

学位論文

歯周靱帯における SPARC の発現制御機構とその役割

学位申請者 藤田 剛

広島大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任；栗原 英見教授)

1999 年度

謝 辞

本研究の御指導および御校閲を賜った本学歯科保存学第二講座 栗原 英見教授に深甚なる感謝の意を表します。また、研究の遂行ならびに本論文の作製において、御指導を頂いた本学口腔生化学講座 加藤 幸夫教授ならびに本学口腔外科学第一講座 岡本 哲治教授に深謝いたします。

また、本研究の遂行、および本論文の作製を終始御指導、御助言頂いた本学歯科保存学第二講座 柴 秀樹助手に深謝いたします。さらに、本研究を進めるに際し多大なる御支援を頂いた本学歯科保存学第二講座関係各位に感謝いたします。

最後に、これまで常に私を支えてくれた両親の導、慶子に心から感謝します。

目次

第1章 序章	1
第2章 Secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC)の歯周靭帯由来線維芽細胞様細胞 (HPLC)に対する作用	
第1節 概要	3
第2節 材料および方法	3
1. HPLC の分離	
2. SPARC の作用についての検討	
1) DNA 合成能	
2) Matrix metalloprotease (MMP)産生	
3) Alkaline phosphatase (ALPase)活性	
4) 細胞数の測定	
第3節 結果	6
1. DNA 合成能	
2. MMP 産生	
3. ALPase 活性	
第4節 考察	10
第3章 SPARC の発現とその制御	
第1節 概要	13
第2節 材料および方法	13
1. 増殖因子, サイトカインおよび細胞外基質(ECM)	
2. HPLC の分離	
3. 細胞培養法	
1) 増殖因子が SPARC 発現に及ぼす影響	
2) HPLC が産生した ECM が SPARC 発現に及ぼす影響	
3) I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンが SPARC 発現に及ぼす影響	
4) 増殖因子による SPARC 発現に及ぼすシクロヘキシミドおよび抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体の影響	
4. SPARC 蛋白の検出	
5. SPARC mRNA の検出	
6. I 型コラーゲンおよびフィブロネクチン量の測定	
7. 細胞数の測定	
第3節 結果	16

1. 増殖因子が SPARC 発現に及ぼす影響
2. HPLC が産生した ECM が SPARC 発現に及ぼす影響
3. ECM 中に含まれる I 型コラーゲンおよびフィブロネクチン量
4. I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンが SPARC 発現に及ぼす影響
5. TGF- β による SPARC 発現に及ぼすシクロヘキシミドおよび抗インテグリン α 5 抗体の影響

第 4 節 考察 27

第 4 章 総括 30

参考文献 31

第 1 章 序 章

歯周靱帯は歯の支持, 歯周組織への栄養供給, 外力の感知と緩衝などの機能を有する。歯周疾患に罹患すると感染の拡大によって歯周靱帯は破壊され, 感染とそれに対する炎症の場となる。近年, 歯周疾患と全身性疾患の発症との関連が指摘されている。歯周疾患などで失われた歯周組織を再生させることは, 口腔機能の維持のみでなく, 全身性疾患を予防するうえで重要性が増している。

歯周組織の再生は, 歯周靱帯に存在する細胞の移動, 増殖, 分化といった細胞機能に依存している。一般に細胞の機能は, 増殖因子やサイトカインなどの液性因子, 細胞外基質 (ECM) および細胞との細胞接着によって制御されている。さらに液性因子と ECM との相互作用による細胞機能制御機構が知られている。

Secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC)/オステオネクチン/BM-40 は, 分子量 38-43 kDa の非コラーゲン性の糖タンパク質である (1-4)。SPARC は I 型コラーゲンやカルシウムイオンと高い結合能を持ち, 石灰化を調節することが報告されている (1, 5, 6)。また, SPARC は軟組織由来の細胞において, 細胞の伸展, 増殖, ECM の合成および分解に影響する (7-15)。さらに SPARC は血管新生作用を有する (16-18)。一方, *in vivo* の研究で, 組織修復時に, 線維芽細胞による SPARC の発現が亢進することが観察されている (19)。これらの知見から SPARC は, 組織修復およびリモデリングに重要な役割を担っていると考えられる。SPARC は歯周靱帯にも発現していることから (20-22), 歯周靱帯の修復およびリモデリングの重要な調節因子として機能している可能性がある。しかしながら, 歯周靱帯における SPARC の役割は不明である。

SPARC の発現制御に関するこれまでの報告は, ヒト歯肉線維芽細胞, ラット前骨芽細胞, ヒト皮膚線維芽細胞, ヒト歯髄細胞, ウサギ

関節軟骨細胞などの細胞培養系において， transforming growth factor- β (TGF- β), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β)などの液性因子による調節が明らかにされている (23-28)。しかしながら，歯周靭帯由来細胞における SPARC 発現制御機構は明らかでない。

I型コラーゲンとフィブロネクチンは ECM の主要構成成分である。さらに歯周組織修復時に， SPARC と一致して発現する。したがって，I型コラーゲンとフィブロネクチンは，SPARC 発現の調節に関わる可能性がある。

歯周組織修復機序を解明するためには，歯周靭帯における SPARC の役割および発現の制御機構を明らかにする必要がある。そこで本研究では，歯周靭帯における SPARC の役割および発現制御機構を明らかにすることを目的に，ヒト歯周靭帯由来線維芽細胞様細胞 (HPLC) 培養系を用いて，① HPLC の細胞機能に及ぼす SPARC の作用と ② 各種増殖因子と ECM による SPARC 発現の調節機構について検討した。

第 2 章 SPARC の HPLC に対する作用

第 1 節 概要

SPARC は細胞の移動, 増殖, ECM の合成および分解, さらに石灰化などに影響することが報告されている。また, SPARC は歯周靭帯に強く発現していることが知られている。したがって, 歯周靭帯における SPARC の役割を明らかにするためには, 初めに SPARC が HPLC に対してどのような作用を示すのかを解明する必要がある。本研究では, SPARC が, HPLC の DNA 合成能, MMP 産生, および ALPase 活性に及ぼす影響について検討した。

第 2 節 材料および方法

1. HPLC の分離

HPLC の分離は移植片培養法によって行った。矯正治療の必要から便宜的に抜去された健全なヒト小臼歯から, 歯周靭帯周囲の他の結合組織からの細胞の混入を防ぐために, 歯頸部, 根尖部を除く歯根中央部の健康な歯周靭帯をメスを用いて剥離した。剥離した歯周靭帯を細切し, 直径 60mm の細胞培養用シャーレ (CORNING, NY) に貼り付けた。培地は 10% 牛胎児血清 (FBS, GIBCO, Buffalo, NY), 100 units/ml の penicillin (明治製菓, 東京), 100 μ g/ml の streptomycin (明治製菓), 1 μ g/ml の fungizone (GIBCO) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 日水製薬, 東京) (培地 A) を 5ml 加えた。培養は 37°C, 5% CO₂ 気相条件で行った。歯周靭帯組織片から遊出・増殖してきた HPLC がコンフルエントに達した時点で, 0.05% トリプシンおよび 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む Dulbecco's PBS(-) (PBS(-), 日水製薬, 東京) で細胞を分散した。細胞を 800g で 10 分間遠心後, ペレットを回収し, 10 cm シャーレに 8×10^5 個の HPLC を播種した。以下の実験には, 6-8

代の継代培養細胞を用いた。

2. SPARC の作用についての検討

1) DNA 合成能

DNA 合成能は [^3H -methyl]-thymidine の細胞への取り込みを指標に評価した。培養系あたり 1×10^4 個の HPLC を I 型コラーゲンをコーティングしたプレート (SUMILON セルタイト C-1, 48 穴, 住友ベークライト, 東京) に播種し, 培地 A に $50 \mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸を添加した培地 (培地 B) で 10 日間培養した。その後, FBS の濃度を 2% に下げて 24 時間培養した。さらに各種濃度 (0, 1, 5, $10 \mu\text{g/ml}$) のヒト血小板由来 SPARC (Haematologic Technologies, Essex Jct., VT) を添加した後, 24 時間培養した。培養終了 3 時間前に培養系あたり $0.8 \mu\text{Ci}$ の [^3H -methyl]-thymidine を添加した。培養終了後, HPLC をリン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄し, 氷冷した 10% trichloroacetic acid で 5 分間 2 回処理した。さらに, 氷冷したエタノール・エーテル混合液 (混合比 3:1) を添加し, 速やかにその溶液を除去し, 細胞を乾燥させた。引き続き, 1N の NaOH を $200 \mu\text{l}$ 添加し 30 分間常温に静置して細胞を溶解し, さらに 1N の HCl $40 \mu\text{l}$ を加えて試料を中和した。続いて, $240 \mu\text{l}$ の試料に 3ml の液体シンチレーション溶液 (アマシャム ファルマシア バイオテック, 東京) を混合し, 液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

2) MMP 産生

MMP 産生はウエスタンブロット法によって分析した。1) と同様に, 1×10^4 個の HPLC を 48 穴セルタイト C-1 プレートに播種し, 培地 B で 20 日間培養した。SPARC は培養終了の 96, 48, 24 時間前から作用させた。培養終了の 24 時間前に, 血清非添加の DMEM で HPLC を 3 回洗浄した後, $50 \mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸を含む DMEM (培地 C) で 24 時間培養した。培養終了後, 培養上清を回収し, -30°C で保存

した。試料は非還元条件下で Laemmli のサンプル処理液によって3分間煮沸処理後、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。続いて、ゲルに展開したタンパク質を poly vinylidene difluoride 膜 (PVDF 膜, Millipore, Bedford., MA) に電氣的に転写し (29), その PVDF 膜 を 5% スキムミルク含有 PBS で室温で2時間ブロッキングした。次いで、マウス抗ウシ MMP-1, MMP-2, MMP-9 モノクロナール抗体 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 富士薬品工業, 富山) と 4 $^{\circ}\text{C}$, 15 時間反応させた後、0.05% Tween20 を含有した PBS で膜を洗浄し、 ^{125}I 標識抗マウス IgG 抗体 (ヒツジ, Fab') (アマシャム ファルマシア バイオテック) と室温で3時間反応させ、オートラジオグラフィーによって放射活性を検出した。MMP 産生量は、各バンドの放射活性を BAS2000 イメージアナライザー (Fujix, 東京) を用いて定量化して表した。

3) ALPase 活性

HPLC の ALPase 活性は Bessey-Lowry 法 (30) に基づいて測定した。2) と同様に 20 日間培養を行った後、HPLC を PBS (-) で 3 回洗浄し、2.5 mM の MgCl_2 を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) を 400 μl 加え、続いて氷冷下で超音波処理を行い、試料を調整した。測定には p-ニトロフェニルリン酸を基質とする Bessey-Lowry 法を改良した ALPase 測定キット (和光純薬, 大阪) を用いた。すなわち、試料 25 μl に 125 μl の基質緩衝液 (0.1M 炭酸緩衝液 pH 9.8, 2.0mM MgCl_2 , 6.7 mM p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$, 30 分インキュベートし、125 μl の 0.2 N NaOH を加えて反応を停止後、波長 405 nm における吸光度を測定した。ALPase 活性は、1 分間に生成される p-ニトロフェノール 1nmol を 1unit として算出した。

4) 細胞数の測定

細胞数は、各種条件で細胞を培養した後、コールターカウンター (Coulter, Bedford, England) で計測した。すなわち 48 穴マルチウエルプレート中の細胞を 5 mg/ml の細胞分散用 collagenase (クロストリジウム属由来, 150-300 units/mg, 和光純薬) で

37℃, 30分処理した。続いて, 0.05%トリプシンおよび0.02%EDTAを含むPBS(-)で37℃, 3分間処理して細胞を分散した後に, 細胞を回収し, コールターカウンターを用いて細胞数を計測した。

第3節 結果

1. DNA合成能

SPARCは1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で, 濃度依存的にHPLCのDNA合成能を促進した(図1)。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のSPARCは, DNA合成をコントロールと比較して2.2倍促進させた。

2. MMP産生

HPLCの培養系で, MMP-2の産生は確認できたが, MMP-1およびMMP-9は検出できなかった(データを示さず)。

SPARCは1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で濃度依存的にMMP-2の産生を増加させた(図2)。HPLCの細胞数で換算すると, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のSPARCはMMP-2の産生をコントロールと比較して2.8倍増加させた。

3. ALPase活性

SPARCは, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で, HPLCのALPase活性にはほとんど影響しなかった(図3)。

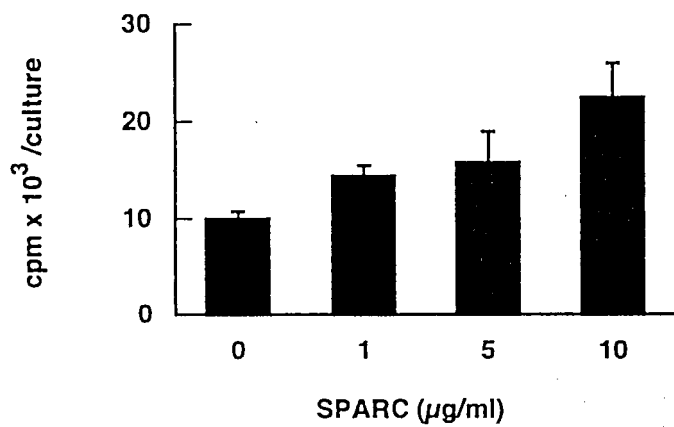
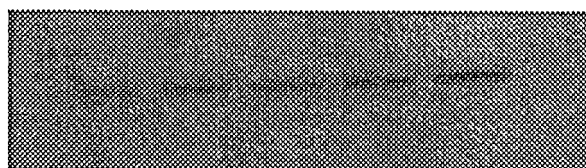


図1. HPLCのDNA合成に及ぼすSPARCの影響

DNA合成能は³H-methyl-thymidineの細胞への取り込みを測定することによって評価した。各値は3つの培養系の平均値±S.D.を示す。

A: ウェスタンブロット像



B: 放射活性

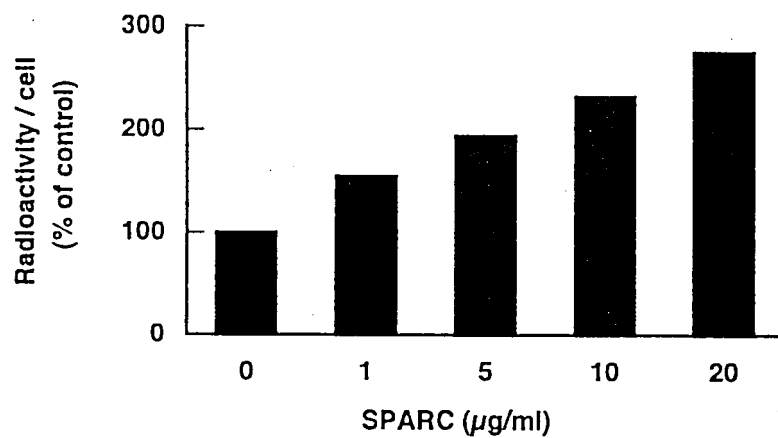


図2. HPLCのMMP-2産生に及ぼすSPARCの影響

A: 培養上清中のMMP-2を抗MMP-2抗体を用いてウェスタンブロット分析した。

B: 細胞あたりのMMP-2産生量をコントロールを100%としてグラフにした。

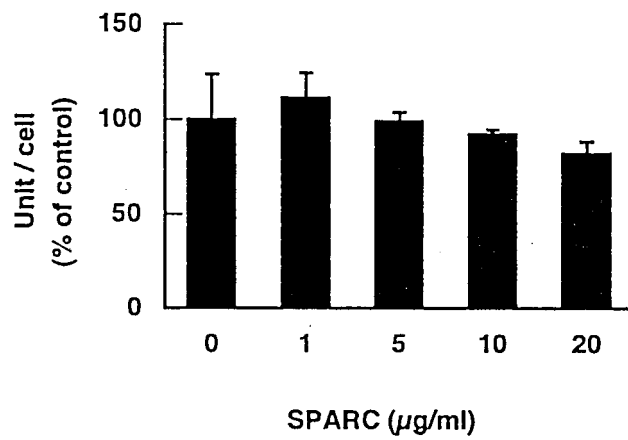


図3. HPLCのALPase活性に及ぼすSPARCの影響

SPARC非添加時のALPase活性を100%としてグラフにした。
各値は3つの培養系の平均値±S.D.を示す。

第 4 節 考察

SPARC は組織の発生・修復・リモデリングおよび腫瘍形成などに関わると考えられている糖タンパク質であり(18, 31), 代謝活性が活発な組織に存在する。

一般に組織修復の過程は, まず損傷部に血小板の凝集が起こり, 増殖因子の放出, マクロファージの遊走が起こる。続いて, 血管内皮細胞や線維芽細胞の移動および増殖, また血管新生, 基質の分解・合成などが起こり, 肉芽が形成される。肉芽組織には多数の新生毛細血管が存在する。その後, 肉芽組織は吸収され, 新生組織に置き換わる(32)。ラットの皮膚組織修復モデルにおいて, 肉芽形成時から SPARC および SPARC mRNA の発現が確認されている(19)。さらにビーグル犬およびラットの歯周組織修復過程において, SPARC は肉芽形成早期および再生後の歯周靭帯に発現していることが明らかにされている(33, 34)。このように, SPARC は歯周靭帯のリモデリングおよび再生に重要な役割を担っていると考えられるが, HPLC に対する作用は不明であり, HPLC の機能に及ぼす SPARC の影響を解明することは, 歯周靭帯の再生メカニズムを明らかにする上で極めて重要である。

SPARC の細胞増殖に対する作用は種々の報告がある。SPARC はウシ大動脈由来血管内皮細胞の増殖を抑制したが, ヒト皮膚由来およびウシ靭帯由来線維芽細胞の DNA 合成を促進した(11, 18)。本研究において, SPARC は HPLC の DNA 合成を促進した。細胞種によって, SPARC の細胞増殖に対する応答に違いがあることから, さらに研究が必要であると考えられる。

MMP は組織の代謝, 再生に不可欠な ECM を分解する酵素群である。SPARC はウサギ滑膜由来線維芽細胞, ヒト由来の単球およびヒト由来のガン細胞において, MMP 産生を促進した(12, 35, 36)。

MMPの中でもMMP-2は、線維芽細胞や血管内皮細胞などから産生され、創傷間質のECMを分解し、組織修復に重要な役割を担っている(37, 38)。一方で、HPLCはMMP-1, MMP-2, MMP-9を産生していることが報告されている(39)。本研究において、SPARCはHPLCのMMP-2産生を増加させた。SPARCはHPLCの増殖を促進し、さらにHPLCによるMMPの産生を促進したことから、SPARCは歯周靭帯の修復に重要な役割を担っていることが示唆された。さらにSPARCは血管新生を促進することが知られているので(16-18)、歯周靭帯の修復において、SPARCは肉芽形成時の血管新生にも関わっている可能性がある。

SPARCは*in vivo*においてMMPやセリンプロテアーゼなどの蛋白分解酵素によってペプチドに分解される。分解されたSPARCのペプチド断片は、細胞増殖に影響し、また血管新生作用を有することから(11, 17)、今後、HPLCの機能に及ぼすSPARCのペプチド断片の作用についても検討する必要がある。

SPARCのノックアウトマウスを用いた解析から、骨の発育は影響をうけないが、骨の再生にはSPARCが関与すると示唆されている(40)。一方、*in vitro*においてSPARCは石灰化を促進あるいは抑制する(1, 5, 6)。SPARCは骨組織中に軟組織の50倍の濃度で存在する(41)。ビーグル犬を用いた歯周組織修復モデルでは、SPARCは新生されたセメント質や骨に存在する(33)。またラットを用いた実験的歯牙移動において、SPARC mRNAは添加側の骨組織に強く発現した(42)。これらの観察から、SPARCはセメント質および骨の再生あるいは石灰化を制御している可能性がある。歯周靭帯は多様な細胞で構成されており、これらの細胞は歯周靭帯の再生のみに関わるのではなく、骨芽細胞やセメント芽細胞などに分化して、歯槽骨やセメント質の再生にも関わっている(43-45)。本研究ではHPLCの培養系において、硬組織形成細胞の指標であるALPase活性に及ぼすSPARCの作用を検討したが、SPARCはALPase活性

にはほとんど影響しなかった。SPARCはHPLCの分化には直接的には関与しないのかもしれない。

SPARCはHPLCの増殖あるいはMMPの産生を促進することによって、歯周組織のリモデリングや再生において重要な役割を担っていることが示唆された。

第3章 SPARCの発現とその制御

第1節 概要

SPARCの発現は、増殖因子やサイトカインなどの液性因子による調節について多く報告がある。一方、近年ECMあるいはECMと増殖因子との相互作用による細胞機能の調節が注目されている。I型コラーゲンとフィブロネクチンはECMの主要構成成分であり、細胞の接着、移動、分化などの細胞機能を制御する。歯周靱帯においても、I型コラーゲンとフィブロネクチンはECMの主要な構成成分である。また歯周組織修復過程において、SPARCの発現する時期はI型コラーゲンとフィブロネクチンの発現時期と一致している。したがって歯周靱帯におけるSPARCの発現制御機構を明らかにするには、増殖因子とI型コラーゲンあるいはフィブロネクチンの相互作用による制御について検討する必要がある。

第2節 材料および方法

1. 増殖因子、サイトカインおよびECM

増殖因子およびサイトカインとして、ヒトTGF- β 1、ヒトPDGF-AB、ウシFGF-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN)、ヒトEGF(和光純薬)、ヒトTNF- α 、ヒトIL-1 β (R&D Systems)を用いた。ECMとして、ヒト血漿性フィブロネクチン(岩城硝子、千葉)、ヒト細胞性フィブロネクチン(カルピオケム、LaJolla, CA)、ウシ真皮由来I型コラーゲン(高研、東京)を用いた。

2. HPLCの分離

第2章に記載した方法で行った。

3. 細胞培養法

1) 増殖因子がSPARC発現に及ぼす影響

培養系あたり 1×10^4 個のHPLCを48穴のセルタイトC-1プレートに、

あるいは 3.5×10^5 個の HPLC を直径 60 mm のシャーレ (SUMILON セルタイト C-1 シャーレ, 住友ベークライト) に播種し, 培地 B を用いて 20 日間培養した。培養 10 日目から TGF- β (0-5 ng/ml), EGF (30 ng/ml), FGF-2 (3 ng/ml), PDGF (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) を添加した。培地交換は 2 日おきに行い, 各種増殖因子あるいはサイトカインも同時に添加した。また培養終了の 24 時間前には, 培地 C に交換して, さらに増殖因子あるいはサイトカインを添加した。

2) HPLC が産生した ECM が SPARC 発現に及ぼす影響

培養系あたり 1×10^4 個の HPLC を 48 穴のセルタイト C-1 プレートあるいは 3.5×10^5 個の HPLC を直径 60 mm のセルタイト C-1 シャーレに播種し, 培地 B を用いて培養した。培養 10 日目から, 増殖因子またはサイトカインを 10 日間作用させた。培養 20 日目に 0.5% デオキシコール酸ナトリウムにて細胞を溶解除去後, プレートを PBS (-) で 3 回洗浄し, ECM を得た。得られた ECM 上に再度, 培養系あたり 1×10^4 個 (48 穴プレート) あるいは 3.5×10^5 個 (60 mm シャーレ) の HPLC を播種し, 培地 A で 14 日間培養した。培地交換は 2 日おきに行った。なお, 培養終了前の 24 時間は培地 C で培養した。

3) I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンが SPARC 発現に及ぼす影響

0 から 5 μ g/ml の I 型コラーゲン, 血漿性フィブロネクチンまたは細胞性フィブロネクチン溶液と, 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートすることによって, プレート (SUMIRON マルチウエルプレート, 48 穴, 住友ベークライト) をコーティングした。コーティング後, プレートを PBS (-) で 3 回洗浄し, 1×10^4 個の HPLC を播種し, 培地 A を用いて 14 日間培養を行った。培地交換は 2 日おきに行った。なお, 培養終了前の 24 時間は培地 C で培養した。

4) 増殖因子による SPARC 発現に及ぼすシクロヘキシミドおよび抗ヒトインテグリン $\alpha 5$ 抗体の影響

3.5×10^5 個の HPLC を直径 60 mm のセルタイト C-1 シャーレに播種し, 培地 B を用いて 12 日間培養した。培養終了の 0, 1, 3, 6, 12 あるいは

は 24 時間前に増殖因子を作用させた。シクロヘキシミド (CyX, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, シグマ, St.Louis, MO), マウス IgG 抗ヒトインテグリン $\alpha 5$ 抗体 (抗 $\alpha 5$ 抗体, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Chemicon International, Temecula, CA) あるいはマウス IgG (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Chemicon International) は, 増殖因子を作用させる 30 分前に培養系に添加した。

4. SPARC 蛋白の検出

SPARC 蛋白の検出はウエスタンブロット法によって分析した。すなわち, HPLC の培養終了後, 48 穴マルチウエルプレートから培養上清を回収し, -30°C で保存した。試料は非還元条件下で Laemmli のサンプル処理液によって 3 分間煮沸処理後, 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて, 電気泳動を行った。続いて, ゲルに展開したタンパク質を PVDF 膜に電氣的に転写し, その PVDF 膜を 5% スキムミルク含有 PBS で室温で 2 時間ブロッキングした。次いで, マウス抗ウシ SPARC モノクロナール抗体 (ON1-1, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 宝酒造, 東京) を 4°C , 15 時間反応させた後, 0.05% Tween20 を含有した PBS で膜を洗浄し, ^{125}I 標識抗マウス IgG 抗体 (ヒツジ, Fab') と室温で 3 時間反応し, オートラジオグラフィーによって SPARC を検出した。SPARC 産生量は, 各バンドの放射活性を BAS2000 イメージアナライザーを用いて定量化して表した。

5. SPARC mRNA の検出

SPARC mRNA の発現は, ノーザンブロット法を用いて検討した。60mm シャーレで培養した HPLC を PBS (-) で洗浄後, ISOGEN (ニッポンジーン, 東京) を用いて総 RNA を抽出し, サンプルとした。ノーザンブロット分析は, Maniatis ら (46) と酒井 (47) の方法に準じて行った。すなわち, 抽出した 5 μg の RNA を微量のエチジウムブロマイドと 0.66M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルで電気泳動を行った。続いて, ゲルからナイロンメンブレン (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) へ転写し (48), 紫外線照射による固定を行った。次にメンブレンをハイブリパック内に挿入し, 5ml のハイブリダイゼーション溶液 (6XSSC, 0.5% SDS, 5Xdenhardt's 溶液 0.01M EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性したサケ精子 DNA) を添加し, 68°C でプレハイブリダイゼーションを 1 時間行った。human SPARC cDNA (900 bp) (28)

とヒトグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (G3PGH) cDNA (750 bp) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)をオリゴラベリングキット (アマシャム ファルマシア バイオテック)を用いて, [α - 32 P] dCTP (NEN Research Products)で標識してプローブとした。さらに,ハイブリダイゼーション溶液を新しい液に交換した後,ラベルしたプローブを添加し, 68℃, 一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後, メンブレンを 2XSSC, 0.5% SDS 溶液にて室温で3回洗浄後, 0.5XSSC, 0.5% SDS 溶液で 68℃, 60分, 最終洗浄を行い, オートラジオグラフィーによって SPARC mRNA を検出した。また SPARC mRNA 量は, 各バンドの放射活性を BAS2000 イメージアナライザーを用いて定量化して表した。

6. I型コラーゲンおよびフィブロネクチン量の測定

デオキシコール酸ナトリウムで細胞を溶解除去した後, 得られた ECM を氷冷下で超音波処理 (30 秒間, 2回)を行い, その試料とした。I型コラーゲン量の測定には, Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit (宝酒造)を用いた。フィブロネクチン量は, ヒトフィブロネクチン ELISA キット (Biomedical Technologies, Stoughton, MA)を用いて測定した。

7. 細胞数の測定

48 穴マルチウエルプレート中の細胞を 5 mg/ml の細胞分散用 collagenase で 37℃, 30 分処理した。続いて, 0.05% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含む PBS (-)で 37℃, 3 分間処理して細胞を分散した後に, 細胞を回収し, コールターカウンターを用いて細胞数を計測した。

第3節 結果

1. 増殖因子が SPARC 発現に及ぼす影響

TGF- β (5ng/ml)は, SPARC の産生量を約 10 倍増加させた (図 4-A, B)。一方, EGF (30 ng/ml), FGF-2 (3 ng/ml), PDGF (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml)

は SPARC 産生を抑制した (図 4-A, B)。また TGF- β は SPARC 産生と同様に, SPARC mRNA 量も増加させた (図 4-C, D)。しかし SPARC mRNA 発現に及ぼす TGF- β の影響は, SPARC タンパク質に及ぼす影響ほど大きくなかった。一方 EGF, FGF-2, PDGF, TNF- α , IL-1 β は, SPARC mRNA レベルをタンパク質レベルと同様に減少させた (図 4-C, D)。TGF- β は濃度依存的に SPARC 量を増加させた (図 5-A, B)。その効果は 0.1 ng/ml から認められ, 3-5 ng/ml で最大に達した (図 5-A, B)。また TGF- β は, タンパク質レベルと同様に SPARC mRNA の発現を濃度依存的に促進した (図 5-C, D)。

2. HPLC が産生した ECM が SPARC 発現に及ぼす影響

SPARC 発現量を著しく増加させた TGF- β と, 最も強力に抑制した IL-1 β を代表として, ECM が SPARC 発現に及ぼす影響を調べた。

TGF- β (5ng/ml)存在下で HPLC が産生した ECM は, SPARC の産生量を約 2.3 倍増加させた (図 6-A, B)。一方, IL-1 β (10ng/ml)存在下で HPLC が産生した ECM は SPARC の産生を抑制した (図 6-A, B)。TGF- β 存在下で HPLC が産生した ECM は, SPARC と同様, SPARC mRNA の発現も促進した (図 6-C, D)。一方, IL-1 β 存在下で HPLC が産生した ECM は SPARC mRNA の発現量を僅かに増加させた (図 6-C, D)。

0-1 ng/ml の TGF- β 存在下で HPLC が産生した ECM は SPARC の産生に影響を及ぼさなかった (図 7)。一方, 3 ng/ml 以上の濃度の TGF- β 存在下で HPLC が産生した ECM は SPARC 産生を促進した (図 7)。

3. ECM 中に含まれる I 型コラーゲンおよびフィブロネクチン量

ECM 中に含まれる I 型コラーゲン量は TGF- β の濃度に依存して増加した (図 8-A)。その効果は TGF- β の濃度 0.3 ng/ml で出現し, 3-5 ng/ml で最大に達した。一方, IL-1 β を作用させた ECM 中のコラーゲン量は減少した (図 8-A)。

ECM 中に含まれるフィブロネクチン量は, 1 ng/ml 以上の TGF- β 存在下では, 濃度に依存して増加するのに対し, IL-1 β を作用させた ECM 中のフィブロネクチン量は減少した (図 8-B)。

4. I型コラーゲンおよびフィブロネクチンが SPARC 発現に及ぼす影響

I型コラーゲンを0から5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でコーティングしたプレート上では、HPLCによるSPARCの産生はほとんど影響を受けなかった(図9-A, B)。一方、血漿性および細胞性フィブロネクチンでコーティングしたプレート上では、HPLCによるSPARCの産生量は増加した(図9-C, D)。血漿性フィブロネクチンのSPARC産生の増強効果は1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で最大に達したが、細胞性フィブロネクチンでは0.1 $\mu\text{g/ml}$ で最大に達した。

5. TGF- β による SPARC 発現に及ぼすシクロヘキシミドおよび抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体の影響

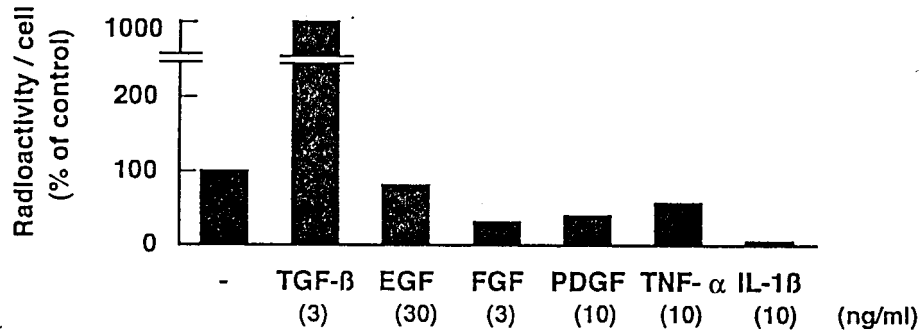
初めに、シクロヘキシミドおよび抗 $\alpha 5$ 抗体を作用させる時期を決定するため、TGF- β の作用時間がSPARC mRNA発現に及ぼす影響について検討した。TGF- β によるSPARC mRNA量の増加は、TGF- β 添加後3時間で認められ、12時間後に最大に達した(図10-A, B)。

TGF- β によるSPARC mRNA発現に及ぼすシクロヘキシミドまたは抗 $\alpha 5$ 抗体の影響はTGF- β 添加後12時間目で検討した。シクロヘキシミドは、TGF- β によるHPLCのSPARC mRNAレベルの上昇を著しく減少させるとともに、TGF- β 非存在下のSPARC mRNAレベルも低下させた(図11-A, B)。一方、抗 $\alpha 5$ 抗体は、TGF- β によって発現誘導されたSPARC mRNA量を減少させたが、TGF- β 非存在下のSPARC mRNA発現には、ほとんど影響を与えなかった(図11-A, B)。

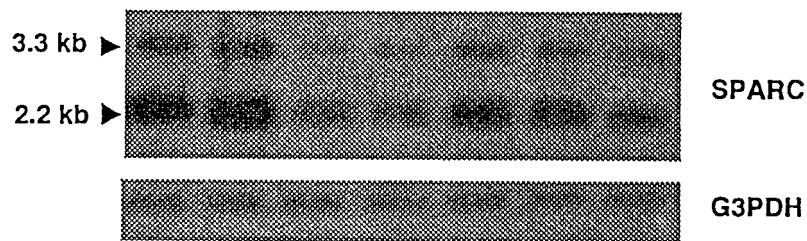
A: ウェスタンブロット像



B: 放射活性



C: ノーザンブロット像



D: 放射活性

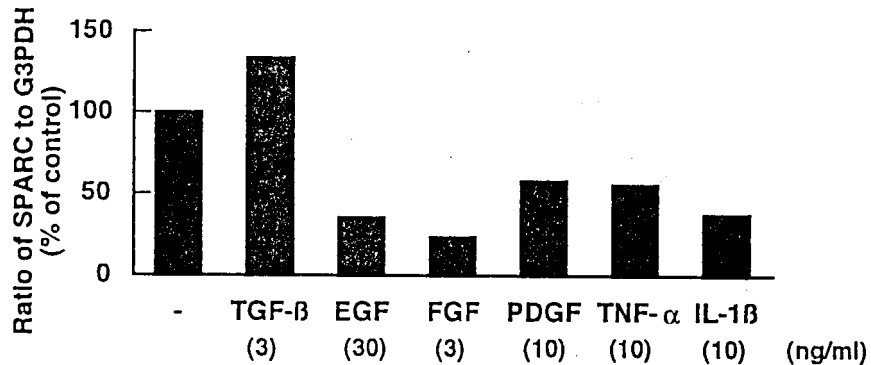


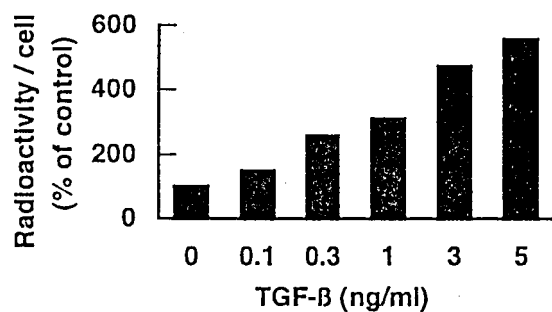
図4. HPLCのSPARC発現に及ぼす増殖因子あるいはサイトカインの影響

- A: 培養上清中のSPARCを抗SPARC抗体を用いてウェスタンブロット分析した。
- B: 細胞あたりのSPARC産生量をコントロールを100%としてグラフにした。
- C: SPARC mRNAおよびG3PDH mRNAの発現をそれぞれのcDNAプローブを用いてノーザンブロット分析した。
- D: G3PDH mRNA量に対するSPARC mRNA量をコントロールを100%としてグラフにした。

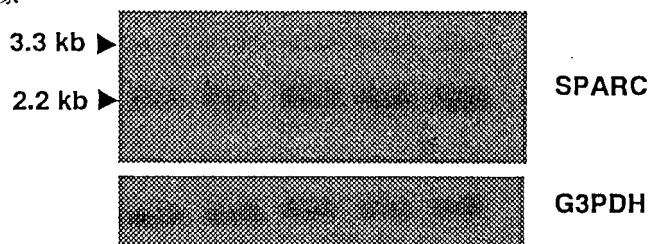
A: ウェスタンブロット像



B: 放射活性



C: ノーザンブロット像



D: 放射活性

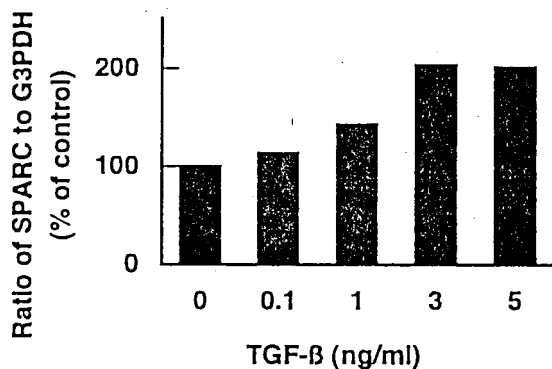
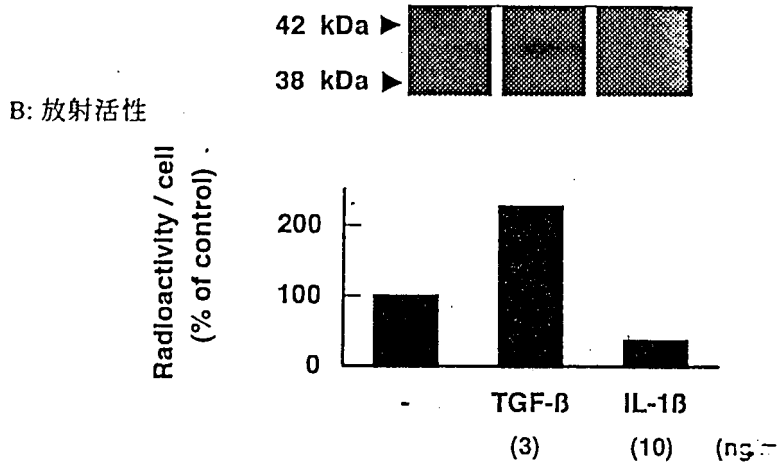


図5. HPLCのSPARC発現に及ぼす各種濃度のTGF-βの影響

- A: 培養上清中のSPARCを抗SPARC抗体を用いてウェスタンブロット分析した。
- B: 細胞あたりのSPARC産生量をコントロールを100%としてグラフにした。
- C: SPARC mRNAおよびG3PDH mRNAの発現をそれぞれのcDNAプローブを用いてノーザンブロット分析した。
- D: G3PDH mRNA量に対するSPARC mRNA量をコントロールを100%としてグラフにした。

A: ウェスタンブロット像



C: ノーザンブロット像

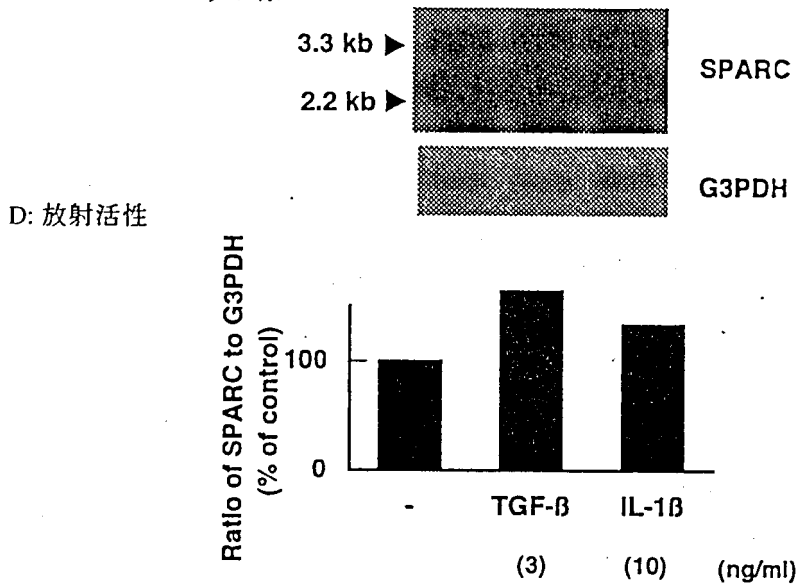
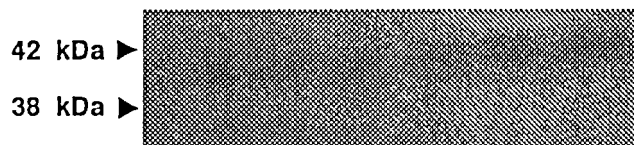


図6. TGF-βまたはIL-1β存在下で産生されたECMがHPLCのSPARC発現に及ぼす影響

- A: 培養上清中のSPARCを抗SPARC抗体を用いてウェスタンブロット分析した。
- B: 細胞あたりのSPARC産生量をコントロールを100%としてグラフにした。
- C: SPARC mRNAおよびG3PDH mRNAの発現をそれぞれのcDNAプローブを用いてノーザンブロット分析した。
- D: G3PDH mRNA量に対するSPARC mRNA量をコントロールを100%としてグラフにした。

A: ウェスタンブロット像



B: 放射活性

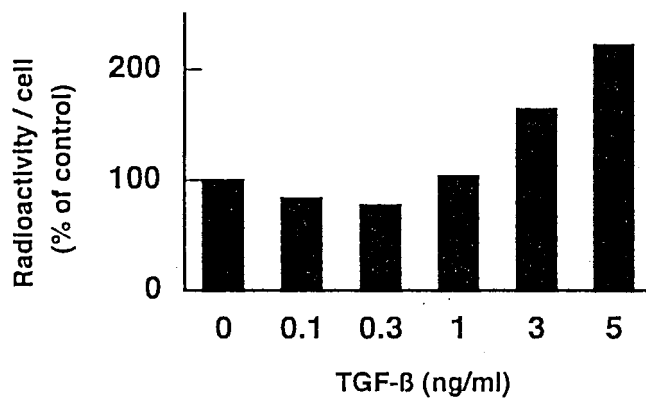


図7. 各種濃度のTGF-B存在下で産生されたECMがHPLCのSPARC産生に及ぼす影響

A: 培養上清中のSPARCを抗SPARC抗体を用いてウェスタンブロット分析した。

B: 細胞あたりのSPARC産生量をコントロールを100%としてグラフにした。

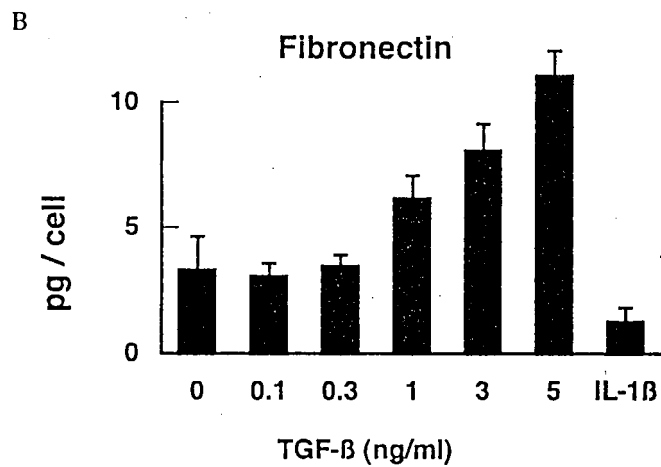
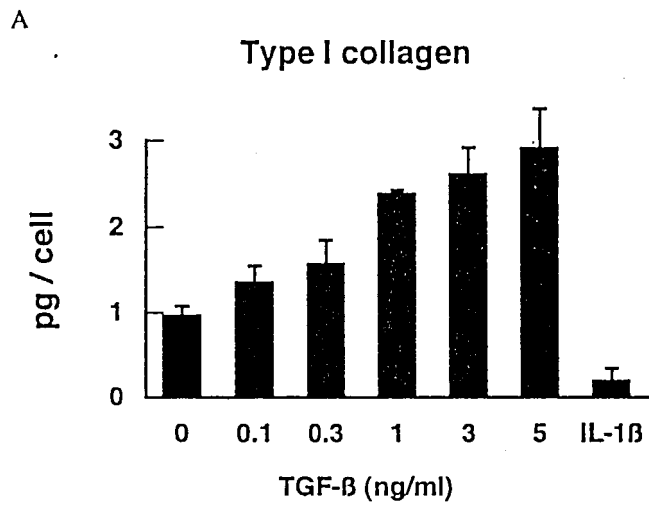
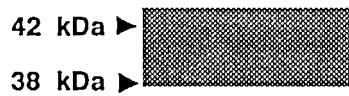


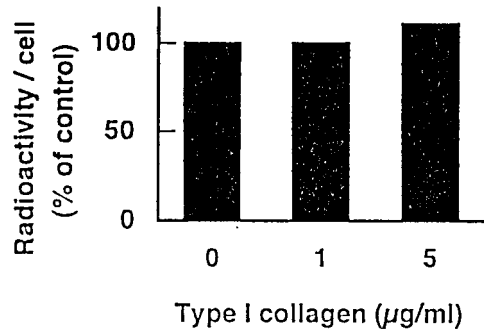
図8. HPLC培養系において、TGF-βまたはIL-1β存在下で産生されたECM中に含まれるI型コラーゲンおよびフィブロネクチン量

I型コラーゲン(A)およびフィブロネクチン(B)量はELISAを用いて測定した。各値は3つの培養系の平均値±S.D.を示す。

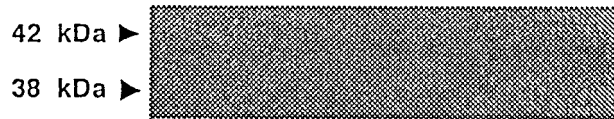
A: ウェスタンブロット像



B: 放射活性



C: ウェスタンブロット像



D: 放射活性

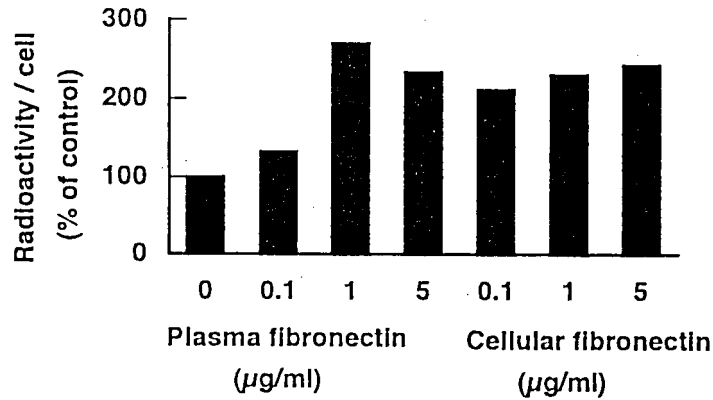
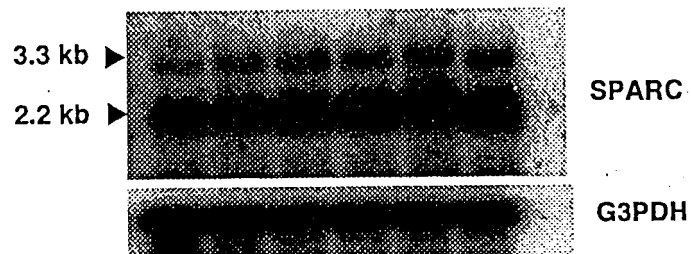


図9. HPLCのSPARC産生に及ぼすI型コラーゲンおよびフィブロネクチンの影響

- A: 培養上清中のSPARCを抗SPARC抗体を用いてウェスタンブロット分析した。
- B: 細胞あたりのSPARC産生量をコントロールを100%としてグラフにした。
- C: 培養上清中のSPARCを抗SPARC抗体を用いてウェスタンブロット分析した。
- D: 細胞あたりのSPARC産生量をコントロールを100%としてグラフにした。

A: ノーザンプロット像



B: 放射活性

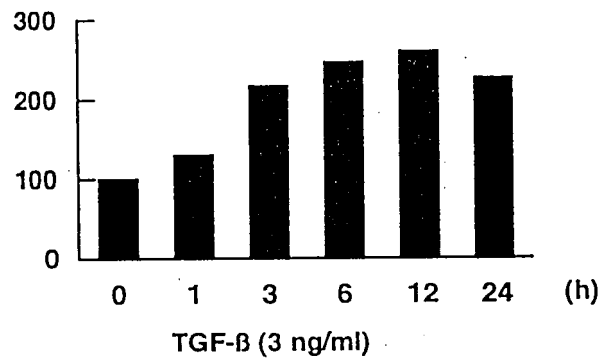
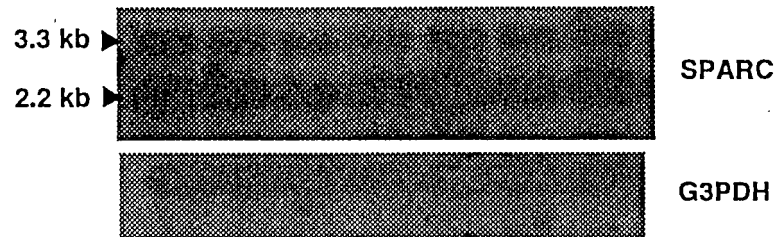


図10. TGF-βの作用時間とHPLCのSPARC mRNA発現量

A: SPARC mRNAおよびG3PDH mRNAの発現をそれぞれのcDNAプローブを用いてノーザンプロット分析した。

B: G3PDH mRNA量に対するSPARC mRNA量をコントロールを100%としてグラフにした。

A: ノーザンプロット像



B: 放射活性

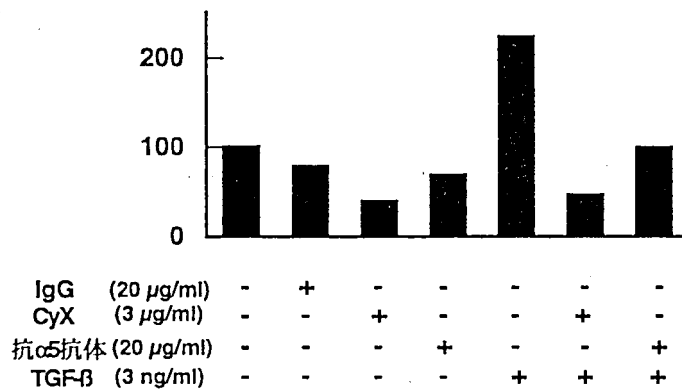


図11. TGF-βによるSPARC mRNA 発現に及ぼすシクロヘキシミドと抗α5抗体の影響

A: SPARC mRNAおよびG3PDH mRNAの発現をそれぞれのcDNAプローブを用いてノーザンプロット分析した。

B: G3PDH mRNA 量に対するSPARC mRNA量をコントロールを100%としてグラフにした。

第4節 考察

歯周靭帯に存在する細胞が SPARC を産生していることは、*in vivo* および *in vitro* の研究から明らかにされている (20-22)。しかしながら、歯周靭帯由来細胞の SPARC 発現制御機構については明らかにされていない。これまでに、増殖因子やサイトカインが種々の細胞における SPARC の発現に及ぼす影響が報告されている。例えば、ヒトの歯肉線維芽細胞やラット由来骨芽細胞、皮膚線維芽細胞、ウサギ由来軟骨細胞、ヒト歯髄細胞において、TGF- β は SPARC の発現をタンパクおよび mRNA レベルで増加させる (23-25, 27, 28)。一方、EGF, FGF-2, PDGF, TNF- α , IL-1 β は、ウサギ軟骨細胞やヒト歯髄細胞の SPARC 発現を抑制する (27, 28)。本研究の HPLC 培養系において、TGF- β は SPARC の発現を促進したが、EGF, FGF-2, PDGF, TNF- α , IL-1 β は SPARC の産生を抑制した。これらの結果はこれまでに報告されている骨芽細胞や歯髄細胞における作用と一致する。また、*in vivo* において、TGF- β と SPARC はともに組織修復時に多く発現していることが知られていることから、TGF- β は歯周靭帯修復時の SPARC 発現の促進に関わっていると考えられる。

TGF- β は線維芽細胞の ECM 合成を促進することによって、組織修復に関わる増殖因子として知られている (49)。TGF- β 存在下で HPLC が産生した ECM は、TGF- β 同様に、SPARC 発現を促進した。一方、IL-1 β 存在下の ECM は、IL-1 β 同様に SPARC の産生量を減少させた。このことは、TGF- β 存在下で HPLC が合成した ECM 中に、SPARC の発現に関わる因子が存在することを示唆する。

I型コラーゲンとフィブロネクチンは ECM を構成する主要なタンパク質であり、細胞の増殖や分化の制御に関っている (50, 51)。またビーグル犬の歯周組織再生において、I型コラーゲンとフィブロネクチンが存在する部位に SPARC が発現していることが知られている (33, 34)。これらの事実から、ECM 中の I型コラーゲンあるいはフィブロネクチンが TGF- β による SPARC の発現促進に関わる有力な因子であると推察した。TGF- β は ECM 中の I型コラーゲンとフィブロネクチン量とともに増加させた。一方、IL-1 β はいずれの産生も減少させた。このように HPLC による SPARC 発現量の変化と ECM 中の I型コラーゲン量およびフィブロネクチン量の変化は一致していた。

さらに、フィブロネクチンは SPARC の産生を促進したのに対し、I 型コラーゲンは影響を及ぼさなかった。以上の結果から、HPLC によって産生された ECM 中のフィブロネクチンが、SPARC 発現に関わる因子の 1 つであることが示唆された。

SPARC 発現の促進に関わるフィブロネクチンの活性領域は不明であるが、細胞性フィブロネクチンが血漿性フィブロネクチンと比べて低濃度で SPARC の発現を促進したことは興味深い。細胞性フィブロネクチンには EDA ドメインが存在するが、血漿性フィブロネクチンには存在しない。抗 EDA 抗体を用いたウエスタンブロットによって、HPLC が産生したフィブロネクチンが EDA ドメインを有していることを明らかにしている (未発表データ)。EDA ドメインは細胞機能の制御に関わっていることが知られている (52)。したがって、細胞性フィブロネクチンがより低濃度で HPLC による SPARC 発現を誘導したことに EDA ドメインが関わっている可能性が考えられる。

本研究では I 型コラーゲンは HPLC による SPARC 発現に影響を与えなかった。I 型コラーゲンノックアウトマウスの皮膚由来線維芽細胞は、正常マウスの皮膚由来線維芽細胞と同レベルの SPARC を産生する (53)。この報告は、I 型コラーゲンが HPLC の SPARC 産生に影響を与えないという本研究結果を支持する。

TGF- β による SPARC 発現の促進に新規合成タンパク質が関与していることを検討するために、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの影響について調べた。シクロヘキシミドは、TGF- β 存在下および非存在下においても、SPARC mRNA の発現を抑制した。このことから、SPARC の発現は、新規合成タンパク質を介した経路があることが明らかになった。さらに TGF- β による SPARC 発現の促進にフィブロネクチンが関わることを確認するために、抗 $\alpha 5$ 抗体の影響について調べた。抗 $\alpha 5$ 抗体は、TGF- β によって誘導される SPARC mRNA 発現量を減少させた。このことは、TGF- β によって HPLC から産生されたフィブロネクチンが、HPLC の $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介して SPARC の mRNA の発現の促進に関わる可能性を示唆する。

TGF- β による SPARC 発現促進には、フィブロネクチンが関与することを明らかにしてきたが、マウス由来骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) の ALPase 活性の促進には、MC3T3-E1 細胞が産生したフィブロネクチンでなく、コラーゲンが関与することが

知られている (54)。このように、同じ TGF- β による細胞機能の活性化も、ALPase 活性と SPARC 産生では、ECM の異なる構成成分が関与していると考えられる。

以上、SPARC の発現には、新規合成タンパク質を介した経路が存在すること、さらに、TGF- β による SPARC 産生の促進にフィブロネクチンが関わることを明らかにし、SPARC 発現の調節機構に増殖因子と ECM の相互作用が関わることをはじめて示した。

歯周組織の再生に、PDGF、あるいは bone morphogenetic protein-2 などの増殖因子が有用であることがビーグル犬の実験的歯槽骨再生において明らかにされている (55, 56, 57)。またエナメル基質を主成分とする歯周組織再生誘導材エムドゲインは、すでに臨床応用されている。本研究の結果は、ある鍵となる因子が直接に、あるいは ECM を介して、歯周組織の一連の修復、再生過程を惹起することを示しており、TGF- β -フィブロネクチン-SPARC の系は再生過程の主要な部分を占めている可能性がある。

第4章 総括

歯周靱帯における SPARC の役割および発現の制御機構を明らかにするために、HPLC 培養系を用いて、HPLC に対する SPARC の作用および増殖因子と ECM による HPLC の SPARC 発現調節機構について検討して、以下の結果を得た。

1. SPARC は HPLC の DNA 合成を促進した。また MMP-2 の産生量を増加させた。一方、SPARC は ALPase 活性には影響を及ぼさなかった。
2. TGF- β は SPARC 発現を蛋白および遺伝子レベルで促進したが、bFGF, EGF, PDGF, TNF- α および IL-1 β は抑制した。
3. TGF- β 存在下で HPLC によって産生された ECM は、SPARC 発現量を増加させたのに対し、IL-1 β 存在下で産生された ECM は SPARC 発現を減少させた。また、TGF- β は ECM 中のフィブロネクチン量および I 型コラーゲン量を増加させたが、IL-1 β は減少させた。
4. 血漿性および細胞性フィブロネクチンはいずれも SPARC 発現を促進したが、仔牛真皮由来の I 型コラーゲンは SPARC の産生量に影響しなかった。
5. 抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体は TGF- β による SPARC mRNA 発現の促進効果を減少させた。
6. タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドは TGF- β によって増加した SPARC mRNA 発現量を減少させた。

以上の結果から、SPARC は組織分解と HPLC の増殖を促進し、歯周靱帯の修復過程に関与することが示唆された。HPLC における TGF- β による SPARC 発現の調節には HPLC によって産生されたフィブロネクチンが関わるということが明らかになった。このように SPARC 発現は増殖因子および増殖因子と ECM の相互作用によって調節されていることが明らかになった。

文 献

1. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981a; 26: 99-105.
2. Sage H, Johnson C, Bornstein P. Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J Biol Chem* 1984; 259: 3993-4007.
3. Otsuka K, Yao KL, Wasi S, Tung PS, Aubin JE, Sodek J, Termine JD. Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells in vitro. *J Biol Chem* 1984; 259: 9805-9812.
4. Mann K, Deutzmann R, Paulsson M, Timpl R. Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Lett* 1987; 218: 167-172.
5. Termine JD, Belcourt AB, Conn KM, Kleinman HK. Mineral and collagen binding proteins of fetal calf bone. *J Biol Chem* 1981; 256: 10403-10408.
6. Romberg RW, Werness PG, Lollar P, Riggs BL, Mann KG. Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J Biol Chem* 1985; 260: 2728-2736.
7. Sage EH, Vernon RB, Funk SE, Everitt EA, Angello J. SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca^{2+} -dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989; 109: 341-356.
8. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions; SPARC, tenascin and thrombospondin. *J Biol Chem* 1991; 266: 14831-14834.
9. Hasselaar P, Loskutoff DJ, Sawdey M, Sage EH. SPARC induces the expression of type I plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 13178-13184.
10. Hasselaar P, Sage EH. SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* 1992; 49: 272-283.
11. Funk SE, Sage EH. Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993; 154: 53-63.

12. Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* 1993; 121: 1433-1444.
13. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 1994; 8: 163-173.
14. Goldblum SE, Ding X, Funk SE, Sage EH. SPARC(secreted protein acidic and rich in cysteine) regulates endothelial cell shape and barrierfunction. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994; 91: 3448-3452.
15. Kamihagi K, Katayama M, Ouchi R, Kato I. Osteonectin/SPARC regulates cellular secretion rates of fibronectin and laminin extracellular matrix proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 423-428.
16. Lane TF, Iruela-Arispe ML, Johnson RS, Sage EH. SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol* 1994; 125: 929-943.
17. Iruela-Arispe ML, Lane TF, Redmond D, Reilly M, Bolender RP, Kavanagh TJ, Sage EH. Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis in vivo. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 327-343 .
18. Reed MJ, Sage EH. SPARC and the extracellular matrix: Implications for cancer and wound repair. *Curr-Top-Microbiol-Immunol* 1996; 213 (P+1): 81-94.
19. Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, Sage EH. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1467-1477.
20. Wasi S, Otsuka K, Yao K-L, Tung PS, Aubin JE, Sodek J, Termine JD. An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can J Biochem Cell Biol* 1984; 62: 470-478.
21. Tung PS, Domenicucci C, Wasi S, Sodek J. Specific immunohistochemical localization of osteonectin and collagen types I and III in fetal and adult porcine dental tissues. *J Histochem Cytochem* 1985; 33: 531-540.

22. Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Mochring JM, Imm G, Sauk JJ. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archs oral Biol* 1990; 35: 241-247.
23. Wrana JL, Overall CM, Sodek J. Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor β . Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. *Eur J Biochem* 1991; 197: 519-528.
24. Zhou H, Hammonds RG Jr, Findlay DM, Martin TJ, Ng KW. Differential effects of transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. *J Cell Physiol* 1993; 155: 112-119.
25. Reed MJ, Vernon RB, Abrass IB, Sage EH. TGF- β 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Physiol* 1994; 158: 169-179.
26. Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H, Noshiro M, Kamihagi K, Katayama M, Kato Y. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Dev Biol* 1995; 170: 457-466.
27. Nakamura S, Kamihagi K, Satakeda H, Katayama M, Pan H, Okamoto H, Noshiro M, Takahashi K, Yoshihara Y, Shimmei M, Okada Y, Kato Y. Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage: Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 539-551.
28. Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 1998; 174: 194-205.
29. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins for polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1979; 76: 4350-4354.
30. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946; 164: 321-329.

31. Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 791-800.
32. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75-81.
33. Matsuura M, Herr Y, Han KY, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J Periodontol* 1995; 66: 579-593.
34. Amar S. Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration *Anat Rec* 1996; 245: 361-373.
35. Shankavaram UT, Dewitt DL, Funk SE, Sage EH, Wahl LM. Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* 1997; 173: 327-334.
36. Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart JM, Thompson EW. SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 5529-5536.
37. Matsubara M, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME. Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodelling cornea. *Dev Biol* 1991; 147: 425-439.
38. Salo T, Makela M, Kylmaniemi M, Autio Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994; 70: 176-182.
39. Wu YM, Richards DW, Rowe DJ. Production of matrix-degrading enzymes and inhibition of osteoclast-like cell differentiation by fibroblast-like cells from the periodontal ligament of human primary teeth. *J Dent Res* 1999; 78: 681-689.
40. Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton ML, Sanes JR, Cunningham JM, Anderson JR, Hogan BM, Evans MJ, Colledge WH. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J* 1998; 17: 1860-1870.
41. Maillard C, Malaval L, Delmas PD. Immunological screening of SPARC/osteonectin in nonmineralized tissues. *Bone* 1992; 13: 257-264.

42. Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 885-896.
43. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1987; 67: 66-70.
44. Kawase T, Sato S, Yamada M, Hirayama A, Miako K, Saito S. Human periodontal ligament cells in vitro. Characterization of alkaline phosphatase. *J Bone Mineral Res. Suppl.1*.1986; 1: 63A.
45. McCulloch CAG, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodont Res* 1991; 26: 144-154.
46. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory. 1982.
47. 酒井正春：ノーザンブロットとドットブロット分析，バイオテクノロジー実験法シリーズ，遺伝子工学総集編；実験医学（村松正実編）. 5, 11, 羊土社，東京， 81-87, 1987.
48. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1980; 77: 5201-5205.
49. Quaglino D Jr, Nanney LB, Kennedy R, Davidson JM. Transforming growth factor- β stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin. I. Excisional wound model. *Lab Invest* 1990; 63: 307-319.
50. Extracellular matrix influences on gene expression, eds. Slavkin HC, Greulich RC. Academic press. 1975.
51. Fibronectins. Hynes RO. Springer-Verlag. 1990.
52. Manabe R, Oh-e N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol* 1997; 139: 295-307.

53. Iruela-Arispe ML, Vernon RB, Wu H, Jaenisch R, Sage EH. Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: Implications for fibroblast function. *Dev Biol* 1996; 207: 171-183.
54. Takeuchi Y, Nakayama K, Matsumoto T. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 3938-3944.
55. Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego DJ Jr, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol* 1994; 65: 429-436.
56. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res* 1997; 76: 1460-1470.
57. King GN, King N, Hughes FJ. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol* 1998; 69: 561-570.