

# 象牙質内に見出される細胞伸展関連物質に関する研究

千葉 大 輔

## A Study on Cell Spreading-related Molecule in Dentin

Daisuke Chiba

(平成13年 1月15日受付)

### 緒 言

近年、歯周組織の再生は歯科治療の新たな可能性の拡大に貢献するものとして考えられている。Nyman らの報告をはじめ<sup>1)</sup>, *in vivo* における研究が行われ、歯周疾患により歯周組織を喪失した露出歯根象牙質上に同組織が再生することが明らかされてきた。歯周組織の中でもとりわけ歯周靭帯は、セメント芽細胞や骨芽細胞への分化能を有する未分化細胞を含んでおりセメント質や歯槽骨を形成することが知られている<sup>2-4)</sup>。

歯周靭帯の再生は、Urabe ら<sup>5)</sup>の研究よりチタンにコーティングした Hydroxyapatite 上にも見られることが明らかとなっている。しかし、人工材料である Hydroxyapatite 上に再生する歯周靭帯の量および質は天然の象牙質上に再生する歯周靭帯に比べて十分ではない<sup>6)</sup>。このことは、Hydroxyapatite 以外の成分、すなわち象牙質内の有機成分が歯周靭帯の再生に対して何らかの役割を果している可能性を示唆している。

歯周靭帯再生の細胞生物学的過程は、まず歯周靭帯由来細胞が象牙質表面に特異的に接着することにより始まり、さらに細胞の増殖・分化、タンパク質合成等の段階を経て、最終的に組織形成すなわち歯周靭帯の再生に至ると考えられる。この一連の過程の中で特異的接着は、足場となる細胞外基質に細胞がレセプターとリガンドの関係で結合することによりなされる。このことにより、細胞骨格の凝集や細胞内外の情報伝達が起こり、その結果細胞は伸展し、これが様々な生命

現象を引き起こすと考えられている<sup>7)</sup>。すなわち、歯周靭帯由来細胞の特異的接着は、歯周靭帯再生の第一段階として必要不可欠であると共に、その後起こる細胞の機能発現に対しても重要であるとみなされている<sup>8)</sup>。この特異的接着がみられる象牙質は、骨と極めて類似した成分を含む硬組織であり<sup>9)</sup>、含まれる有機成分にも共通するものが多い<sup>10,11)</sup>。この有機成分の約90%以上はコラーゲン性タンパク質が占めている<sup>12)</sup>。一方、量的にはわずかであるが、様々な非コラーゲン性タンパク質の存在が明らかにされており、骨に含まれる Bone sialoprotein や Osteonectin 等のほか、Dentin phosphoprotein の様に象牙質に局在するタンパク質に関する報告も見られる<sup>8,9,13)</sup>。しかし、現在象牙質に含まれる非コラーゲン性タンパク質で、歯周靭帯の再生に関与している分子に関する報告は見られず、また象牙質上での歯周靭帯再生のメカニズムの詳細についても明らかでない。そこで、このメカニズムの一端を明確にするためには、象牙質表面における歯周靭帯由来細胞の特異的接着に関わる有機成分の同定が重要であると考えた。

本研究では、象牙質内の有機成分に歯周靭帯由来細胞の接着・伸展に影響を与える因子が存在するか否かを明らかにすることを目的とし、さらにその性質についても検討を加えた。

### 材料ならびに方法

#### I. 象牙質抽出物 (Dentin Extract: 以下 DE) の抽出

ウシ新鮮抜去歯牙より、ダイヤモンドポイントを用いてエナメル質および歯周組織を、またクレンザーを用いて歯髄をそれぞれ除去、2% Sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.5 中で超音波破碎装置 (ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201, TOMY 精工) にて氷冷下、20分間、目盛り6で

広島大学歯学部口腔機能修復学講座 (歯科補綴学第一講座) (主任: 赤川安正教授) 本論文の要旨は、平成11年6月の第32回広島大学歯学部歯学会総会、平成11年9月の第41回歯科基礎医学会学術大会および平成12年4月の General Session of the IADR において発表した。

細胞成分を破壊し、ウシ象牙質のみを得た。この象牙質を液体窒素で凍結、ブレンダー（ワンダーブレンダー、大阪ケミカル）にて粉碎した。得られた象牙質粉末の 12.5 g を 30 ml の 0.5 M 酢酸を用いて脱灰し、24時間毎に同液を取り換えながら 2 週間脱灰を続けた。次いでこの脱灰象牙質粉末に 4 M Guanidine-HCl を加え、4 日間可溶画分を抽出した。その後、1700×g にて 15 分間遠心し、上清を 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.5 に対して透析を行い溶媒交換、限外濾過にて可溶画分中の 3 kDa~100 kDa の成分を集め、実験に使用した。得られた画分のタンパク定量は Bradford らの方法<sup>14)</sup> に行った。また、DE に含まれる分子種は、ポリアクリルアミド濃度が 4%~20% のグラディエントゲルを用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)<sup>15)</sup> を行い、同ゲルを Coomassie brilliant blue (CBB) 染色することにより確認した。

## II. ヒト歯周靱帯由来細胞 (PDL cell) の分離および培養

ヒト歯周靱帯は、矯正治療のための抜歯を目的に来院した患者 (12歳-24歳) から歯周靱帯を可及的に傷つけないよう注意深く抜去した、健全小白歯より Okamoto らの方法<sup>16)</sup> に従い、分離・培養した。

抜去歯牙を滅菌生理食塩水で洗浄後、70%エタノールに 3 秒間浸漬し、その後 5 μg/ml のファンギゾン (プリストルマイヤーズスクイブ) を加えた Dulbecco's Ca, Mg-free phosphate buffered saline (PBS, NaCl 8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g, KCl 0.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L, pH 7.2) に 1 分間浸漬した。続いて、RPMI1640 (Gibco BLR) と DMEM (Gibco BLR) を 1:1 に混合した RD 培地中にて、歯根中央部の歯周靱帯を尖刃刀を用いてそぎ落とした。これら歯周靱帯をプラスチックシャーレに入れ替え、円刃刀を用いてより小さな細片にした。遠心洗浄後、ペレットを 60 mm plastic plate に移し 10% calf serum および 1 μg/ml のファンギゾンを添加した RD 培地を用いて、5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 95% 気相下にて初代培養を行った。得られた細胞を継代し、継代数 3 から 8 の細胞を以下の実験に用いた。

## III. プラスティックプレートのコート

DE が細胞接着・伸展に与える影響、また DE が既存の細胞接着因子である FN と共存したとき細胞接着・伸展に与える影響を検討するため、非培養用プラスチックプレート (96 well assay plate, Corning Inc.) に DE および FN をコートをし、以下の接着実験と伸展実験を行った<sup>17)</sup>。

まず、DE または FN (Human Plasma Fibronectin,

Gibco BRL) を含む 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.5 (以下 Buffer と略す) を各 well に入れ、37°C, 1 時間第一段階のコートを行った。次に 2% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemie) を含む Buffer を同 well 内に入れ、37°C, 1 時間非特異的接着に対するブロッキングを行った。さらに第一段階のコートとして FN を用いた well には、DE を含む Buffer または Buffer のみを、DE をコートした well には FN を含む Buffer または Buffer のみを入れ、同じく 37°C, 1 時間で第二段階のコートを行った。これらの手順により、FN のみのコート (FN), FN の上に DE を重ねてコート (FN+DE), DE のみのコート (DE), DE の上に FN をコート (DE+FN) の 4 種類のコートをプラスチックプレートに施した。

## IV. DE が PDL cell の接着に与える影響

接着細胞数の測定では、III. に示した 4 種類のコートを施したプラスチックプレートに無血清 RD 培地中に浮遊した PDL cell を 5×10<sup>4</sup> 細胞/well で播種した。2 時間後 PBS でゆっくりと 2 回洗浄し非接着細胞を除去し、混合液 (MTS 溶液:PMS 溶液:RD 培地=0.45:0.05:9.5) (Promega 社) を 0.2 ml 加え、37°C で 1 時間インキュベートした後、492 nm での吸光度を測定した<sup>18)</sup>。

## V. DE が PDL cell の伸展に与える影響

細胞伸展の測定では、Tuckwell らの方法<sup>19)</sup> に準じ、III. に示した 4 種類のコートを施したプラスチックプレートに無血清 RD 培地中に浮遊した PDL cell を 5×10<sup>3</sup> 細胞/well で播種した。2 時間インキュベートを行った後、細胞を位相差顕微鏡で観察し、well の中心を含む視野を 100 倍の倍率で写真にとり、写真上の全細胞数に対する伸展した細胞の百分率を求めた。なお、本研究では、細胞突起を出して星状または多角形を呈する細胞を伸展細胞とみなした。それぞれのコートについて、3 つの well における値の平均値を伸展率として評価した。

## VI. 細胞伸展阻害実験による DE が PDL cell の伸展に与える影響に関する検討

細胞伸展阻害実験には、FN および FN+DE のコートを施したプラスチックプレートを用いた。FN による細胞伸展を阻害する合成ペプチド、すなわち RGD ペプチド (GRGDSP) (RGD peptide, Gibco BRL), EILDV ペプチド (DELPQLVTLPHPNLHGP-EILDVPST) (Fibronectin Type III connecting segment Fragment 1-25, Sigma-Aldrich Chemie), REDV ペプ

チド (GEEIQIGHIPREDVDYHLYP) (Fibronectin Type III connecting segment Fragment 90–109, Sigma-Aldrich Chemie), KQAGDV ペプチド (HHLGGAKQAGDV) (Fibrinogen-binding inhibitor peptide, Sigma Aldrich Chemie) の 4 種類の合成ペプチドを 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含む無血清 RD 培地中に浮遊した PDL cell を  $5 \times 10^3$  細胞/well で播種した<sup>20)</sup>。2 時間インキュベート後, V. に示した方法にて伸展率の算出を行った。合成ペプチドを含まない RD 培地中で同様にインキュベートしたものを対照群とし, 各合成ペプチドによる PDL cell の伸展阻害について検討した。

#### Ⅶ. 細胞伸展阻害実験による DE が BHK-21 の伸展に与える影響に関する検討

Ⅵ. と同様, 細胞伸展阻害実験には, FN および FN + DE のコートをしたプラスチックプレートを用いた。RGD ペプチドを 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  または 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含む無血清 Eagle's modified essential medium (MEM) 中に浮遊した BHK-21 を  $5 \times 10^3$  細胞/well で播種した。2 時間インキュベート後, V. に示した方法にて伸展率を算出した。RGD ペプチドを含まない MEM でインキュベートしたものを対照群とし, RGD ペプチドによる BHK-21 の伸展阻害についても検討した。

Ⅷ. DE 中の細胞伸展に影響する因子の部分精製  
ウシ象牙質 100 g より I. に示す方法にて抽出した DE を出発材料として, 以下に示す方法により分画および活性画分の検出を行った。

##### 1. イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーは陰イオン交換樹脂である Mono Q (Mono Q<sup>TM</sup>, pharmacia biotech) (直径 0.5 cm, 長さ 5 cm) を担体として使用した。溶出液は, 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.5 とし, 0.5 M NaCl にて 0~0.5 M までのリニアグラディエントイオン強度勾配を作成し溶出を行った。

##### 2. ゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル濾過クロマトグラフィーは Sephacryl S-200 (Sephacryl<sup>TM</sup> S-200 HR, Pharmacia biotech) (直径 1.6 cm, 長さ 60 cm) を担体として使用し, 溶出液は, 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.5 に 150 mM NaCl を加えたものを用いた。

##### 3. 細胞伸展活性の確認

細胞伸展活性は, Ⅶ. に示した BHK-21 の伸展阻害実験に従い, FN をコートした上に各画分を重ねてコートしたプラスチックプレート上に 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の RGD ペプチドを含む MEM 中で well あたり  $5 \times 10^3$  個の BHK-21 を 2 時間培養して, 伸展阻害の程度の低いものを活

性ありとして検出した。

#### 4. 画分中に含まれる分子種の分子量による分布

各画分に含まれる分子種の分子量による分布を, ポリアクリルアミドを 4%~20% 含むグラディエントゲルを用いた SDS-PAGE<sup>15)</sup> にて確認した。各サンプルは還元しない条件および  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) にて還元した条件で電気泳動を行った。

## 結 果

### Ⅰ. DE の抽出

12.5 g の象牙質より得られた DE 中には, 約 300  $\mu\text{g}$  のタンパク質が存在した。また SDS-PAGE を行った結果, これらのタンパク質の分子量は約 3 kDa~約 60 kDa に分布していた (図 1)。

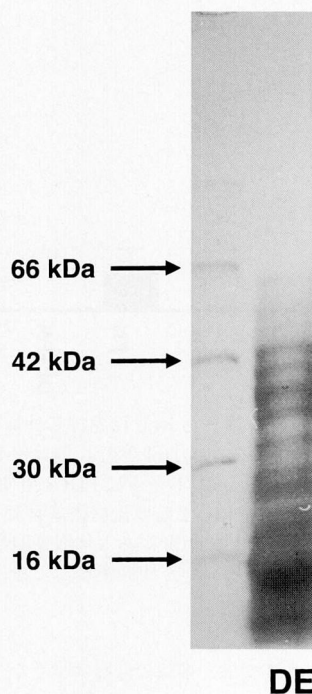


図 1 得られた DE の SDS-PAGE パターン (CBB 染色)。

### Ⅱ. PDL cell の接着・伸展に対する DE の影響

FN を 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , DE を 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の条件でプラスチックプレートにコートした場合, DE および DE + FN のコートをした well では, 接着細胞は見られなかったが, FN + DE のコートをした well では, 接着タンパクである FN のみコートした well での接着細胞数とほぼ同等の接着細胞が認められた (図 2)。

細胞の伸展においては, DE および DE + FN のコー

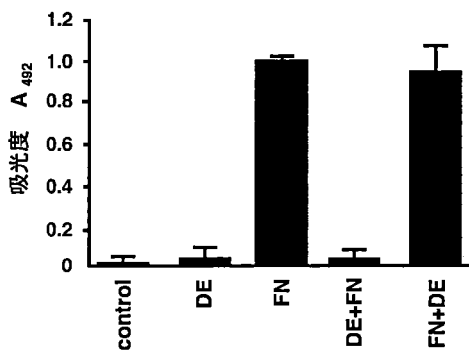


図2 各コートをしたwellにおける接着細胞数。  
FN濃度を5  $\mu\text{g/ml}$ とし、各コートをしたプラスチックプレートにPDL cellを $5 \times 10^4$ 細胞/wellで播種し2時間後洗浄によって非接着細胞を除去した後、MTT法にて492 nmの吸光度を測定した。

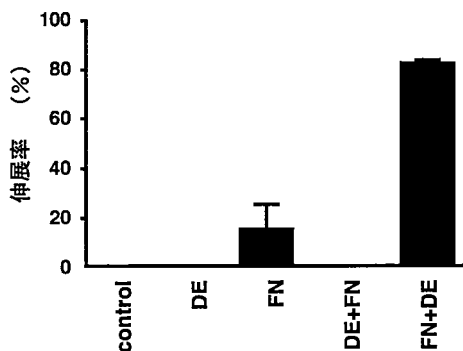


図3 各コートをしたwellにおける伸展率。  
FN濃度を5  $\mu\text{g/ml}$ とし、各コートをしたプラスチックプレートにPDL cellを $5 \times 10^3$ 細胞/wellで播種し2時間後位相差顕微鏡にて細胞形態を観察し、視野にある伸展細胞数の全細胞数に対する百分率を伸展率として算出した。

トをしたwellでは、細胞の伸展は全くなく球形のままであった。FNのみをコートしたwellでは、細胞は細胞突起を出して星状または多角形を呈しており、約20%の細胞が伸展していた。それに対し、FN+DEのコートを施したwellにおいては、FNのみをコートしたwellで見られた伸展率の4倍に相当する約80%の細胞が伸展しているのが観察され、FNにDEを重ねてコートすることにより細胞伸展が促進されていた(図3)。

次に、FNの濃度を1, 5, 10, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ と変化させ、FNおよびFN+DEのコートを施したwellにて、PDL cellの接着と伸展について観察した(図4, 図5)。その結果、接着細胞数に関しては両コート間で

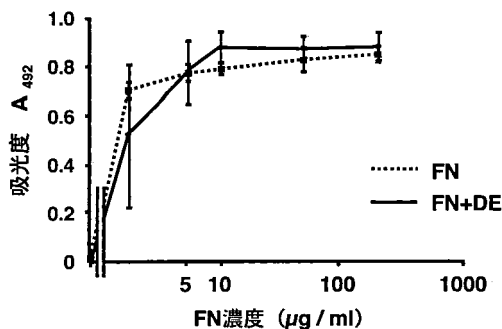


図4 異なるFNの濃度による接着細胞数の変化。  
種々の濃度のFNを用いてFNおよびFN+DEのコートを施したプラスチックプレートにPDL cellを $5 \times 10^4$ 細胞/wellで播種し2時間後洗浄によって非接着細胞を除去した後、MTT法にて492 nmの吸光度を測定した。

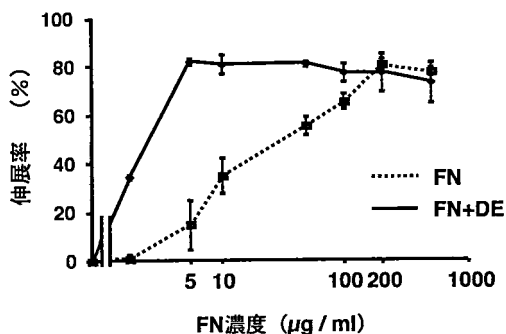


図5 異なるFNの濃度による伸展率の変化。  
種々の濃度のFNを用いてFNおよびFN+DEのコートを施したプラスチックプレートにPDL cellを $5 \times 10^3$ 細胞/wellで播種し2時間後位相差顕微鏡にて細胞形態を観察し、視野にある伸展細胞数の全細胞数に対する百分率を伸展率として算出した。

差はなく、共にFN濃度5  $\mu\text{g/ml}$ においてほぼ最大値に達していた(図4)。伸展実験では、100  $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度でFNをコートした場合、FNのみをコートした場合に比べFN+DEのコートを施した場合の方が伸展率は明らかに高く、その差はFN濃度が5  $\mu\text{g/ml}$ の時に最大であった。一方FN濃度が200  $\mu\text{g/ml}$ より高い場合には差が見られず、FNおよびFN+DEの両コートにおける細胞の伸展率は共にほぼ最大の約80%を示した(図5)。

### Ⅲ. PDL cellを用いた伸展阻害実験

コートに用いるFN濃度を前述の伸展実験でほぼ最大の伸展率を示した200  $\mu\text{g/ml}$ とし、FNおよびFN+

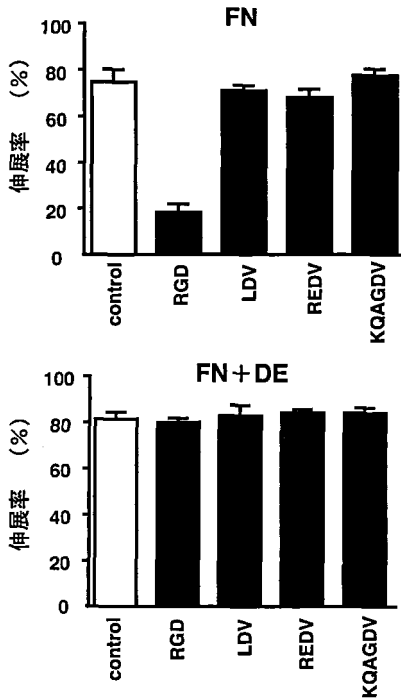


図6 各合成ペプチドのPDL cellの伸展に対する阻害効果。

FN濃度を200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、FNおよびFN+DEのコートを施したプラスチックプレートにPDL cellを $5 \times 10^3$ 細胞/wellで各合成ペプチド(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )存在下にて播種し2時間後位相差顕微鏡にて細胞形態を観察し、視野にある伸展細胞数の全細胞数に対する百分率を伸展率として算出した。上にFNのみコートした場合、下にFN+DEのコートを施した場合を示す。

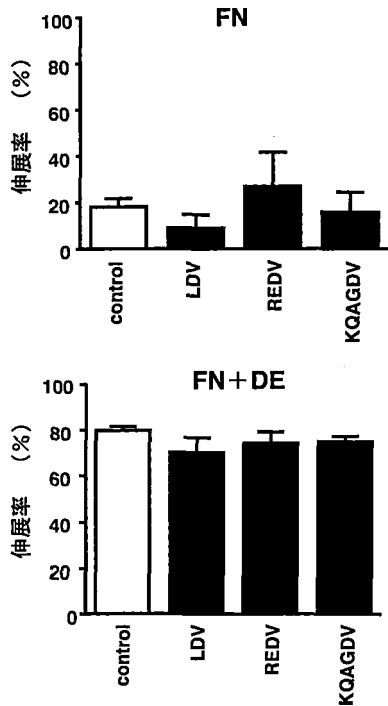


図7 RGDペプチド共存下での各ペプチドの伸展阻害効果。

FN濃度を200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、FNおよびFN+DEのコートを施したプラスチックプレートにPDL cellを $5 \times 10^3$ 細胞/wellでRGDペプチド(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )およびそれ以外の合成ペプチド(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )存在下にて播種し2時間後位相差顕微鏡にて細胞形態を観察し、視野にある伸展細胞数の全細胞数に対する百分率を伸展率として算出した。上にFNのみコートした場合、下にFN+DEのコートを施した場合を示す。

DEの両コートに対し、伸展阻害実験を行った。FNのみをコートしたwellでは、ペプチドを加えない場合(control)の伸展率約80%に対し、RGDペプチド(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を培地中に加えた場合の伸展率が約20%となり、RGDペプチドは細胞伸展を阻害していた。それに対してFN+DEのコートを施したwellでは、controlとRGDペプチド(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加えた場合で約80%の伸展率を示し、RGDペプチドによる細胞伸展阻害効果は消失した(図6)。また、他のペプチド(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加えた場合では、FN、FN+DE両コート共に伸展率に対する影響はほとんど確認されなかった。RGDペプチド(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )と他のペプチド(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を共存させて阻害実験を行った場合も同様であった(図7)。

#### IV. BHK-21を用いた伸展阻害実験

BHK-21は、FN、FN+DE両コート共に5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の

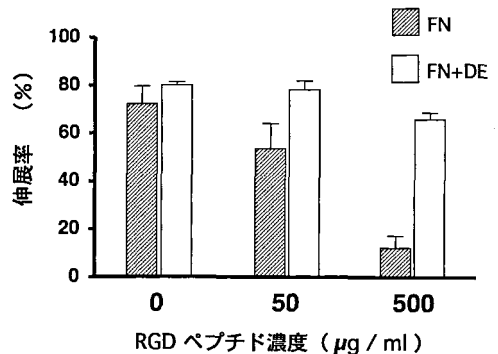


図8 RGDペプチドのBHK-21の伸展に対する阻害効果。

FN濃度を5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、FNおよびFN+DEのコートを施したプラスチックプレートにBHK-21を $5 \times 10^3$ 細胞/wellでRGDペプチド存在下にて播種し2時間後位相差顕微鏡にて細胞形態を観察し、視野にある伸展細胞数の全細胞数に対する百分率を伸展率として算出した。

濃度で FN をコートしたとき、ほぼ最大の伸展率（約 80%）を示した。本研究では FN を 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、培地中の RGD ペプチドを 50 および 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とし、この条件下で阻害実験を行った（図 8）。

RGD ペプチドの濃度が 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、FN のみコートした well では約 60% の細胞が伸展しており、control の約 80% に比べ伸展率は低下していた。また、FN+DE のコートを施した well では control とほとんど変わらない約 80% の伸展率を示した。RGD ペプチドの濃度を 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とすると、FN のみコートした well では伸展率が約 20% となり RGD ペプチドによる伸展阻害が明確に確認できたのに対し、FN+DE のコートを施した well では伸展率は約 70% で若干伸展率の低下が認められたものの、明確な伸展阻害は観察されなかった。すなわち、すでに RGD 配列関与で FN と結合し接着・伸展をすることが知られている株化細胞 BHK-21 においても、PDL cell の場合と同様、FN+DE のコートを施した well では RGD ペプチドによる細胞伸展阻害効果が消失していた。

#### V. DE 中の細胞伸展に影響を与える因子の部分精製

Mono Q を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行い活性画分を検出した結果、NaCl 濃度 0.25~0.4 M

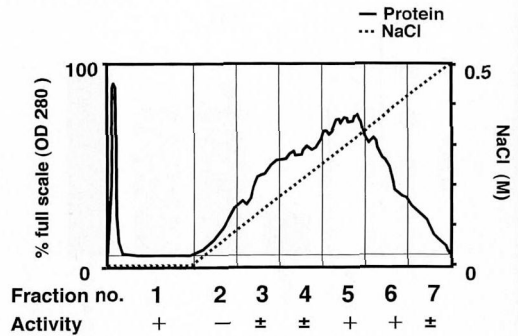


図 9 陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターン。

Mono Q を用い 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.5 を溶出液（全容量 75 ml）とし、0.5 M NaCl にて連続したイオン強度勾配を作成し分画を行ったところ、画分 5、6 に最も強い活性が見られた。

に相当する画分 5、6 に最も強い活性が見られた（図 9）。SDS-PAGE を行ったところ（図 10）、活性画分の泳動像は分画前とは明らかに異なっているものの分子量 40 kDa 以下に多くの分子種が存在していた。次に活性画分 5、6 および弱い活性の検出された画分 7 も併せて、Sephacryl S-200 によりゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、図 11 に示す様にゲル濾過クロ

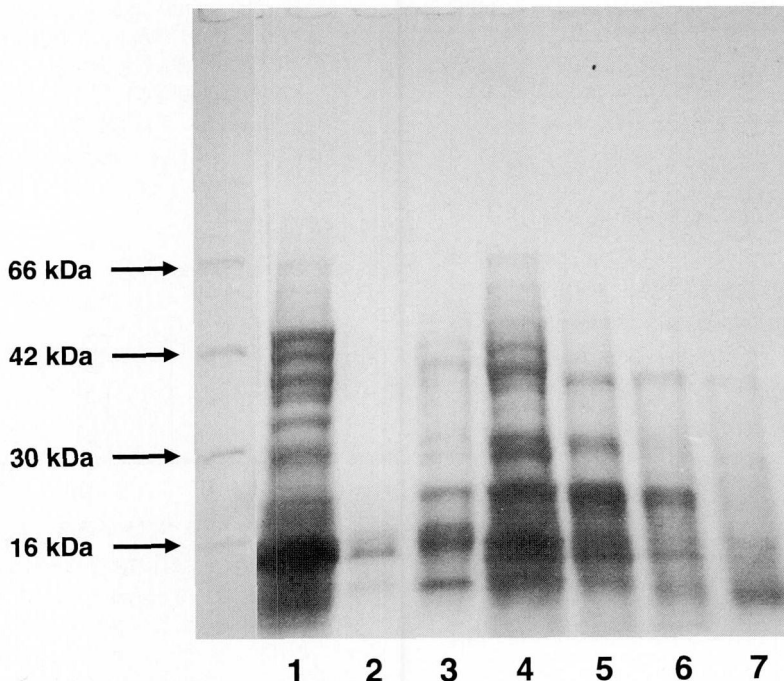


図 10 陰イオン交換クロマトグラフィーの各画分の電気泳動パターン。

Mono Q にて分画した各画分の SDS-PAGE を行ったゲルを CBB にて染色した。



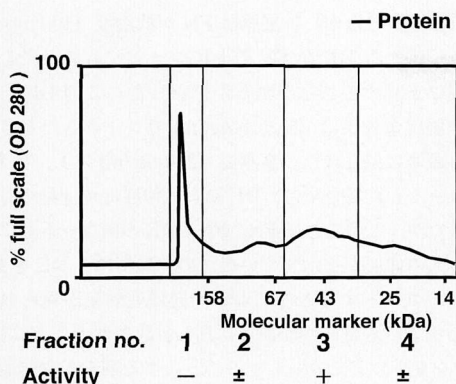


図11 ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出パターン。

Sephacryl S-200 を用い 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.5 に 150 mM NaCl を加えたものを溶出液 (全容量 80 ml) として分画を行ったところ、画分 3 に最も強い活性が見られた。

マトグラフィーの分子量マーカーで約 43 kDa の分子を含む画分 3 に最も強い活性が見られた。SDS-PAGE を行ったところ、この画分には約 30 kDa に明瞭なバンドがあり、その他低分子量領域にも不明瞭なバンドが認められた (図12)。

## 考 察

本研究では、象牙質に含まれる有機成分の細胞接着・伸展に対する影響を検討するため、象牙質より有機成分の抽出を行った。硬組織中に含まれる有機成分を抽出する方法には様々なものがあるが、本研究では、セメント質中に含まれる接着タンパク質である Cementum attachment protein を精製した McAllister の方法<sup>17)</sup> をもとにして抽出を行った。ここで抽出した DE 中には、SDS-PAGE より 3 kDa~60 kDa の分子領域に種々のタンパク質が存在することが確認できた。これらのゲルに、酸性タンパク質やプロテオグリカン等を高い感度で染色できる Alcian blue 染色および Stains all 染色<sup>21)</sup> を試みたところほとんど染色されなかったことより、これらの存在は極めて微量であると考えられる。このことは、象牙質中に含まれている Dentin phosphoprotein<sup>13)</sup> やプロテオグリカン等は、この抽出条件ではほとんど抽出されていないことを示唆している。また、象牙質に含まれるタンパク質の約90%以上を占める Type I コラーゲンも分子量から判断して除外できることから、DE には主に分子量 3 kDa~60 kDa の非コラーゲン性タンパク質が含まれているとみなされる。また、この

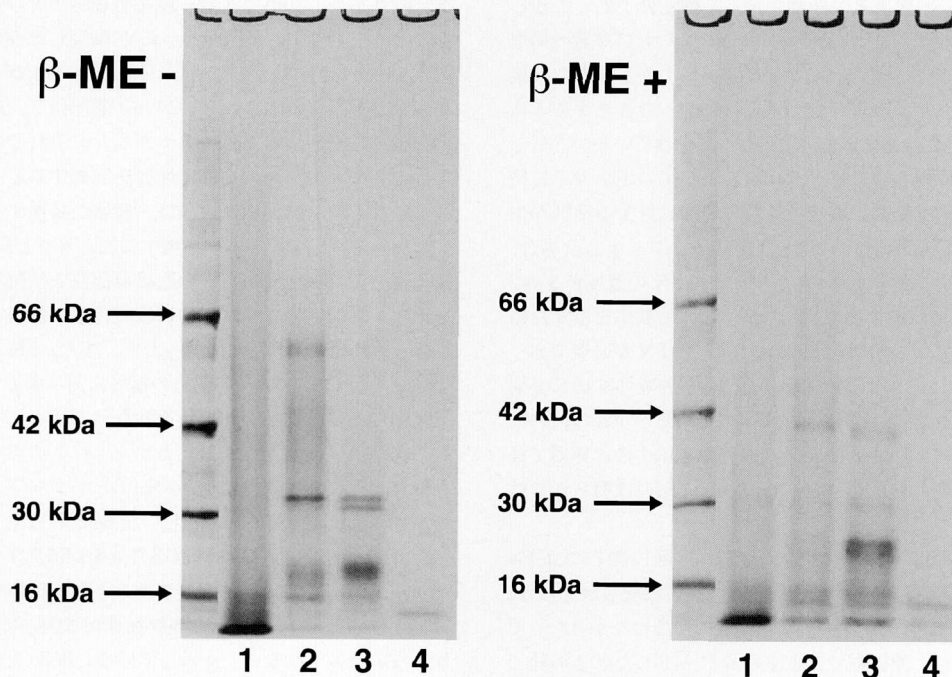


図12 ゲル濾過クロマトグラフィーの各画分の電気泳動パターン。

Sephacryl S-200 にて分画した各画分の SDS-PAGE を行ったゲルを CBB にて染色した。左にサンプル添加時に還元剤を使用していないもの、右に還元剤として  $\beta$ -ME を添加したものを示す。

方法にて象牙質 12.5 g より抽出されたタンパク質量は約 300  $\mu\text{g}$  であり、重量比にして約 0.02% であった。象牙質中の非コラーゲン性タンパク質は 2% 程度である<sup>9)</sup>とされていることから、ここで抽出したのは非コラーゲン性タンパク質全てでなくその一部なのであろう。

本研究では、DE や歯周靭帯再生初期の段階における関与が明らかにされている FN 等<sup>8)</sup> の細胞外基質と細胞との接着・伸展を検討するため、それらをプラスチックプレートにコートし、その上で PDL cell を培養した。接着細胞数や伸展率を測定する方法には様々なものがあるが、本研究では接着細胞を MTT assay を用いて非接着細胞と区別した。また、位相差顕微鏡による観察で、細胞突起を出して扁平となった細胞を伸展細胞とみなし、非接着あるいは接着細胞と区別した。これら 2 種類の方法を併用することで、DE が細胞接着と伸展に与える影響の相違を検討しようとした<sup>22)</sup>。

その結果、DE のみをコートした well では接着細胞および伸展細胞は見られなかった。このことは、DE には単独で細胞接着・伸展を起こさせる分子が含まれていない、もしくは DE 中のそのような分子がプラスチックプレート上にコートされていないことが示唆される。また、DE+FN のコートをした well においても接着細胞や伸展細胞が見出せなかった。FN はすでに単独で細胞接着・伸展に対して働く分子として知られており<sup>23)</sup>、DE の上にコートされていれば多数の細胞の接着・伸展が見られるはずである。しかしながら、接着細胞や伸展細胞が全く見られなかったことから考えると、DE の上に FN が殆どコートされていない、もしくは DE の上にコートされることにより FN 分子に構造的変化が起こり細胞の接着・伸展に対する活性が失われた等の可能性がある。FN のみをコートした場合、PDL cell の接着は図 4 に示すように FN の濃度が 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ときほぼ最大値を示したが、最大伸展率を示すためには、さらに高濃度 (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の FN が必要であった (図 5)。一般的に細胞が最大伸展率を示すのに必要な FN の濃度が約 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  程度である<sup>20)</sup> のに対して、本研究では PDL cell が最大伸展率を示すのに極めて高濃度の FN を必要となったが、その原因は明らかではない。

FN+DE のコートでは、接着細胞数に関しては FN のみコートしたときとほぼ同等の接着細胞数が見られ、DE を FN の上にコートすることの影響はなかった。それに対し、伸展率では FN のみコートしたときの約 4 倍もの高い伸展率が見られた。これらのことは、DE が FN の細胞伸展活性を促進していることをうかがわせる。さらに、コートする FN の濃度を変化させたところ、細胞接着に関しては DE を FN の上にコートする

効果はなかったが、伸展率は FN が低濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下) のとき DE を FN の上にコートすることにより大幅に上昇することが明らかになった。この DE による伸展促進効果は FN を 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でコートしたときに最も顕著に見られた。高濃度 (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上) の FN をコートした場合には、DE による伸展促進は見られなかったが、このことは FN、FN+DE の両コート共にほぼ最大の伸展率を示していたため、見掛け上 DE を FN の上にコートすることによる伸展促進効果が見られなくなっている可能性がある。FN が低濃度のときには、DE を FN の上にコートすることによる明らかな伸展促進効果が見られたことより、DE は FN による細胞伸展を促進させる機構に何らかの影響を与えていると考えられる。

また、他の接着タンパク質として VN を用い、その上に DE を重ねてコートすることによる PDL cell の伸展促進効果について検討したが、FN を用いたときのような明確な伸展の促進は認められなかった。おそらく DE は FN 上にコートされることにより、初めてその伸展促進効果を示すものと思われ、その機構に関しては、いくつかの可能性が考えられる。

FN は細胞伸展に関して高い活性を持つ分子であるが、その活性を制御する部位は数個のアミノ酸レベルまで絞り込むことができる。現在明らかになっているものとしては、Pierschbacher らが報告した RGD 配列<sup>24)</sup>、Humphries<sup>25,26)</sup> らが報告した LDV および REDV 配列が挙げられる。これらのアミノ酸配列は、細胞表面の膜タンパク質であるインテグリンにそれぞれリガンドとして認識され、接着・伸展を制御すると考えられている。細胞伸展阻害実験は、細胞を播種する際に上記配列を含むペプチドを培地中に加えることにより、固相化された FN 分子上の細胞接着部位と拮抗的にインテグリンに結合し、結果的に細胞接着・伸展を阻害するという現象を利用して行った<sup>19)</sup>。また、FN を固相化した場合 Fibrinogen と細胞の接着に関与するアミノ酸配列である KQAGDV 配列を含むペプチドによっても、細胞接着は阻害されることから<sup>27)</sup>、このペプチドも併せて用いた。その結果、FN+DE のコートをした well では FN のみをコートした well とは全く異なり、RGD ペプチドによる伸展阻害効果が消失するという興味ある結果が得られた。このことは、FN+DE のコートにおける PDL cell の伸展促進が RGD 配列の関与しない機構であることを示している。RGD 配列は細胞伸展に極めて重要なアミノ酸配列であり、FN の細胞伸展活性のほとんどはこの配列が担っているといっても過言ではない。またこのアミノ酸配列は、他に VN<sup>28)</sup>、Collagen<sup>29)</sup>、Fibrinogen<sup>30)</sup>、Osteopontin<sup>31)</sup> などの接着



分子内にも見出されており、実際これらのタンパク質の細胞接着部位として機能して<sup>32)</sup>、細胞接着・伸展に重要な役割を演じている。これらの事実より、今回観察された RGD 配列を介さない強力な細胞伸展促進機構の存在については現在までに報告はなく、極めて特殊な機構であると考えられる。

RGD ペプチド以外に用いた伸展阻害ペプチドである LDV, REDV, KQAGDV ペプチドでは FN および FN + DE のコートをした場合、PDL cell の伸展率にほとんど影響しなかった。このことは、FN 分子上における RGD 配列の働きが極めて大きいため、阻害効果が現れにくくなっているとも考えられる。そこで、RGD 配列が関与する細胞伸展機構を阻害した上でこれらのペプチドの阻害効果をみるため、RGD ペプチドを共存させた上で、LDV, REDV, KQAGDV ペプチドによる伸展阻害実験を行ったところ、FN のみコートした well においてこれらのペプチドは PDL cell の伸展率にほとんど影響を与えていなかった。これらのアミノ酸配列は、先に述べた RGD 配列に比べ、細胞接着・伸展に関して活性が低いとされており<sup>25-27)</sup>、PDL cell の FN による伸展においてもほとんど関与していないのであろう。また同様に、FN + DE のコートにおいても RGD ペプチド以外の伸展阻害ペプチドは伸展率に影響を与えていなかったことから、このコートを実施することにより見られた PDL cell の伸展機構もこれらのアミノ酸配列の関与しないものとみなされる。これらのことから、FN の上に DE をコートすることにより見られた PDL cell の伸展促進には、FN 上の既知の細胞接着部位は関与していないことがうかがえる。

以上示したような、DE を FN に重ねてコートすることによる RGD 配列非関与の細胞伸展は、初代培養の PDL cell に特異的な現象であることも考えられ、一般的な細胞の伸展機構には影響を与えない可能性もある。今回、FN と RGD 配列関与で接着・伸展をすることが明らかになっているハムスター胎児腎臓由来の線維芽細胞系株化細胞 BHK-21<sup>33)</sup> を用いてさらに検討した。その結果、BHK-21 においてもやはり DE を FN に重ねてコートすることによる RGD 配列非関与の伸展機構が働いていた。従って、今回は BHK-21 についてのみの検証であるので強い証拠とは言えないものの、DE は PDL cell の伸展にのみ特異的に影響を与えるのではなく、普遍的に FN 関与の伸展機構に影響を与えている可能性がある。

現在、細胞の特異的接着に関わる細胞外基質中の分子としては、FN や VN 等単独で細胞の接着・伸展に活性を持つ分子が報告されている<sup>23)</sup>。しかしながら本研究に見られた様に、FN に作用して RGD 配列非関与の

細胞伸展機構を促進する分子の存在は今までに全く報告されていない。本研究だけの結果からこの様な分子の具体的な作用機序を明らかにすることは困難であるが、いくつかの推測はできる。

まず、DE を FN に重ねてコートしたとき細胞接着には影響を与えず細胞伸展のみを促進した事実を、細胞の接着から伸展に至るまでの過程から考察すると、DE 中にそれ自身では細胞を接着させることはできないが、細胞の伸展を促進する因子が存在することが考えられる。細胞の細胞外基質に対する接着と伸展は、細胞膜表面に存在するインテグリンにより制御されると考えられている<sup>34-36)</sup>。インテグリンは、 $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖からなるヘテロダイマーを形成する膜タンパク質で、多様な細胞外基質と結合して細胞内外の情報伝達を行っている。細胞はまず細胞外基質中のリガンドと弱く接着し、このリガンドとインテグリンの結合が細胞内にシグナルを伝え、インテグリンの会合、裏打ちタンパク質の凝集やストレスファイバーの伸張が起こりこれらが接着斑を形成し伸展する<sup>37)</sup>。それゆえ、DE は細胞が接着後、接着斑を形成するまでの過程を促進することが示唆される。またリガンドとインテグリンの結合には細胞内エネルギー代謝や 2 価の金属イオンが必要である<sup>38,39)</sup> ことから、DE はこれらの機構に働きかけてインテグリンとリガンドとの結合を促進し、接着斑の形成を促進しているのかも知れない。またインテグリンは、通常非活性型として存在し、その活性化は inside-out シグナル伝達および outside-in シグナル伝達の連携によって調節されていること<sup>32,40,41)</sup> から、DE がシグナル伝達系に影響を与えて接着斑の形成を促進し、さらに細胞伸展を促進している可能性も考えられる。ただし、伸展は細胞がリガンドに対し接着することなしに起こり得ないので、DE 中に細胞を接着させる活性を持つ因子が存在しないなら、FN がその役割を担わなければならない。しかし、RGD 配列を始めとする FN の細胞接着部位非関与の細胞伸展が DE を FN に重ねてコートしたときに見られたことから、FN 分子上の既知の細胞接着部位以外に細胞接着に対する活性を持つ部位の存在が予測できる。現在の知見では、FN 分子上で細胞接着・伸展に対して最も高い活性を示す部位は RGD 配列であるが、この配列に関与しない強力な接着・伸展機構も存在することが考えられ、DE を FN に重ねてコートすることにより FN もしくは DE 中に含まれる分子の接着活性部位が立体構造の変化により活性化されているのかもしれない。または、DE と FN が複合体を形成することにより、まだ明らかにされていない接着・伸展機構が働いて可能性もある。

さらに、細胞側から接着・伸展機構について考える

と、今回細胞伸展阻害実験に用いた RGD 配列を認識して結合するインテグリンは、 $\alpha_5\beta_1$  を始めとして  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_3$  等が挙げられる<sup>34-36,42)</sup>。また、LDV 配列に対しては、 $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$  等<sup>34-36)</sup> のインテグリンが関与していることが知られているので、FN+DE のコートをした場合ではこれら以外のインテグリン、またはインテグリン以外の細胞膜タンパク質が細胞接着・伸展に関与している可能性もある。

さらに、細胞表面に存在する他の接着分子として細胞膜貫通型プロテオグリカンであるシンデカンが細胞接着・伸展に関与しているとの報告もある<sup>43-45)</sup>。シンデカンは細胞外にヘパリン硫酸側鎖をリガンド結合部位として持ち、FN 分子中のヘパリン結合部位との結合も知られている<sup>44)</sup>。この場合の結合は、タンパク質-糖鎖相互作用であるが極めて高い特異性を示すことが知られている<sup>45)</sup> のもの、その詳細は現在明らかでない。この様な細胞膜上のタンパク質以外の分子が、DE を FN に重ねてコートすることによる強力な細胞接着・伸展機構にレセプターとして関与している可能性もある。

今回の研究では、DE 中のどの様な分子が RGD 配列非関与の伸展促進効果を示しているかについて、部分精製を行うことにより、ある程度明らかにすることを試みた。部分精製の方法として様々な方法が挙げられるが、本研究では最も効果的に分画を行うことのできた陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにて分画を行い活性画分を回収した。その結果、最も強い活性を確認した画分には、SDS-PAGE にて約 30 kDa の明瞭なバンドおよび低分子量に不明瞭なバンドが見られた。具体的に画分中のどの様な分子が FN 関与の細胞伸展機構に影響を与えているのかは特定するに至らなかったが、少なくとも 30 kDa 付近の分子量を持つ分子、あるいはさらに低分子量の分子が関係していることは示すことができた。

DE の細胞伸展促進活性は FN に重ねてコートしたときに見られることにより、目的とする因子は FN と特に高い親和性を示す物質であることが考えられた。そこで以上の分画方法の他に、FN 分子を結合させた担体を用いる FN アフィニティークロマトグラフィー<sup>46)</sup> による分画も試みたが、通り抜け画分と溶出画分の電気泳動像はほぼ同一で、この方法による分画は出来なかった。このことは、FN がきわめて多くのタンパク質に対して親和性を有することにより DE 中の有機成分の殆どが担体に結合したことによるのであろう。

象牙質に含まれる低分子量のタンパク質として、分子量 34 kDa の Dentin phosphoprotein を挙げるができる。このタンパク質は SDS-PAGE を行ったゲルを Stains all または Alcian blue にて染色することにより

明瞭なバンドを呈することが知られている<sup>13)</sup>。しかし、今回これらの染色を行ったが全く染色されなかったことから、この抽出条件においては殆ど抽出されていないと考えられる。

また、骨に含まれる接着タンパク質である Osteopontin は約 44 kDa の分子量と考えられているが、SDS-PAGE で見られる分子量は約 60 kDa となっており<sup>47)</sup>、今回の画分の分子量の範囲からすればやや高い分子量となっている。

さらに、硬組織内に広く認められ、非常に多くの性質を示す成長因子で約 25 kDa の分子量を持つ TGF- $\beta$  には、mRNA レベルにおいてインテグリンの発現量を調節するという報告がある<sup>48,49)</sup>。特に線維芽細胞においては FN と最も親和性の高い  $\alpha_5\beta_1$  インテグリンの発現量を上昇させることが知られている<sup>49)</sup>。しかし、本研究においては、細胞を 25  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximide にて前処理することにより、タンパク質合成をあらかじめ阻害している<sup>50)</sup> ので、このようなインテグリンの増減による影響はないとみなしてよい。また、TGF- $\beta$  は 12.5 kDa の分子のホモダイマーであるため、還元剤を添加して SDS-PAGE を行った場合、25 kDa 付近に見られていたバンドが 12.5 kDa 付近に移動する。今回そのような所見もなかったことから、DE 中の分子が TGF- $\beta$  である可能性は極めて低い。

以上のことから、DE 中に見出された RGD 配列非関与で細胞伸展を促進する分子は未知のものである可能性がある。また、本研究では象牙質からの抽出のみを行ったが、他の組織内にもこの様な性質を有する分子が見出されることも十分に考えられ、将来的にこの分子について詳細を明らかにできれば、細胞の特異的接着に普遍的に働きうる未知の機構について明確になるかも知れない。このことにより、歯周韌帯の再生を含めた創傷治癒に関する新しい知見、さらに広い分野では、生命科学における新しい現象として重要な知見をもたらす可能性がある。

## 総 括

本研究では、細胞の特異的接着に関与する因子が象牙質内に存在するのではないかと考え、DE が PDL cell の接着および伸展に与える影響について検討した。その結果、以下のことが明らかになった。

1) DE はそれ自身で歯周韌帯由来細胞を接着・伸展させる因子を含んでいなかった。

2) 低濃度 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) で FN をコートすると PDL cell の伸展率は約 20% であったのに対し、DE をその上に重ねてコートすることにより、同細胞の伸展率は約 80% と大幅に上昇した。

3) さらに FN+DE のコートを施した well での PDL cell の伸展は RGD ペプチドによって阻害されず、既知の FN 分子上に見られる細胞接着部位のアミノ酸配列非関与であった。

また、この RGD 配列非関与の接着機構が PDL cell のみに見られる特異的な現象であるか否か、FN との特異的接着に RGD 配列が大きく関与している BHK-21 を用いて検証したところ、同細胞においても、FN+DE のコートを施した well での細胞伸展は、RGD ペプチド非関与であることが明らかになった。

さらに、上記活性を持つ因子の部分精製を試みたところ、分子量約 30 kDa の分子を含む低分子量の画分に最も強い活性が見られた。

以上の結果から、FN の存在下において RGD 配列非関与の接着機構によって、PDL cell の特異的接着を強力に促進させる因子が象牙質中に存在することが明らかとなった。さらに、同因子は BHK-21 の特異的接着にも同様に影響しうること、低分子量の分子であると考えられることも判明した。これらの知見は、象牙質内に FN 存在下で RGD 配列非関与の特異的接着機構により高い細胞伸展活性を示す因子が存在し、歯周粘着帯の再生の過程で細胞の特異的接着に影響を与え得ることを示唆している。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜りました広島大学歯学部口腔機能修復学講座(歯科補綴学第一講座)赤川安正教授に心より感謝の意を表します。本研究の遂行および論文の作成上、それぞれ御専門の立場から御教示、御校閲を賜りました本学基礎口腔医学講座(口腔生化学講座)加藤幸夫教授並びに本学応用口腔医学講座(歯科保存学第二講座)栗原英見教授に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました本学口腔機能修復学講座(歯科補綴学第一講座)細川隆司講師、福岡歯科大学歯科補綴学講座松浦尚志講師、呉市開業の木本知秀博士ならびに本学口腔機能修復学講座(歯科補綴学第一講座)山中威典助手に心より感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、御助言、御協力を頂きました石田秀幸博士をはじめとする開業医の先生方各位および本学口腔機能修復学講座(歯科補綴学第一講座)の方々、特に研究遂行に御助力頂きました、中本哲自博士、正木千尋先生、竹腰利英先生に感謝いたします。最後に、常に私を支えてくれた両親、澄子と妻美紀に感謝致します。

## 文 献

- 1) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H.: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Clin. Periodontol.* **9**, 290-296, 1982.
- 2) Bernstein, A.B., Preisig, E. and Schroeder, H.E.: Formation of a new fibrous attachment to human dental roots. *Cell Tissue Res.* **254**, 659-670, 1988.
- 3) Takata, T.: Oral wound healing concepts in periodontology. *Curr. Opin. Periodontol.*, 119-127, 1994.
- 4) Amar, S. and Chung, K.M.: Clinical implications of cellular biologic advances in periodontal regeneration. *Curr. Opin. Periodontol.*, 128-140, 1994.
- 5) Urabe, M., Hosokawa, R., Chiba, D., Sato, Y. and Akagawa, Y.: Morphogenetic behavior of periodontium on inorganic implant materials: an experimental study of canines. *J. Biomed. Mater. Res.* **49**, 17-24, 2000.
- 6) 高橋 啓: 各種支台材料における結合組織性付着形成に関する実験的研究. 広大歯誌 **31**, 39-54, 1999.
- 7) Ruoslahti, E.: Stretching is good for a cell. *Science* **276**, 1345-1346, 1997.
- 8) Matsuura, M., Herr, Y., Han, K.Y., Lin, W.L., Genco, R.J. and Cho, M.I.: Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J. Periodontol.* **66**, 579-593, 1995.
- 9) 須田立雄: 硬組織とその石灰化. 歯学生化学 第3版, **86**, 1968.
- 10) Butler, W.T.: Dentin matrix proteins. *Eur. J. Oral Sci.* **106**, 204-210, 1998.
- 11) Butler, W.T., Ritchie, H.H. and Bronckers, A.L.: Extracellular matrix proteins of dentine. *Ciba Found. Symp.* **205**, 107-117, 1997.
- 12) Stack, M.V.: The chemical nature of the organic matrix of bone, dentin and enamel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 585-595, 1955.
- 13) Chang, S.R., Chiego, D.Jr. and Clarkson, B.H.: Characterization and identification of a human dentin phosphophoryn. *Calcif. Tissue Int.* **59**, 149-153, 1996.
- 14) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254, 1976.
- 15) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.
- 16) Okamoto, T., Yatsuzuka, N., Tanaka, Y., Kan, M., Yamanaka, T., Sakamoto, A., Takata, T., Akagawa, Y., Sato, G.H., Sato, J.D. and Takada, K.: Growth and differentiation of periodontal ligament-derived

- cells in serum-free defined culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **33**, 302–309, 1997.
- 17) McAllister, B., Narayanan, A.S., Miki, Y. and Page, R.C.: Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J. Periodont. Res.* **25**, 99–105, 1990.
  - 18) Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A. and Cory, J.G.: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer. Commun.* **3**, 207–212, 1991.
  - 19) Tuckwell, D.S., Ayad, S., Grant, M.E., Takigawa, M. and Humphries, M.J.: Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support alpha 2 beta 1 binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel alpha 5 beta 1-fibronectin bridge. *J. Cell Sci.* **107**, 993–1005, 1994.
  - 20) Yamada, K.M. and Kennedy, D.W.: Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J. Cell Biol.* **99**, 29–36, 1984.
  - 21) Green, M.R., Pastewka, J.V. and Peacock, A.C.: Differential staining of phosphoproteins on polyacrylamide gels with a cationic carbocyanine dye. *Anal. Biochem.* **56**, 43–51, 1973.
  - 22) Makihiro, S., Yan, W., Ohno, S., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Okimura, A., Yoshida, E., Noshiro, M., Hamada, T. and Kato, Y.: Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage-specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein (CMP/Matrilin-1), via integrin alpha 1 beta 1. *J. Biol. Chem.* **274**, 11417–11423, 1999.
  - 23) Yamada, K.M., Olden, K. and Pastan, I.: Transformation-sensitive cell surface protein: isolation, characterization, and role in cellular morphology and adhesion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **312**, 256–277, 1978.
  - 24) Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30–33, 1984.
  - 25) Humphries, M.J., Komoriya, A., Akiyama, S.K., Olden, K. and Yamada, K.M.: Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion. *J. Biol. Chem.* **262**, 6886–6892, 1987.
  - 26) Komoriya, A., Green, L.J., Mervic, M., Yamada, S.S., Yamada, K.M. and Humphries, M.J.: The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J. Biol. Chem.* **266**, 15075–15079, 1991.
  - 27) Hautanen, A., Gailit, J., Mann, D.M. and Ruoslahti, E.: Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 1437–1442, 1989.
  - 28) Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., Suzuki, S. and Ruoslahti, E.: Vitronectin — a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Exp. Cell Res.* **160**, 245–258, 1985.
  - 29) Gehlsen, K.R., Argraves, W.S., Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E.: Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides. *J. Cell Biol.* **106**, 925–930, 1988.
  - 30) Plow, E.F., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. and Ginsberg, M.H.: Arginyl-glycyl-aspartic acid sequences and fibrinogen binding to platelets. *Blood* **70**, 110–115, 1987.
  - 31) Oldberg, A., Franzen, A. and Heinegard, D.: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8819–8823, 1986.
  - 32) Schwartz, M.A., Schaller, M.D. and Ginsberg, M.H.: Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 549–599, 1995.
  - 33) Yamada, K.M. and Kennedy, D.W.: Peptide inhibitors of fibronectin, laminin, and other adhesion molecules: Unique and shared features. *J. Cell Physiol.* **130**, 21–28, 1987.
  - 34) Hynes, R.D.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11–25, 1992.
  - 35) Diamond, M.S. and Springer, T.A.: The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol.* **4**, 506–517, 1994.
  - 36) Haas, T.A. and Plow, E.F.: Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 656–662, 1994.
  - 37) Gumbiner, B.M.: Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345–357, 1996.
  - 38) Xia, Y., Gil, S.G. and Carter, W.G.: Anchorage mediated by integrin alpha6beta4 to laminin 5 (epiligrin) regulates tyrosine phosphorylation of a membrane-associated 80-kD protein. *J. Cell Biol.* **132**, 727–740, 1996.
  - 39) Elices, M.J., Urry, L.A. and Hemler, M.E.: Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations. *J. Cell Biol.* **112**, 169–181, 1991.
  - 40) Clark, E.A. and Brugge, J.S.: Integrins and signal transduction pathways: The road taken.

- Science* **268**, 233–239, 1995.
- 41) Schlaepfer, D.D., Hanks, S.T., Hunter, T. and van der Geer, P.: Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786–791, 1994.
  - 42) Nagai, T., Yamakawa, N., Aota, S., Yamada, S.S., Akiyama, S.K., Olden, K. and Yamada, K.M.: Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. *J. Cell Biol.* **114**, 1295–1305, 1991.
  - 43) Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M.T., Spring, J., Gallo, R.L. and Lose, E.J.: Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 365–393, 1992.
  - 44) LeBaron, R.G., Esko, J.D., Woods, A., Johansson, S. and Hook, M.: Adhesion of glycosaminoglycan-deficient chinese hamster ovary cell mutants to fibronectin substrata. *J. Cell Biol.* **106**, 945–952, 1988.
  - 45) Rosenberg, R.D., Shworak, N.W., Liu, J., Schwartz, J.J. and Zhang, L.: Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J. Clin. Invest.* **99**, 2062–2070, 1997.
  - 46) Lindstedt, K.A., Kokkonen, J.O. and Kovanen, P.T.: Regulation of the activity of secreted human lung mast cell tryptase by mast cell proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 617–627, 1998.
  - 47) Craig, A.M., Nemir, M., Mukherjee, B.B., Chambers, A.F. and Denhardt, D.T.: Identification of the major phosphoprotein secreted by many rodent cell lines as 2ar/osteopontin: enhanced expression in H-ras-transformed 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 166–173, 1988.
  - 48) Ignatz, R.A. and Massague, J.: Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell* **51**, 189–197, 1987.
  - 49) Heino, J. and Massague, J.: Transforming growth factor-beta switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J. Biol. Chem.* **264**, 21806–21811, 1989.
  - 50) Lonn, U. and Edstrom, J.E.: Protein synthesis inhibitors and export of ribosomal subunits. *Biochim. Biophys. Acta.* **475**, 677–679, 1977.