on the soft tissues after maintenance and alimentionation of the adjacent hard tissues such as cementum and dentin. Therefore, this study was conducted to determine the presence of growth and differentiation factors, such as TGF- β and BMP, in the periodontal ligament tissues lying against the pulp of soft tissues and the cementum-dentin of hard tissues.

Periodontal ligament and pulp tissues specimens were harvested from porcine milk central incisors. Thereafter, extracts of the pulp and periodontal ligament specimens were obtained by freeze-drying after extraction with a 4M guanidine hydrochloride solution. In addition, extracts of decalcified cementum-dentin were prepared in a similar manner. The bioactivity in each extract was evaluated using Ros17/2.8 cells and HPDL cells, which show a specific increase of the alkaline phosphatase (ALP) activity in response to TGF- β 1, and C2C12 cells, which show specific increase of the ALP activity in response to BMP-2. In addition, a luciferase assay was used to confirm the presence of TGF- β 1 and BMP-2. ALP activity was observed in the Ros cells and HPDL cells, but not in the C2C12 cells. In addition, the luciferase assay also failed to show the presence of BMP-2.

Interaction between TGF- β 1 and BMP-2 has been reported. TGF- β 1 and BMP-2 were separated by gel filtration chromatography and examined. TGF- β 1 and BMP-2, which were used as positive controls, were detected in the cementum-dentin fractions, but TGF- β -like activity alone was detected in the extracts of the periodontal ligament and pulp of the soft tissues.

連絡先：松島友二

〒230-8501 横浜市鶴見区鶴見 2-1-3

鶴見大学歯学部 歯科保存学第二講座

Yuji Matsushima

Department of Periodontics and Endodontics, School of Dental Medicine, Tsurumi University. 2-1-3 Tsurumi-ku, Yokohama230-8501, Japan

E-mail : Matsushima-yuji@tsurumi-u.ac.jp

Thus, TGF- β 1-like activity was observed in the pulp and periodontal ligaments. However, the BMP-2-like activity was either present in only extremely small quantities or not at all in the soft tissues. The TGF- β -like activity in the periodontal ligament promoted the early stage of differentiation of the undifferentiated cells in the periodontal ligament, and therefore, the BMP-2-like activity may participate in the differentiation of the hard tissue cells.

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 52(1) : 24-36, 2010.

Key words : periodontal ligament, pulp, TGF- β 1, BMP-2

要旨 : 現在、歯周組織の治療法の1つとしてエムドゲイン[®]を用いた再生療法がある。エムドゲイン[®]の主成分はエナメルマトリクスタンパク質(EMD)であり EMD 中の分化増殖因子として TGF- β 1 および BMP-2 の2つの活性物質が存在することが報告されている。一方、歯の硬組織であるセメント質、象牙質中にも分化増殖因子として TGF- β および BMP が存在することが示され、その含有量についても報告されている。しかしこれらの硬組織に隣接し、その維持、栄養供給などに関与する軟組織における分化増殖因子についての報告は少ない。そこで本研究では歯根膜組織中の TGF- β および BMP などの分化増殖因子の存在について調べ、象牙質に隣接する軟組織である歯髄や硬組織のセメント-象牙質と比較検討した。

ブタ乳中切歯より歯根膜および歯髄を採取し、4M 塩酸グアニジン溶液で抽出後凍結乾燥を行い歯根膜および歯髄の抽出物を得た。また同様の方法で脱灰セメント-象牙質の抽出物も調整した。抽出物中の生理活性は、TGF- β 1 に対し特異的に ALP 活性が上昇する Ros17/2.8 細胞、HPDL 細胞および BMP-2 に対し特異的に ALP 活性が上昇する C2C12 細胞を用いて検出した。また TGF- β および BMP の確認にはルシフェラーゼアッセイを用いた。その結果歯根膜と歯髄の抽出物添加時には Ros 細胞、HPDL 細胞にのみ ALP 活性が認められ C2C12 細胞には活性を認めなかった。また、ルシフェラーゼアッセイにおいても BMP を確認することはできなかった。TGF- β 1 には BMP-2 に対する阻害作用が報告されていることからゲル濾過クロマトグラフィーにより TGF- β および BMP を分離しその活性を調べた。ゲル濾過クロマトグラフィーにより得た画分ではポジティブコントロールとして用いたセメント-象牙質では TGF- β 1 様と BMP-2 様の活性が認められたが、軟組織の歯根膜および歯髄の抽出画分では TGF- β 1 様活性のみで BMP-2 様の活性を認めなかった。

以上の結果より、歯根膜および歯髄には TGF- β 1 様活性物質が存在し BMP-2 様活性物質が存在しないか、存在しても極わずかであることが明らかとなった。このことから歯根膜中の TGF- β 1 様活性物質は歯根膜の未分化な細胞に対して初期の分化を促進し、セメント-象牙質中の BMP-2 様活性物質は硬組織細胞への分化誘導に関与している可能性が示唆された。

日本歯周病学会誌(日歯周誌)52(1) : 24-36, 2009

キーワード : 歯根膜, 歯髄, TGF- β 1, BMP-2

緒 言

現在、臨床において応用されている歯周組織再生療法には、Guided tissue regeneration(GTR)法や、エナメルマトリクスタンパク質(EMD)および多血小板血漿(Platelet rich plasma: PRP)を使う方法などがある。

このうち EMD は、ブタ幼若エナメル質から抽出されたタンパク質の複合体で形成され、骨形成¹⁾あるいはセメント質形成^{2,3)}を誘導する生理活性物質を持つことが報告されており、この作用を利用して歯周組織の再生に応用されている。しかし、EMD はブタエナメルタンパクの粗抽出物であるため、どの成分に生理活性があるか明らかにされていない。総説などによる

と単一の生理活性物質による作用ではなく、複数の生理活性物質が相互に作用していると報告されている⁴⁾。

これまでに、EMD 中の分化増殖因子として知られる TGF- β , BMP の2つの活性物質が存在することが報告されている^{5,6)}。当初 EMD 中の分化増殖因子として TGF- β のみが確認されたが、さらにゲル濾過することで TGF- β の活性以外に BMP の活性が分離された⁶⁾。その後の研究で、TGF- β と BMP は相互に作用し合い⁷⁻⁹⁾、TGF- β の存在により BMP の活性が抑制されることが明らかになった^{6, 11)}。

歯周組織における BMP の作用として、BMP ファミリーの主要アイソフォームである BMP-2 は、未分化間葉系細胞に作用し、骨芽細胞やセメント芽細胞に

分化させることが知られている¹²⁾。もう1つの分化増殖因子である TGF- β は、歯根膜細胞や骨芽細胞の増殖を促進し^{13,14)}、上皮細胞に対しては、増殖を抑制すると考えられている¹⁵⁾。実際にラット筋芽細胞 (C2C12 細胞) を EMD 添加培地で培養すると、その作用機序はわからないが、C2C12 細胞が骨芽細胞や軟骨芽細胞に分化する傾向を示すことが報告されている¹⁶⁾。このように硬組織やその周囲に存在する軟組織における生理活性物質の存在や、それらの相互作用を明らかにすることは、歯周組織再生や恒常性の維持のメカニズムを解明する上で極めて重要であると考えられる。

一方、歯の硬組織であるセメント質や象牙質中にも、分化増殖因子である TGF- β 様や BMP 様の活性物質があることが確認されており¹⁷⁾、これらの活性物質を含んでいる正常なセメント質や象牙質を保存することは、歯周組織を再生させるために有利に働く可能性があることが示唆されている¹⁷⁾。生理的条件下における歯根膜や歯髄の細胞は、複数の細胞集団から形成され、様々な分化段階の細胞が共存していると考えられることから、このような細胞に対して TGF- β や BMP の作用や影響について数多くの研究がなされてきた。しかし、歯根膜や歯髄自体にどのような分化増殖因子が発現、存在するかについては十分な研究がなされていない。

そこで本研究では、歯周組織再生に重要な役割を演じると考えられる TGF- β 1 と BMP-2 に注目し、歯根膜組織中におけるこれらの分化増殖因子の存在について明らかにし、セメント、象牙質、およびこれに隣接する歯髄中の分化誘導因子と比較検討することを目的とした。

材料および方法

1. セメント—象牙質、歯根膜および歯髄の分離および分化増殖因子の抽出

生後約6ヶ月の新鮮ブタ下顎骨から抜歯鉗子を用いて乳切歯を抜去した。生理的食塩水で血液成分を洗い流し、セメントエナメルジャンクション (CEJ) より根尖側 1cm 下方の位置から根尖側の歯根膜組織を外科用メスを使ってそぎ落とし分離した。歯髄は、のみで歯を縦方向に分割し、ピンセットを用いて採取した。歯根膜および歯髄はハサミで細切し、重量を測定した。歯根膜と歯髄は、20本の歯からそれぞれ湿重量で 0.86g, 1.03g 得た。これらの試料は、1g に対して 10ml の生理的食塩水を加え攪拌抽出を行い、1500g で5分間の遠心分離後、沈殿物に生理的食塩水を加え、

さらに抽出を行った。遠心分離後の上清は、透析チューブ (Seamless Cellulose Tubing MWCO 3500 : 三光純薬株式会社, 東京 日本) を用いて蒸留水中で透析した。蒸留水の交換は5回行い、内容物を凍結乾燥し、歯根膜および歯髄の生理食塩水抽出物とした。生理食塩水による抽出後、歯根膜および歯髄の沈殿には、4M 塩酸グアニジン溶液 (0.05M Tris-HCl 緩衝液: pH7.4) ^{6,18)} をそれぞれ 1g に対して 10ml 加え、4°C で 24 時間攪拌抽出した。抽出後 1500g で 5 分間遠心分離を行い、上清の透析を生理食塩水の時と同様に行った。その後、凍結乾燥し歯根膜および歯髄の 4M 塩酸グアニジン抽出物として実験に用いた (図 1)。生理食塩水による抽出物には活性が微量だったので以後の実験には用いなかった。

セメント質および象牙質は、乳切歯を抜去後、歯に付着した軟組織を除去し、CEJ より 1cm 根尖側の位置にて切断し、エナメル質と分離した。分離した歯根から歯髄と象牙前質を除去し、そのまま液体窒素を用いて粉碎し、100mg に対して 0.1mol/l 塩酸を 2ml 加えて 1 週間、脱灰を行った。脱灰後、4M 塩酸グアニジン溶液を 2ml/100mg の比率で加え、攪拌しながら 4°C で 24 時間抽出を行った。抽出液は、透析チューブを用いて 100 倍量の蒸留水中で 5 回交換しながら透析し、凍結乾燥して、セメント—象牙質の混合物からの抽出物を得た。

ブタ乳切歯の採取は、鶴見大学歯学部動物実験委員会の承認のもとに行った。

2. ゲル濾過クロマトグラフィー

抽出物の分離精製を目的として、4M 塩酸グアニジン溶液 (pH7.4) で平衡化してある Sephadex G-100 カラム (直径 1.5cm × 長さ 34cm) によるゲル濾過クロマトグラフィーを行い、0.15ml/min の流量で溶出し、15分毎に分画した。分子量マーカーとして同じカラムに Blue Dextran (分子量: 2MDa)、シトクロム c (分子量: 12kDa)、p-ニトロフェノール (分子量: 139) を流し溶出位置を確認した。タンパク質の溶出状態は、Ultraspec 1100 Pro (Amersham Biosciences, NJ, USA) を用い、波長 280nm で吸光度を測定した。各分画は、蒸留水に透析して脱塩し、凍結乾燥を行い、ゲル濾過分離後の分画画分として、マイナス 30°C で保存した。

3. 細胞培養

分化増殖因子を検出するために、C2C12 細胞 (マウス筋芽細胞) と Ros17/2.8 (ラット骨肉腫細胞)、HPDL 細胞 (ヒト歯根膜細胞)、HSC-4 細胞 (ヒト舌癌由来扁平上皮細胞株) を使用した。C2C12 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC ;

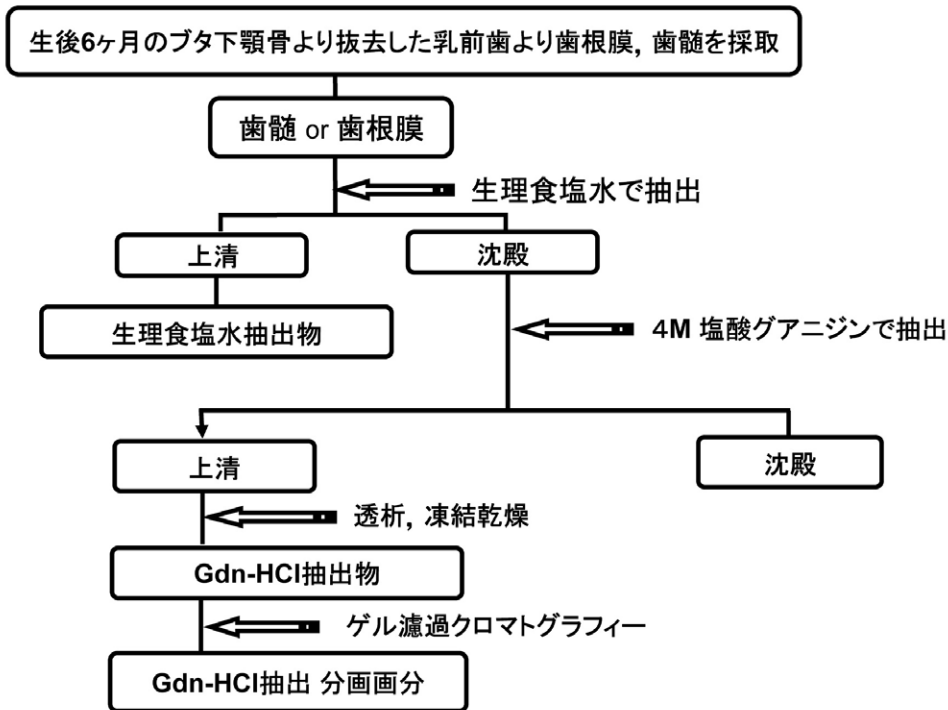


図1 歯根膜および歯髄からの抽出

生後約6ヶ月のブタ下顎骨から乳切歯を抜去し歯根膜および歯髄を採取した。歯根膜、歯髄は生理食塩水で抽出し遠心分離後の上清を透析、凍結乾燥して歯根膜および歯髄の生理食塩水抽出物とした。生理食塩水による抽出後、歯根膜および歯髄の沈殿には4M 塩酸グアニジン溶液を加えて抽出を行い、遠心分離後の上清を透析、凍結乾燥し歯根膜および歯髄の4M 塩酸グアニジン抽出物とした。生理食塩水抽出物中の分化増殖因子(TGF-β1, BMP-2)は少量だったため歯根膜および歯髄の4M 塩酸グアニジン抽出物を用いて実験をおこなった。また4M 塩酸グアニジン抽出物はゲル濾過クロマトグラフィーで分離し、各種細胞への作用を検討した。

Manassas, USA) から購入した。Ros17/2.8は理化学研究所 Cell Bank, HSC-4細胞は東京医科歯科大学百瀬先生から細胞提供を受けた。HSC-4細胞以外の細胞は、10%牛胎児血清(FBS; Asahi Technologies, Chiba, Japan)および1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Pn-St; 50U/mlペニシリンG, 500μg/mlストレプトマイシン; GIBCO-BRL Life Technology, Gland Island, USA)含有α-Modification of Eagle' Medium (α-MEM; GIBCO-BRL)を用いて37°C, 5%CO₂の条件下で培養した。継代培養にはトリプシン-EDTA(0.05%トリプシン, 0.53mM EDTA; GIBCO-BRL)を用い、継代数6以下、1×10⁵個/mlの細胞数で実験に使用した。

HPDL細胞の場合は、鶴見大学歯学部倫理委員会の規定に基づき、鶴見大学歯学部付属病院を受診し、研究への付与に同意の得られた健全な歯周組織を有する矯正患者の抜去歯の歯根膜をSömermanら^{19,20)}の方法に従い処理して得た細胞を用いた。

またHSC-4細胞の培養には、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; nacalai tesque, Kyoto, Japan)を用いて同条件で培養した。

4. アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定

歯根膜、歯髄の生理活性は、培養細胞におけるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を指標として調べた。C2C12細胞, Ros細胞, とともに96wellプレートに1×10⁴ cell/wellの細胞数で播種した。その後24時間α-MEMにて37度, 5%CO₂の条件下で培養した。C2C12細胞は1μMレチノイン酸含有の培養液に交換し、抽出物およびリコンビナントTGF-β1(R & D社, MN, USA), BMP-2(Osteogenetics GmbH, Wuertburg, Germany)をそれぞれ細胞に添加して比較した。C2C12細胞, Ros細胞ともに試料添加24時間後にPBSで洗浄し, 10mMパラニトロフェニルリン酸, 5mmol/l MgCl₂, 100mmol/l 2-アミノ 2-メチル 1.3プロパンジオール塩酸緩衝液(PH10.0)からなる発色液を加えて, 37度5%CO₂の条件下で10分間

反応させた。0.2mol/l NaOHを加え反応の停止後、マイクロプレートリーダー Model 450 (Bio-Rad Model 450, CA, USA) を用いて吸光波長405nmで吸光度を測定した。ゲル濾過クロマトグラフィーを行って分離した分画画分の生理活性には HPDL 細胞を用い、試料添加時に 10nM 活性型ビタミン D3 含有 α -MEM に変換し、C2C12 細胞 Ros 細胞と同様の条件で ALP 活性を測定した。

TGF- β の阻害剤である SB431542 (TOCRIS, MO, USA)²¹⁻²³⁾ と BMP-2 の阻害剤である Noggin (recombinant mouse noggin / FC chimera, Genzyme-Techne, MN, USA)²⁴⁻²⁶⁾ を用いて、TGF- β 様、BMP-2 様活性の抑制実験を行った。細胞培養の条件は ALP 活性の測定と同様とした。C2C12 細胞、Ros 細胞ともに 96well プレートに播種した 24 時間後に、1.3 μ g/ml Noggin または、1 μ M SB431542 を含む培養液に交換し、1 時間反応させた。その後抽出物およびリコンビナント TGF- β 1 と BMP-2 をそれぞれ添加し、試料添加 24 時間後に、ALP 活性を測定した。抽出物の場合は 100 μ g/ml、TGF- β 1 は、0.25ng/ml から 2ng/ml、BMP-2 は、31.25ng/ml から 250ng/ml までの範囲で実験をおこなった。

5. ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

歯根膜および歯髄中の TGF- β 1 および BMP-2 の存在を確認するために、それらの細胞内シグナル伝達系を検出するルシフェラーゼアッセイを C2C12 細胞を用いて行った。C2C12 細胞は、TGF- β 1、BMP-2 にそれぞれ反応する PAI-1 および Id-1 プロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を結合したベクター (pGL-3, p3PT) を導入したものをを用いた²⁷⁾。また、ハイグロマイシン耐性遺伝子を同時に組み込み、ハイグロマイシン B (Hygromycin B; 1240 units/mg WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, Osaka, Japan) を選択マーカーとしてセレクションをかけ、安定株を得た。

細胞培養は、ALP 活性の測定と同条件とし、C2C12 細胞を 1×10^4 cell/well の濃度で 96well プレートに播種し 24 時間後、抽出物およびリコンビナント TGF- β 1、リコンビナント BMP-2 を添加した。試料の添加 24 時間後、PBS で洗浄し、その後 PLB (Passive Lysis Buffer: 細胞溶解液; Promega, WI, USA) で細胞を溶解させた。凍結融解を数回繰り返すことで細胞を完全に融解させ、その細胞融解液に Luciferase Assay Buffer (Luciferase Assay Substrate Promega, WI, USA) を加えて MiniLumit LB 9506 (Berthold Technologies, Pforzheim, Germany) で発光強度 (RLU) を測定した。

6. 酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA 法)

HSC-4 細胞は TGF- β 1 の添加によりフィブロネクチンを産生することが知られていることから、TGF- β 1 の存在を調べるために HSC-4 細胞に各抽出物を添加培養しフィブロネクチンの誘導を ELISA 法で観察した²⁸⁾。HSC-4 細胞を 1×10^4 cell/well の濃度で 96well プレートに播種し 24 時間後、1 μ M SB431542 を含む培溶液に交換し 1 時間作用させた。その後、抽出物を 25 μ g/ml から 100 μ g/ml の濃度で、リコンビナント TGF- β 1 は、予備実験で最も反応の良かった 2 ng/ml の濃度で添加した。試料添加 72 時間後、上清を 100 μ l 採取し、ELISA 用プレートに移して 24 時間後に PBS で 2 回洗浄し、ヒト血清フィブロネクチンを精製しウサギに作らせた抗ヒトフィブロネクチンラビット抗体を添加した。24 時間経過後 PBS で 2 回洗浄しペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc, MA, USA) を添加し、さらに 24 時間後、基質として o-フェニレンジアミン (和光純薬工業, 大阪, 日本) を含む発色液を作用させて吸光度を測定した (495nm)。

7. 統計分析

統計分析には、統計ソフト SPSS ver.14J (SPSS inc, IL, USA) を用い、Student-t 検定を行った。また、有意差検定には p 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

結 果

1. TGF- β 1 および BMP-2 による各種細胞の ALP 活性の変化

リコンビナント TGF- β 1、BMP-2 に対する Ros 細胞、HPDL 細胞と C2C12 細胞の ALP 活性をそれぞれ調べると、Ros 細胞、HPDL 細胞は TGF- β 1 の刺激で濃度依存的に強い ALP 活性を示し、その阻害剤である SB431542 の添加で ALP 活性は抑制された。Ros 細胞、PDL 細胞¹⁷⁾は BMP-2 による刺激では変化はなかった。また C2C12 細胞は、レチノイン酸の存在下での BMP-2 の刺激でやはり濃度依存的に強い ALP 活性を示し、その阻害剤である Noggin によって ALP 活性は抑制された。C2C12 細胞¹⁷⁾は TGF- β 1 による刺激では変化はなかった。(図 2)

2. 粗抽出物による各種細胞の ALP 活性の変化

採取した歯根膜と歯髄の湿重量 1g からそれぞれ 29mg、15mg の 4M 塩酸グアニジン抽出物を得た。また 10g のセメント-象牙質から 110mg の抽出物を得た。これらの抽出物に対して、上記の細胞特性を利用して歯根膜、歯髄の生理活性を調べた。すなわち Ros

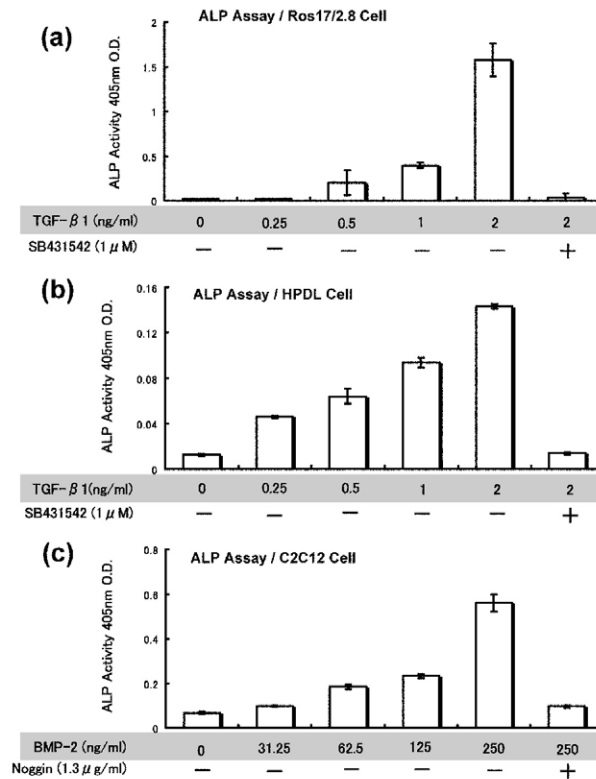


図2 Ros17/2.8細胞(ラット骨肉腫細胞), HPDL細胞(ヒト歯根膜細胞)およびC2C12細胞(マウス筋芽細胞)のTGF-β1およびBMP-2に対する特性
 TGF-β1(0.25, 0.5, 1, 2)ng/ml, BMP-2(31.25, 62.5, 125, 250)ng/mlとそれぞれの阻害剤であるSB431542(1μM)とNoggin(1.3μg/ml)を添加した時のRos17/2.8細胞(a), HPDL細胞(b)およびC2C12細胞(c)のALP活性を示す。Ros17/2.8細胞, HPDL細胞はTGF-β1でALP活性が上昇しC2C12細胞はBMP-2でALP活性が上昇する。

細胞はTGF-β1, C2C12細胞はBMP-2の検出に用いた。Ros細胞に歯根膜および歯髄の粗抽出物を添加するとALP活性は上昇し, TGF-βの阻害剤であるSB431542の添加でこの反応は抑制された。C2C12細胞の場合は, 歯根膜および歯髄の抽出物中にはTGF-β様の活性は認められたが, BMP様の活性は認められなかった(図3)。

3. ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによるTGF-β, BMP活性の検出

TGF-βとBMPの存在を別の方法で確認するためにTGF-β1, BMP-2のシグナル伝達経路に各々反応するPAI-1, Id-1プロモーター領域の転写活性が, 歯根膜および歯髄の抽出物の添加でどのように変化するか調べた。レポーター遺伝子を導入したC2C12細胞は, TGF-β1, BMP-2の添加でルシフェラーゼ活性のベースが高いが, 濃度依存的にPAI-1調節領域, Id-1調節領域の転写活性をそれぞれ上昇させた。また, 歯根膜

および歯髄の抽出物の影響により, 濃度に依存してPAI-1調節領域の転写活性の上昇が認められ, 統計的に差が認められた。しかしながら, Id-1調節領域の転写活性は, どちらの抽出物でも認められなかった(図4)。以上の結果からもTGF-βの活性は確認されたが, BMPの活性は認められなかった。

4. 歯根膜および歯髄抽出物によるフィブロネクチン産生への効果

TGF-βの確認に関しては, さらにTGF-β1の添加でフィブロネクチンの誘導を起こすHSC-4細胞を培養し, 歯根膜および歯髄の抽出物を添加することにより, フィブロネクチンの誘導が引き起こされるかをELISA法で観察した。またSB431542を用いて, 阻害実験を併せておこなった。コントロールでのフィブロネクチンの発現量が高いが, TGF-β1の添加により, 濃度依存的にフィブロネクチンの誘導がみられ, SB431542の添加でフィブロネクチンの誘導は抑制さ

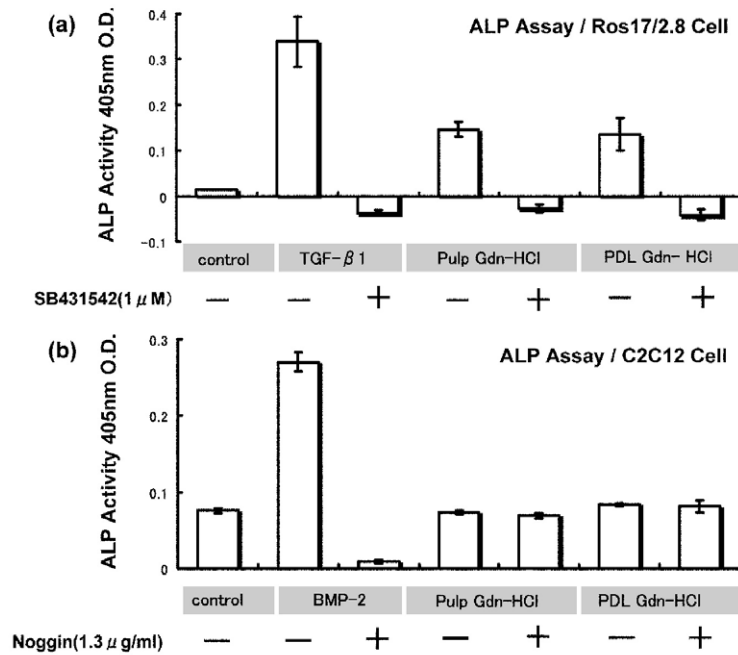


図3 Ros17/2.8 と C2C12 細胞の ALP 活性に対して歯根膜および歯髄の抽出物が与える影響
Ros17/2.8 細胞(a)と C2C12 細胞(b)培養系に以下の濃度の歯根膜および歯髄の抽出物および TGF-β1 と BMP-2 の阻害剤を添加した。TGF-β1(2ng/ml), SB431542(1μM), BMP-2(100ng/ml) Noggin(1.3μg/ml), Pulp Gdn-HCl:歯髄抽出物(100μg/ml), PDL Gdn-HCl:歯根膜抽出物(100μg/ml) 歯根膜および歯髄の抽出物の添加で Ros17/2.8 細胞では ALP 活性が上昇する。C2C12 細胞では ALP 活性の上昇は認められない。

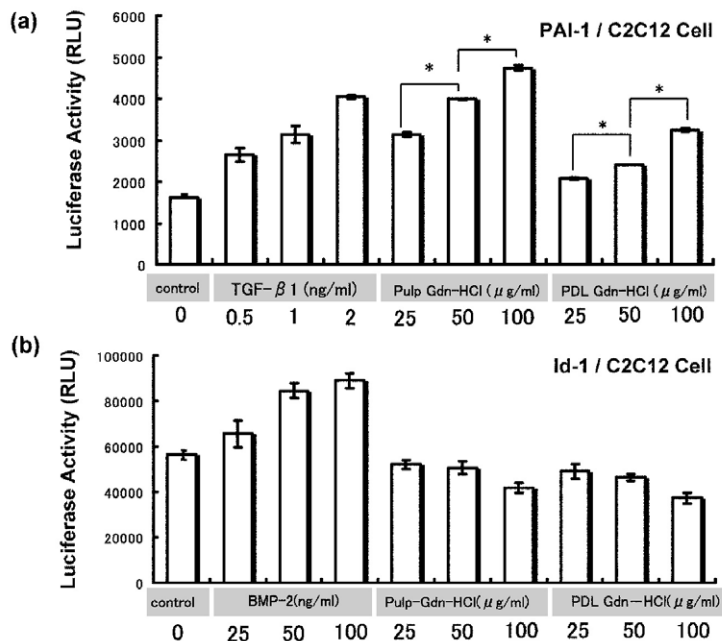


図4 ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

ルシフェラーゼ遺伝子をベクターで導入した C2C12 細胞に歯根膜、歯髄の抽出物および TGF-β1, BMP-2 を添加した時の転写活性を示す。TGF-β1 と BMP-2 でのルシフェラーゼ活性の発光の度合いを比較すると 20 倍異なっていた。歯根膜および歯髄の抽出物の添加時において、TGF-βに反応する PAI-1 調節領域の転写活性は濃度に依存して上昇したが、BMP に反応する Id-1 調節領域の転写活性の上昇は認められない。平均値 ± 標準誤差 (n = 3)。* : P < 0.05

れた。歯根膜および歯髓の抽出物の添加時には抽出物の濃度に依存してフィブロネクチンが誘導され、SB431542の添加でフィブロネクチンの誘導は抑制された(図5)。この方法でも歯根膜および歯髓中にはTGF- β が検出された。

5. ゲル濾過クロマトグラフィーによる抽出物の分離精製

歯根膜および歯髓にBMP様活性が検出されないのは、TGF- β によるBMPの阻害による可能性もあると考え^{6,11)}、TGF- β とBMPを分離することを目的にゲル濾過クロマトグラフィー(Sephadex G100カラム)を行い、その溶出位置を確かめた。すでにTGF- β 、BMPを含むことが知られているセメント-象牙質からの抽出物も同じゲル濾過クロマトグラフィーで分離し、結果を比較した。分離後の精製物をタンパク質を検出する280nmの波長で吸光度を測定した結果、歯根膜、歯髓、セメント-象牙質混合の抽出物からは、いずれも1つのピークが認められた(図6-A-1, A-2, A-3)。ゲル濾過クロマトグラフィー後の各分画面分による電気泳動像からは、タンパク質の分布を示す特徴的な結果は得られなかった。

ゲル濾過クロマトグラフィーで分離された歯根膜、歯髓、セメント-象牙質混合物の抽出物中のTGF- β 様活性の検出にはHPDL細胞を、BMP様活性はC2C12細胞を用いて行った。セメント-象牙質混合物の抽出物添加時には、TGF- β 様の活性が、fr.18付近に溶出

し、BMP-2様の活性はfr.12付近に認められた。また溶出位置は、TGF- β とBMPの分子量を反映していた。歯根膜および歯髓の抽出物の分画面分を調べた場合TGF- β 1様の活性については、歯根膜でもfr.18付近、歯髓でも、fr.18付近で高い活性が認められたが(図6-B-2a, B-3a)、BMP-2様の活性はどこにも検出することはできなかった(図6-B-2b, B-3b)。

考 察

歯の硬組織である象牙質、セメント質には、分化増殖因子であるTGF- β 1、BMP-2が存在することが報告されている¹⁷⁾。強力な骨誘導能をもった分化増殖因子であることが知られているBMP-2は²⁹⁾、硬組織に存在することはよく知られている。しかしながら、これらの硬組織に隣接する軟組織である歯根膜や歯髓において、これらの分化増殖因子が存在するかについては明らかにされていない。生理的条件下における歯根膜の細胞は未分化間葉系細胞を含み様々な分化段階の細胞から形成されることから、これらの細胞に影響を与えるTGF- β 、BMPなどの分化増殖因子の存在を調べることは歯周組織再生において重要であると考えられる。そこで本研究では歯根膜中のTGF- β 、BMPの有無について調べ、軟組織の歯髓や硬組織であるセメント-象牙質と比較検討した。

TGF- β 、BMPの検出において、これらの分化増殖

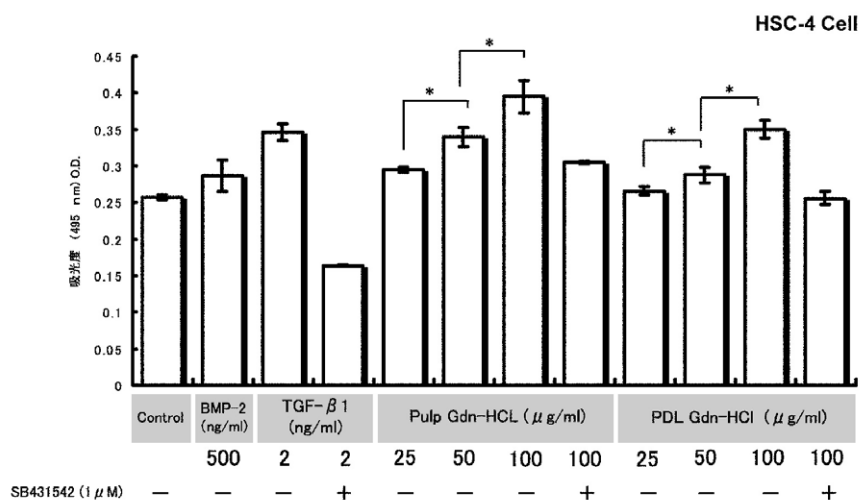
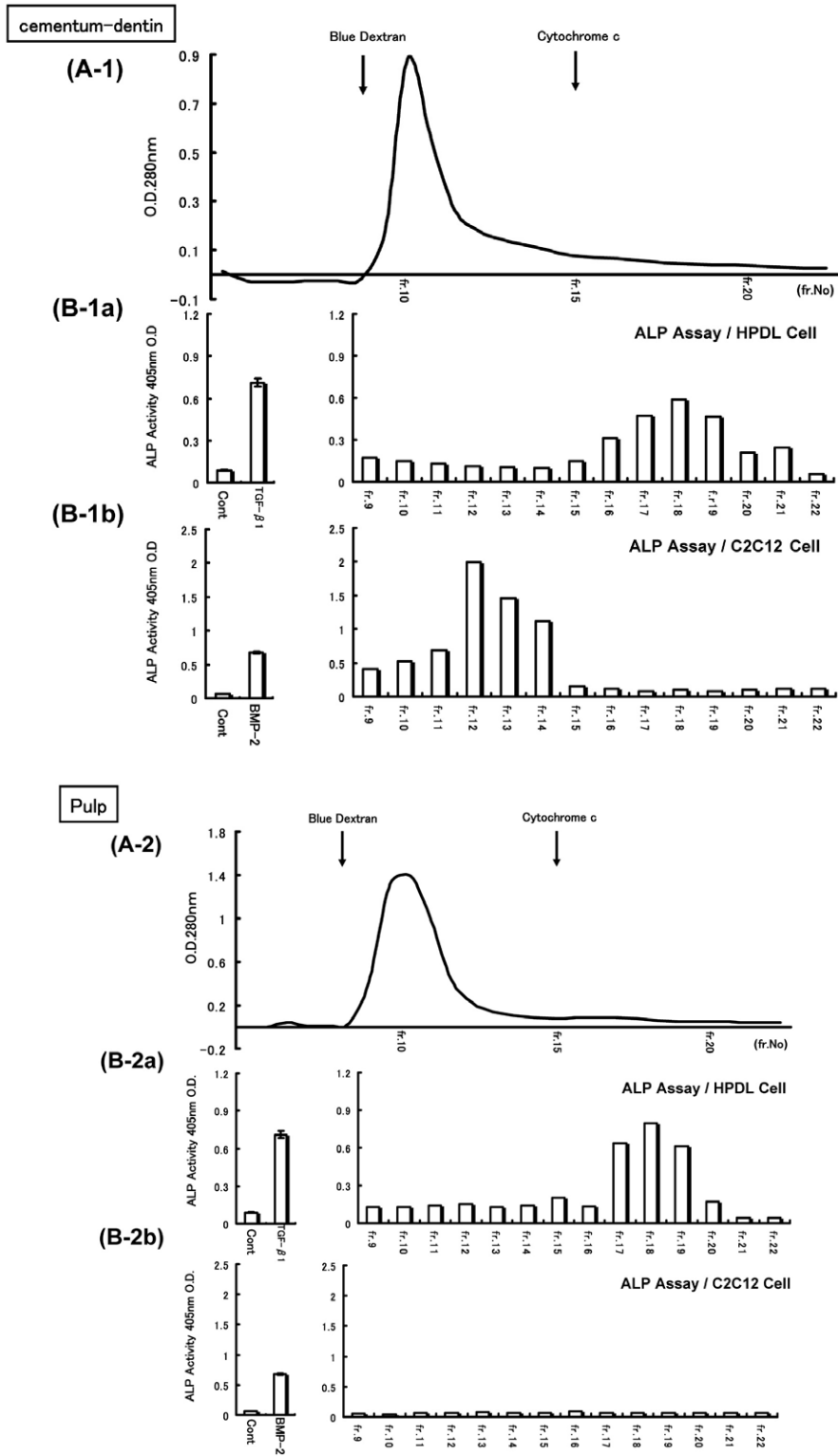


図5 歯根膜、歯髓が誘導するフィブロネクチンの測定

TGF- β でフィブロネクチンが誘導されるHSC-4細胞に歯根膜および歯髓の抽出物を添加し、抗フィブロネクチンラビット抗体で検出した。TGF- β 1を添加したものをコントロールとした。歯根膜および歯髓抽出物の添加とともにフィブロネクチンが誘導され、この誘導はTGF- β 1の阻害剤であるSB431542(1 μ M)で阻害された。平均値 \pm 標準誤差(n=3)。* : P < 0.05



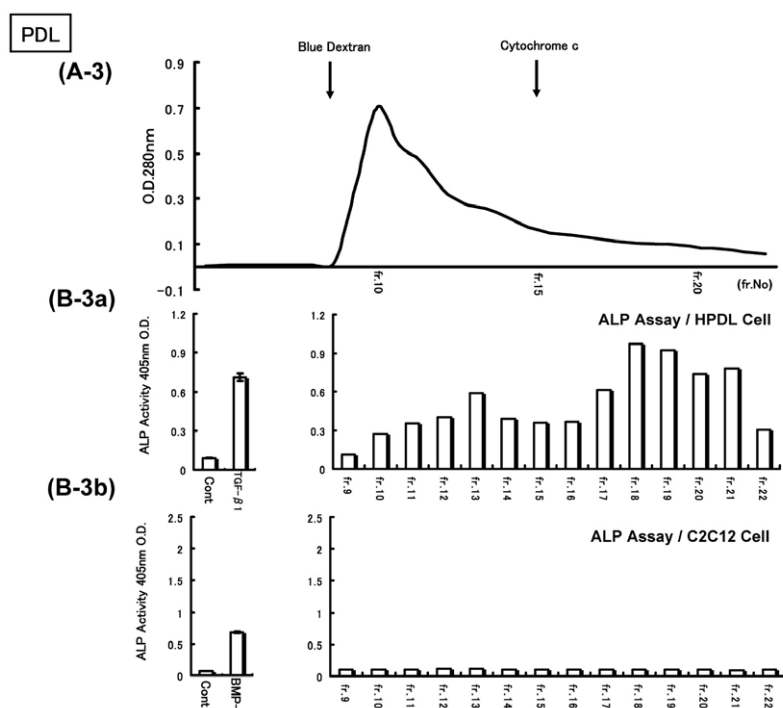


図6 セメント-象牙質(A-1), 歯髄(A-2), 歯根膜(A-3)の抽出物のゲル濾過クロマトグラフィー
各試料を流速0.15ml/min sephadex-G100 ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した。4M 塩酸グアニジン溶液で平衡化したカラムは流速0.15ml/ml で溶出し、15分毎に分画した。分子量マーカーとして同じカラムにBlue Dextran (分子量:2MDa), シトクロム c(分子量:12kDa), p-ニトロフェノール (分子量:139)を流し溶出位置を確認した。p-ニトロフェノールは fr.34 に溶出した。

HPDL 細胞を用いた TGF-β様活性の検出

セメント-象牙質(B-1a)歯髄(B-2a), 歯根膜(B-3a)の分画画分を HPDL 細胞に添加し ALP 活性を測定した。いずれの抽出画分も fr.18 で最も ALP 活性が上昇し TGF-βの存在が確認された。

C2C12 細胞を用いた BMP 様活性の検出

セメント-象牙質(B-1b)歯髄(B-2b), 歯根膜(B-3b)の分画画分を C2C12 細胞に添加し ALP 活性を測定した。C2C12 細胞では、セメント-象牙質の分画画分でのみ BMP の存在を示す ALP 活性の上昇が認められた。平均値 ±標準誤差は、全てにおいて0.06 以上にはならなかった。(n = 3)

因子は抗体による検出が困難であることから TGF-β1 および BMP-2 にそれぞれ特異的な反応を示す細胞を用いて活性を検出することによりその存在を検索した。すなわち TGF-β1 の刺激で ALP 活性が顕著に上昇する Ros 細胞と HPDL 細胞, および BMP-2 の刺激で ALP 活性が上昇する C2C12 細胞を用いることで歯根膜と歯髄抽出物中に含まれる TGF-β1 様と BMP-2 様活性の検出を行った。Ros 細胞を用いた場合, 歯根膜および歯髄の抽出物添加時に ALP 活性の上昇を認め, TGF-β1 の特異的阻害剤である SB431542 を添加することで ALP 活性が抑制されたことから, 歯根膜および歯髄組織中には TGF-β1 様の分化増殖因子が存在すると考えられる。また C2C12 細胞を用いた場合には, どの抽出物を添加しても ALP 活性の上昇を

認めなかった。さらに, 歯根膜および歯髄中の TGF-β1 および BMP-2 の存在を細胞内シグナル伝達系で検出するルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを用いて検討した。歯根膜と歯髄の抽出物は濃度に依存して TGF-β1 に反応する PAI-1 調節領域の転写活性が上昇したが, BMP-2 に反応を示す Id-1 の転写活性はほとんど上昇がみられなかった。Id-1 の転写活性がみられなかった理由には, 量的に少ないといった理由の他に, TGF-βと BMP が混在した状態では, TGF-β1 が, BMP-2 特異的 Smad である Smad1, 5 のリン酸化を阻害するので, I-Smad(Smad6, 7)によるネガティブフィードバック作用により BMP-2 の作用を抑制する⁷⁻¹⁰⁾ ことから, TGF-β1 が BMP-2 の活性を抑制している可能性も考えられる⁶⁾。

BMP-2がTGF- β 1により抑制されている可能性について検討するためにゲル濾過クロマトグラフィーを用いてTGF- β 1およびBMP-2を分離した。ゲル濾過クロマトグラフィーで得られた分画面分のTGF- β 1様またはBMP-2様の活性を、それぞれHPDL細胞とC2C12細胞を用いて検出した。セメント-象牙質混合物の抽出物分画面分添加時に認められたBMP-2様の活性は、TGF- β 様の活性より明らかに高分子領域に溶出した。アミノ酸シーケンスのデータからBMPの2量体としての分子量は23kDa、TGF- β は25kDaと予想される。溶出位置のデータは、BMPの分子量がTGF- β の分子量より大きいことを示しているが、BMPには糖鎖がついていることが知られているので³⁰⁾BMPの溶出位置に関してはそれで説明ができる。しかしながらTGF- β 様活性が、分子量マーカーとして用いたシトクロムc(12kDa)より低分子領域に認められたことは、TGF- β の実際の分子量とは矛盾する。これは担体として用いたSephadex G-100とTGF- β に親和性があり溶出位置が遅れていると推測される。セメント-象牙質には、TGF- β 、BMPの両方の活性が存在している¹⁷⁾ことが知られていることから、ゲル濾過クロマトグラフィーで分離された2種類の活性物質はそれぞれTGF- β 、BMPに対応していると考えられる。歯根膜および歯髄の抽出物の分画面分をHPDL細胞で調べた結果、TGF- β 1様の活性は歯根膜および歯髄ともfr.18付近で高い活性が認められた。BMP-2様の活性は歯根膜および歯髄の全ての分画面分で検出することはできなかった。これらの結果からBMP様の活性がルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイおよびALPアッセイで認められなかった理由は、TGF- β の抑制による影響により活性が示されなかったという理由ではなく、BMP様の活性が存在しないことによると考えられる。以上のことから歯根膜および歯髄にはTGF- β 1様活性物質は存在するが、BMP-2様の分化増殖因子は存在しないか、あるいは極めてわずかであることが示唆された。

TGF- β 1について、その存在とその作用を確かめるために、HSC-4細胞にTGF- β 1を添加してファイブロネクチンの誘導をELISA法で観察した²⁸⁾。その結果、歯根膜および歯髄の抽出物添加時には、ベースが高いくらいがあるものの抽出物の濃度に依存してファイブロネクチンの誘導がみられた。この誘導はTGF- β 1の阻害剤であるSB431542の添加で抑制されることから、TGF- β 1の作用であることが示された。TGF- β は上皮系細胞に対して増殖抑制があることが知られているが、HSC-4細胞は口腔上皮由来の細胞であることから、TGF- β を含む歯根膜の抽出物は口腔上皮

にも作用することでファイブロネクチンのような細胞外マトリクスの産生を促進していることが示唆された。

今回の実験において、歯の硬組織であるセメント質および象牙質にはTGF- β 1およびBMP-2様の活性物質が存在するが、その周囲の軟組織である歯根膜と歯髄からはTGF- β 1様の活性物質は検出されたがBMP-2様の活性物質はほとんど検出されなかった。このことより歯根膜および歯髄はTGF- β 1が発現しやすくBMP-2は発現しにくい組織であることが考えられる。歯根膜組織に存在する細胞としては、歯根膜固有の線維芽細胞とその幹細胞である未分化間葉系細胞、硬組織細胞へと分化する骨芽細胞、セメント芽細胞、また血管が豊富であることから血管内皮細胞などが挙げられるが、どの細胞がTGF- β の産生に関わっているかは現在のところ分かっていない。

歯根膜は、セメント質と歯槽骨にはさまれた石灰化しない組織であり、未分化の間葉系細胞を含み様々な分化段階の細胞が存在すると考えられている。このような性質を持った歯根膜においてTGF- β は歯根膜特有の軟組織細胞の分化に関与していることが示唆された。歯髄においてもTGF- β 1が優位に発現しており歯髄細胞から象牙芽細胞への分化をBMP-2が促進する³¹⁻³³⁾という報告から、歯髄細胞の分化にはTGF- β 1が関与しているが、硬組織細胞への分化にはBMP-2が重要な役割を果たしていると考えられる。BMP-2様活性はセメント-象牙質には認められたことから歯根膜、歯髄に含まれる未分化な細胞は、セメント、象牙質に近接もしくは接触することにより硬組織細胞への分化誘導が促進される可能性がある。

以上より歯根膜および歯髄に検出されたTGF- β 1様の活性物質は、各組織の未分化な細胞に対し、BMPによる骨芽細胞およびセメント芽細胞、象牙芽細胞など硬組織細胞への分化誘導を初期段階に留め、成熟した硬組織細胞へと過剰に分化することを抑制することで細胞の集合体が恒常性を維持するように働いている可能性があると考えられる。

以上のことから歯根膜および歯髄にはTGF- β 1が存在し、BMP-2が存在しないあるいは存在しても極くわずかであることが明らかとなった。この結果は歯根膜や歯髄は未分化間葉系細胞を含む組織であるため、それらの分化増殖のコントロールに関与するメカニズムに新しい示唆を与えるものである。歯根膜や歯髄における分化増殖因子の研究は、まだ明らかにされていない歯根膜や歯髄の特性の解明につながる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なるご指導、ご校閲を

賜りました本学歯科保存学第二講座新井 高教授に謹んで深甚なる謝意を表すとともに、ご指導、ご校閲を賜りました本学生化学講座深江 允名誉教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究に対し多くのご指導、ご助言を賜りました本学生化学講座大井田 新一郎教授に心より感謝いたします。さらに研究の遂行にあたり、ご指導とご理解をいただきました本学歯科保存学第二講座五味一博准教授に深く感謝致します。最後に研究にご理解とご支援を頂きました本学歯科保存学第二講座各位および生化学講座各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第52回春季日本歯周病学会学術大会(2009年5月15日、岡山)において発表した。

文 献

- 1) Iwata T, Morotomo Y, Tanabe T, Fukae M, Ishikawa I, Oida S : Noggin blocks osteoinductive activity of porcine enamel extracts. *J Dent Res*, 81 : 387-391, 2002.
- 2) Hammarstrom L : Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24 : 658-668, 1997.
- 3) Hammarstrom L, Heiji L, Gastrelus S : Periodont regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, 24 : 669-677, 1997.
- 4) Bosshardt DD : Biological mediator and periodontal regeneration. : a review of enamel matrix protein at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*, 35 : 87-105, 2008.
- 5) Kawase T, Okuda K, Momose M, Kato Y, Yoshie H, Burns DM : Enamel matrix derivative (EM-DOGAIN[®]) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of Smad 2 in both oral epithelial and fibroblastic human cell. *J Periodont Res*, 36 : 367-376, 2001.
- 6) Suzuki S, Nagano T, Yamakosi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M, Katagiri T, Oida S : Emdogain[®] Gel Stimulates Signal Transduction of BMP and TGF- β . *J Dent Res*, 84 : 510-514, 2005.
- 7) De Jong DS, van Zoelen EJ, Bauerschmidt S, Olijve W, Steegenga WT : Microarray analysis of bone morphogenetic protein, transforming growth factor β , and activin early response genes during osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res*, 17 : 2119-2129, 2002.
- 8) Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T : Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblast into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 127 : 1755-1766, 1994.
- 9) Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K : Smad-6 inhibits signaling by the TGF- β superfamily. *Nature*, 389 : 622-626, 1997.
- 10) Mochizuki T, Miyazaki H, Hara T, Furuya T, Imamura T, Watabe T, Miyazono K : Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor- β superfamily signaling. *J Biol Chem*, 279 : 31568-31574, 2004.
- 11) Dwight L, Johnson, David Carnes, Bjorn Steffensen, David L, Cochran : Cellular effects of enamel matrix derivative are associated with different molecular weight fractions following separation by size-exclusion chromatography. *J Periodontol*, 80 : 648-656, 2009.
- 12) Saito E, Saito A, Kawanami M : Favorable healing following space creation in rhBMP-2-induced periodontal regeneration of horizontal circumferential defects in dogs with experimental periodontitis. *J Periodontol*, 74 : 1808-1815, 2003.
- 13) Hoang AM, Oates TW, Cochran DL : *In vitro* wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol*, 71 : 1270-1277, 2000.
- 14) Schwartz Z, Carnes DL Jr, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD : Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cell, inhibits proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst Cell. *J Periodontol*, 71 : 1287-1296, 2000.
- 15) Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM : Anti-TGF- β antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip 1 and prevent its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodont Res*, 37 : 255-262, 2002.
- 16) Ohyama M, Suzuki N, Yamaguchi Y, Maeno M, Otsuka K, Ito K : Effect of enamel matrix derivative on the differentiation of C2C12 Cell. *J Periodontol*, 73 : 543-550, 2002.
- 17) 掛川文子 : ヒトセメント質および象牙質に含まれる増殖因子について. *日歯周誌*, 49 : 139-150, 2007.
- 18) 津本浩平, 三沢 悟, 熊谷 泉 : 凝集蛋白質を再生する. *蛋白質核酸酵素*, 46 : NO.9 1238-1246, 2001.
- 19) Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA : A Comparative study of human periodontal ligament cell and gingival fibroblast *in vitro*. *J Dent Res*, 67 : 66-70, 1988.
- 20) Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S,

- Sugiya H : Comparison of the characteristics of human gingival fibroblast and periodontal ligament cell. *J Periodontol*, 66 : 1025-1031, 1995.
- 21) Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS : SB431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor (TGF) β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5 and ALK7. *Mol pharmacol*, 62 : 65-74, 2002.
 - 22) Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, Reese ED, Herbstreith MH, Laping NJ, Friedman HS, Bigner DD, Wang XF, Rich JN : SB431542, a small molecule transforming growth factor- β -receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol Cancer Ther*, 3 : 737-745, 2004.
 - 23) Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bonberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J, Gaster L, Callahan JF, Olson BA : Inhibition of transforming growth factor (TGF) β -1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- β type I receptor kinase activity SB-431542. *Mol Pharmacol*, 62 : 58-64, 2002.
 - 24) Smith WC, Harland RM : Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*, 4 : 829-840, 1992.
 - 25) Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM : Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, 29 : 1455-1457, 1998.
 - 26) Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM : The spemann organizer single noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 23 : 599-606, 1996.
 - 27) Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, Wood KV : Dual-luciferase reporter assay : An advanced co-reporter technology integrating firefly and renilla luciferase assay. *Promega Note*, 57 : 2-9, 1996.
 - 28) Hidenori Ichijo, Fumio Momose, Kohei Miyazono : Biological effects binding properties of transforming growth factor- β on human oral squamous cell carcinoma cells. *Experimental cell Res*, 187 : 263-269, 1990.
 - 29) Urist MR : Bone formation by autoinduction. *Science*, 150 : 893-899, 1965.
 - 30) Elizabeth A, Wang, Vicki Rosen, Paul Cordes, Rodney M, Hewick, Mary Jo Kriz, Deborah S, Sibley, John M, Wozney : Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Biochemistry*, 85 : 9484-9488, 1988.
 - 31) Akashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH : Regulatory role of transforming growth factor- β , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cell. *Dev Biol*, 162 : 18-28, 1994.
 - 32) Nakashima M, Reddi AH : The application of bone morphogenetic protein to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 21 : 1025-1032, 2003.
 - 33) Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K : Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human dental pulp cell into odontoblasts. *J Endod*, 30 : 205-208, 2004.