

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890125

研究課題名(和文) FGF-2により誘導される血管新生への歯根膜細胞の関与

研究課題名(英文) Involvement of periodontal ligament cells in angiogenesis induced by FGF-2

研究代表者

兒嶋 由子 (Kojima, Yuko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：90632141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではFGF-2局所投与により誘導される歯周組織再生メカニズムを、血管新生の観点から検討した。FGF-2は歯根膜細胞からのVEGF-A産生を誘導した。また、FGF-2とVEGF-Aの共刺激により歯根膜細胞の遊走能は協調的に亢進した。さらにタイムラプス解析より歯根膜細胞は管腔形成する血管内皮細胞に寄り添うように遊走した。これらの結果よりVEGF-Aの誘導、歯根膜細胞と血管内皮細胞の細胞間相互作用は、FGF-2局所投与部の血管新生により歯周組織再生に適した環境を整えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether FGF-2 could induce vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression in periodontal ligament (PDL) cells and whether cell-to-cell interaction between PDL cells and endothelial cells (EC) could stimulate angiogenesis. FGF-2 induced VEGF-A expression from PDL cells. FGF-2 and VEGF-A synergistically stimulated the migration of PDL cells. Time-lapse analysis revealed that PDL cells migrated close to the tube-forming EC, mimicking pericytes. These findings suggest that FGF-2 and FGF-2-induced VEGF-A, as well as cell-to-cell interactions between PDL cells and EC, create a suitable environment of periodontal regeneration by orchestrating angiogenesis at FGF-2-applied sites.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：血管新生 FGF-2 歯根膜細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な疾患に対してリコンビナントサイトカインを治療薬として応用する試みが進められている。当研究室においても塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)が歯周組織の再生を強く誘導することを報告してきた。しかしながら FGF-2 による歯周組織再生の過程において血管新生のメカニズムおよび異種細胞間の相互作用がどのように関与しているかについてほとんど検討されていなかった。

2. 研究の目的

FGF-2 局所投与により血管新生部位において誘導されると考えられる血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) と歯根膜細胞との関連、および歯根膜細胞と血管内皮細胞との共培養系を用いて両細胞間の相互作用について検討する。

3. 研究の方法

FGF-2 刺激によりマウス歯根膜細胞 (MPDL22) における VEGF-A 及びその受容体 (VEGF-R1) の mRNA 発現を RT-PCR 法および ELISA 法を用いて検討した。

FGF-2 と VEGF-A の共刺激が MPDL22 の遊走に及ぼす影響を Boyden chamber 法と wound healing assay を用いて検討した。また、細胞遊走時の MAPK および PI3K の関与について、MAPK、PI3K の阻害剤を用いて検討した。

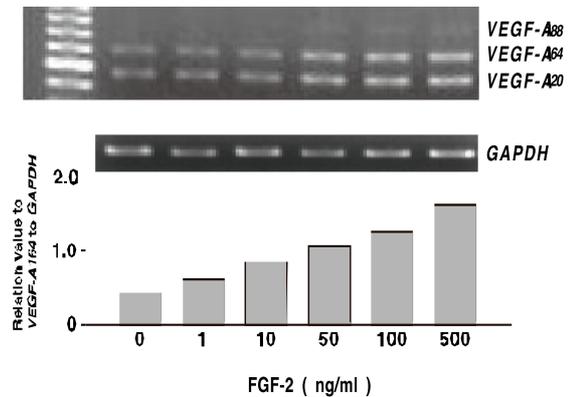
MPDL22 とマウス内皮細胞 b.End5 を 3 次元ゲル内で共培養し、その細胞形態変化の観察を行った。また、両細胞を異なる蛍光色素で染めて、共培養時の細胞動態をタイムラプス解析にて検討した。

FGF-2、VEGF-A 共刺激時の MPDL22 の細胞発現因子の検討をリアルタイム PCR 法にて検討した。

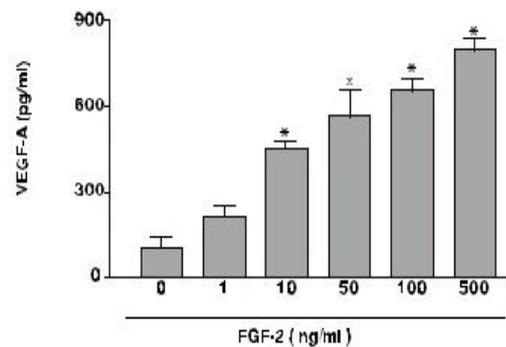
4. 研究成果

FGF-2 刺激により MDPL22 における VEGF-A および VEGF-R1 の mRNA 発現は FGF-2 濃度依存的に増強された (受容体のデータは示さない)。マウスでは VEGF-A に 3 つのサブライシングフォームがあり、そのうち最も重要

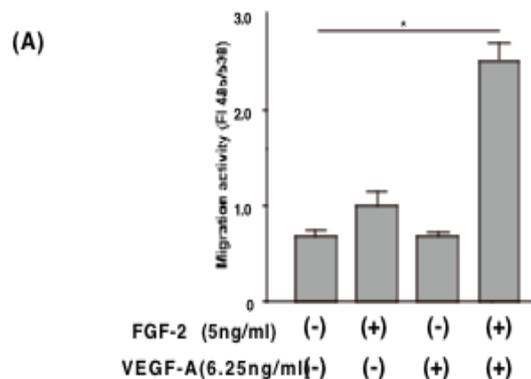
な役割を果たしていると考えられる VEGF₁₆₄ について画像解析を行った。))

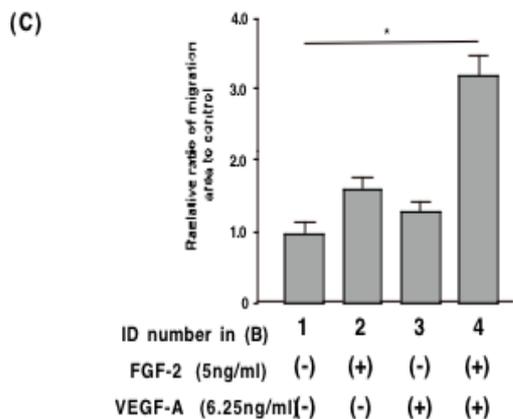
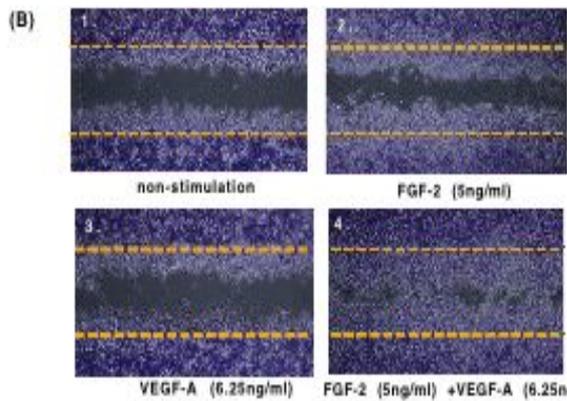


また、VEGF-A 産生量についても下図に示すように FGF-2 濃度依存的に亢進した。

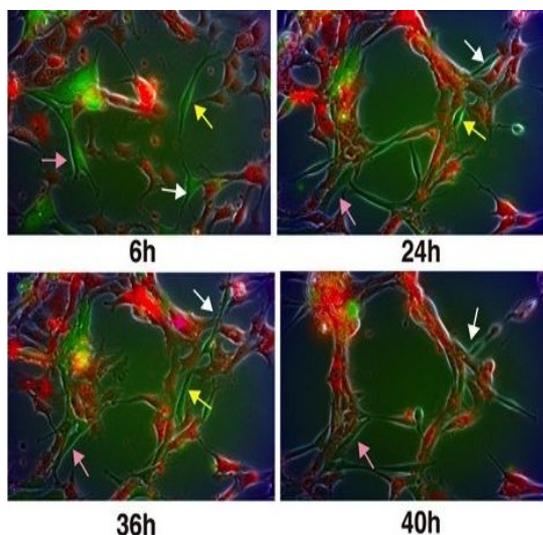


FGF-2 と VEGF-A の共刺激により MPDL22 の細胞遊走能は亢進した。(A) は boyden chamber 法による結果を示す。(B) は創傷治癒実験のデータであり(C)は(B)の結果を数値化したものである。MAPK、PI3K の阻害剤はそれぞれ単独で歯根膜の遊走をある程度抑制したが、両阻害剤存在下で FGF-2/VEGF-A により亢進した遊走能はほぼ完全に抑制された(データには示さない)。

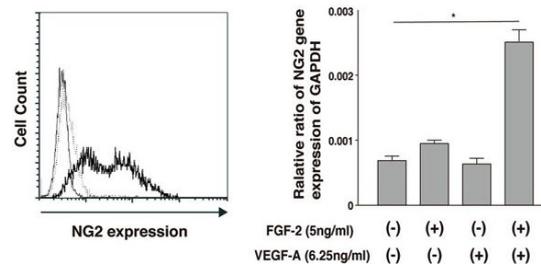




MPDL22 とマウス内皮細胞 b.End5 を共培養し、細胞動態をタイムラプス解析したところループ上に管腔形成している b.End5(赤色)に寄り添うように MPDL22(緑色)が遊走している様子を観察した。(図はそれぞれ共培養後 6、24、36、40 時間の代表的なデータを示す)。図中の色付きの矢印は同一歯根膜細胞の経時的な位置を示す。



前出の実験より歯根膜細胞は内皮細胞に寄り添うように位置することから、歯根膜細胞にはペリサイト様性質を具備する可能性が示唆された。そのため、FGF-2 と VEGF-A 共刺激時の MPDL22 においてペリサイトの代表的マーカーである NG2 の発現を検討した。下の図左に示すように NG2 は無刺激時においても MPDL22 に発現していた。その発現強度は FGF-2 と VEGF-A の共刺激により増強された(下図右)。



以上の結果より、歯根膜細胞において、FGF-2 刺激により VEGF-A 及びその受容体の発現が誘導されることが明らかとなった。また、FGF-2 と VEGF-A の共刺激は歯根膜細胞の遊走能および血管内皮細胞のネットワーク形態変化を亢進させたことから組織再生に適した環境を整えている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kojima Y, Yanagita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Mini-review: Periodontal regeneration and FGF-2. Inflammation and Regeneration 2013, 33:72-77. 査読あり

Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. Journal of Dental Research 2014. 93:89-95. 査読あり

[学会発表](計3件)

Kojima Y, Yanagita M, Mori K, Kubota M, Nozaki Y, Kitamura M, Murakami S. FGF-2 induces VEGF expression by periodontal

ligament cells. 90th IADR. Iguacu Falls, Brazil, 2012, 6/20-23.

Kojima Y, Yanagita M, Mori K, Murakami S. FGF-2 induces VEGF expression by periodontal ligament cells. 98th American Academy of Periodontology Annual Meeting I. Los Angeles, USA, 2012, 9/29-10/2.

久保田実木子、柳田学、森健太、児嶋由子、三木康史、山下元三、野崎剛徳、山田聡、北村正博、村上伸也：FGF-2 刺激による歯根膜細胞からの CXCR4 の誘導、第 137 回秋季日本歯科保存学会、広島、2012/11/22.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

児嶋由子 (KOJIMA YUKO)

大阪大学・歯学部附属病院・特任研究員

研究者番号：24890125