

# 学位論文内容の要旨

論文提出者	和田 淳
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部教授 渋谷 俊昭 (副 査) 朝日大学歯学部教授 柏俣 正典 (副 査) 朝日大学歯学部教授 近藤 信夫
論文題目	BMP-2 と PDGF-BB が歯根膜由来線維芽細胞の走化性に及ぼす影響
論文内容の要旨	<p><b>【目的】</b></p> <p>歯周疾患は歯周病原細菌によって引き起こされる慢性疾患であり、歯の支持組織を破壊し、歯を喪失する原因の一つである。従来の歯周外科治療は、原因因子の除去を主体とした方法であったが、近年、原因を除去したうえで成長因子等を用いた組織再生を促進させる方法へと変化してきている。創傷治癒、組織再生など多くの過程において細胞の走化性は重要な役割を担っている。各成長因子単独での細胞の走化性は多く報告されているものの、複数の成長因子による走化性は現在十分には検討されていない。本研究の目的は BMP-2 と PDGF-BB が歯根膜由来線維芽細胞の細胞走化性におよぼす影響を定量的に評価することである。</p> <p><b>【材料および方法】</b></p> <p>1)細胞培養</p> <p>細胞は正常ヒト歯周靭帯線維芽細胞(HPdLF)をストローマ培地にて 100mm ディッシュ上に細胞数 <math>3.5 \times 10^3</math> cells/ml になるように播種し、3 継代培養を行った。サブコンフルエント状態まで培養した細胞を HEPES 緩衝液にて洗浄し、Trypsin/EDTA 溶液で 3~6 分間処理を行い回収した。回収した細胞はアッセイ培地(DMEM)にて <math>2 \times 10^6</math> cells/ml に調整した。</p> <p>2)EZ-TAXIScan™による走化性試験</p> <p>I 型コラーゲンコーティングカバーガラスをセットした EZ-TAXIScan™に細胞を <math>2 \times 10^3</math> cells ずつ各ウェルに注入し 1 時間プレインキュベートすることにより細胞を接着させた。走化性因子は BMP-2, PDGF-BB を用い、10ng/ml ~ 10 <math>\mu</math> g/ml の各濃度で作用させた。また、BMP-2 と PDGF-BB をそれぞれ 100pg/ml ~ 1 <math>\mu</math> g/ml 濃度で混合して使用した。また、成長因子を注入しないウェルをネガティブコントロール(NC)として観察した。プレインキュベート後、各濃度に調整した走化性因子を注入してから 5 時間撮影した。撮影した画像は ImageJ に取り込み細胞の重心をプロットすることで軌跡を追跡し、走化速度、走化性細胞の割合を定量的に算出し比較検討した。</p> <p>有意差検定は One-way ANOVA により有意差のみられた場合 Tukey-Kramer 法にて解析した。P&lt;0.05 を統計的に有意であると判断した。</p>

## 【結果】

### 1)BMP-2 に対する走化性試験

100ng/ml で走化速度が最も高く 1ng, 10ng, 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g/ml と比較して有意に高い値を示した. 10ng, 100ng, 1  $\mu$ g/ml で NC と比較して有意に高い走化速度を示した. 走化性細胞の割合は 100ng/ml で 1ng/ml と比較して有意な増加がみられた.

### 2)PDGF-BB に対する走化性試験

100ng/ml で走化速度が最も高く 1ng, 10ng, 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g/ml と比較して有意に高い値を示し, 1ng~10  $\mu$ g/ml で NC と比較して有意に高い走化速度を示した. 走化性細胞の割合はそれぞれの濃度に対する有意な差はみられなかった.

### 3)BMP-2 100ng/ml で濃度を固定して PDGF-BB の濃度を調整(100pg/ml~1 $\mu$ g/ml)した混合液に対する走化性試験

PDGF-BB 100ng/ml で走化速度が最も高く, 100pg, 1ng, 10ng, 1  $\mu$ g/ml と比較して有意に高い値を示した. 10ng, 100ng, 1  $\mu$ g/ml で NC に対して有意に高い走化速度を示した.

### 4)PDGF-BB 100ng/ml で濃度を固定して BMP-2 の濃度を調整(100pg/ml ~ 1 $\mu$ g/ml)した混合液に対する走化性試験

100ng/ml で走化速度が最も高く 100pg, 1ng, 1  $\mu$ g/ml と比較して有意に高い値を示した. 1ng~1  $\mu$ g/ml で NC に対して有意に高い走化速度を示した. 走化性細胞の割合は有意な差は見られなかった.

### 5)成長因子間による走化性試験の比較

BMP-2(100ng/ml), PDGF-BB(100ng/ml), BMP-2(100ng/ml)・PDGF-BB(100ng/ml)混合液による比較では走化速度では BMP-2, PDGF-BB, BMP-2・PDGF-BB 混合液での差はみられなかった. 走化性細胞の割合では, BMP-2 単独と PDGF-BB 単独では差はみられなかったものの, BMP-2・PDGF-BB 混合液では走化性細胞の割合が増加した. また, 無反応細胞の割合では BMP-2 と PDGF-BB では差はみられなかったが, BMP-2・PDGF-BB 混合液では無反応細胞の割合が減少した.

## 【考察】

本実験では細胞動態の経時的観察が可能で, 定量性にも優れている EZ-TAXIScan™ を使用して精度の高い走化性の検討が可能であったと考えられる. BMP-2 と PDGF-BB を至適濃度で混合して作用させることは歯根膜線維芽細胞の走化性を亢進させ, より多くの細胞を誘導することにより組織再生能を促進させる可能性が示唆された.

## 【結論】

各種成長因子の特性を考慮した組み合わせと至適濃度を検討することにより, 新たな歯周組織再生療法としての展開が期待される.

