歯周組織におけるファイブロネクチンの研究

松 井 英 夫

東北大学歯学部微生物学教室（指導：熊谷勝男教授）

〔受付：昭和57年7月3日〕

Study of fibronectin in periodontal tissues

Hideo Matsui

*Department of Microbiology, School of Dentistry,
Tohoku University 4-1 Seiryochō, Sendai 980*

(Director: Prof. Katsuo Kumagai)

[Accepted for publication: June 3, 1982]

Key words: fibronectin / anti-fibronectin antibody / lamina propria / periodontal ligament / tooth pulp

Abstract: Fibronectin (FN) is a major glycoprotein in vertebrates that is found as a soluble fraction in plasma at about 30 mg/dl and is widely distributed as an insoluble component of various tissues, in close association with fibrillar structures of connective tissue matrices, basement membranes and certain mesenchymal cells such as fibroblasts. The present study was undertaken to examine the presence and distribution of FN in the periodontal tissues of mice by immunofluorescence using an anti-mouse plasma FN antibody. FN was purified from mouse and human plasma by affinity chromatography on a gelatin-Sepharose 4B. The purified FN gave a single band on SDS polyacrylamide gel electrophoresis and displayed biologic activity such as induction of adherence and spreading of fibroblast and macrophage on the plastic surface at 37°C in a serum-free medium. Antisera of mouse and human FN, which were obtained by hyperimmunization of rabbits with the respective FN, gave a single precipitation line against purified FN and plasma in Ouchterlony's double diffusion. The specificity of these anti-FN antibodies was also ascertained by immunofluorescence staining of FN in fibroblasts and peritoneal macrophages. By immunofluorescence using this specific mouse FN antibody, it was found that FN was distributed in the lamina propria, periodontal ligament and tooth pulp and in the osteocytes of alveolar bone. In aged mice, FN in the periodontal ligament was distributed at a high concentration on the border of cementum, making a clear band.

緒 言

fibronectin (FN) は脊椎動物に広く存在する高分子粘着性糖蛋白質である。FN は線維芽細胞などの表面や細胞周囲 (pericellular) に線維 (mat-

rix) 状に存在し (細胞性 FN, cFN), また血液, 脳脊髄液などの体液中 (血漿性 FN, pFN) にも多量に見出される。いずれも分子量200,000~250,000のサブユニットの二量体あるいは多量体として存在する。

cFN と pFN はその生物活性も物性も類似し、

現在までの免疫学的手法ではお互いを区別することが出来ない。しかし、生物活性、物性に若干の違いが見出されるので同一物質ということは出来ない。現在のところ、本蛋白質の機能にちなんで fibronectin (ラテン語で fibra=線維, nectere=結合する) と総称されている。

pFN は以前より血漿成分の一つとして知られている cold insoluble globulin (CIg) そのものである。CIg は Morrisson らがヒト血漿フィブリノーゲンの精製過程で見出した糖蛋白であり¹⁾, Moesson らにより disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC) において詳細に研究された²⁾。常温では可溶性で β 通分に泳動するが、低温やフィブリノーゲンと凝塊をつくることにより不溶性になる糖蛋白質である。類似の蛋白が antigelatin factor³⁾, microfibrillar protein⁴⁾, あるいは, opsonic protein と呼ばれて報告されたが、これらの β -グロブリンは同一のものであることが判り、現在 pFN の名称で統一されている。

cFN に関しては, Gahamberg と Hakomori が正常ハムスター細胞とそのポリオーマウイルスで悪性転換した細胞表層のレベル蛋白パターンから悪性転換細胞には欠如している高分子糖蛋白質として見出された galactoprotein a の発見に始まる⁵⁾。同じ頃, Hynes らによりラクトペルオキシダーゼ法による細胞表面ラベルから悪性転換によって消失する large external transformation sensitive (LETS) protein と名付けられた類似蛋白が報告されている。また, Ruoslahti と Vaheri は、種々の線維芽細胞に共通な高分子性の表面抗原を見出し、これを SFA と名付けた⁶⁾。この SFA は悪性転換細胞では消失することから LETS などと同じものであると推定した。また, SAF に対する抗体が CIg と強く反応すること、その他種々の物理化学的、生物学的性状が CIg のそれと酷似することから、現在これらの類似蛋白質は cFN の名称で統一されている。cFN は、細胞の骨格形成、移動、粘着のみならず胚分化にも関与していると考えられる。pFN は、ヒト血漿中に 0.3mg/ml 存在し⁷⁾、コラーゲンや^{8,9)}フィブリンのように組織修復に重要な線維状蛋白質と結合し、cryoprecipitate を形成し得る。また、ヘパリ

ンとも強い親和性をもつことも知られている。さらに血液凝固系の活性化第 XIII 因子(プラズマ・トランスグルタミナーゼ)とも結合し^{10,11,12)}、また、この第 XIII 因子によりフィブリノーゲンとも交叉結合する¹³⁾。pFN は、血液凝固、創傷治癒、組織障害破砕物や異物の網内系による除去などの重要な役割を持つと考えられる。最近の報告では、マクロファージ (M ϕ) が FN を保有、産生することが示され^{14,15,16)}、また、骨の分化に FN が関与しているという報告もある^{17,18)}。

本研究は歯芽および歯周組織における FN の存在とその生物学的意義を明らかにすべく、(1) マウス、ヒト pFN の精製ならびに、その特異抗体の精製法、(2) 得られた FN の生物活性ならびに FN 抗体の特異性を検討することを目的とした。そして FN の精製ならびに FN 抗体の作製法に改良を加え、それぞれの特異性を明らかにすることを得た。また、歯周組織における FN の存在を示す若干の成績を得たのであわせて報告する。

材料と方法

1. FN の分離・精製

pFN の分離・精製は変性コラーゲンに対する FN の特異的結合を利用した。つまり、シアンで活性化し、ゼラチンをカップリングした Sepharose 4B を用いたアフィニティー・カラムクロマトにより行った⁹⁾。マウスあるいはヒトより採取したクエン酸ナトリウム加血漿 50ml を 100ml の Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden) カラムに通し、Sepharose 4B に非特異的に吸着する物質を除去し、溶出してきた血漿を Sepharose 4B 1ml 当り 2mg の gelatin (Bact-gelatin, Difco Laboratories, Detroit, Michigan) をカップリングした 10ml の gelatin-Sepharose 4B カラムに流した。次に 0.01M クエン酸ナトリウム PBS (pH 7.2) で流出してくる蛋白が検出されなくなるまでカラムを洗浄し、その後、さらに gelatin-Sepharose 4B カラムに非特異的にゆるく結合している物質を除くため 1M 尿素 0.05M トリス緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した。pFN の溶出は 4M 尿素 0.05M トリス緩衝液 (pH 7.5) で行ない、

FN 分画のピークは280nm の吸収で測定した。以上の操作はすべて室温で行なった。得られた FN 溶液は室温で1晩、0.1%窒化ナトリウム PBS (pH 7.2) で透析し、尿素を除去したものを精製 FN とした。

2. FN 抗体の作製

精製したマウスあるいはヒト FN をウサギに免疫することにより FN 抗血清を得た。精製 FN 1mg を Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) とともに週1回ずつ4回にわたって皮下に注射を行ない、最後の免疫1週間後に採血して抗血清を得た。特異抗体を得るために FN 以外の血漿蛋白への抗体を吸収する方法を考案した。すなわち、gelatin-Sepharose 4B で FN を除去した FN マイナス血漿蛋白を Sepharose 4B に BrCN でカップリングし、この FN (一) 血漿蛋白カップリング Sepharose 4B と得られた抗血清を2時間反応させ、非 FN 蛋白に対する抗体を吸収した。この結果、成績に示されるような特異的な FN 抗血清を容易に得ることが出来た。これに蛍光色素を標識するためには、抗血清を $1/2$ 飽和硫酸塩析ならびに、Sephacryl S-300 (Pharmacia, Sweden) カラムクロマトにより IgG 抗体に分画して用いた。

3. FN 抗体の蛍光色素標識

抗 FN IgG 抗体10mg に0.1mg の FITC (fluorescein isothiocyanate) を加え、1ml の0.5M Menzel 緩衝液 (pH 9.5) で6°C、4時間反応させ、FITC の標識を行なった¹⁹⁾。反応終了後、Sephadex G-50 (Pharmacia, Sweden) カラムクロマトにより標識抗体とフリーの色素の分離を行ない、さらに、DEAE Sephacel (Pharmacia, Sweden) カラムクロマトにより、0.3M NaCl 0.05M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出を行ない、F/P 比約2.0の FITC 標識抗体を得た。

4. 蛍光抗体染色法

FITC 標識抗体により直接法で行なった。ヒト胎児線維芽細胞 (HEL)、マクロファージ (Mφ) はカバースリップ上で培養したものをアセトンで-20°C、15分間固定後、FITC 標識抗体をのせ1時間染色を行なった。歯周組織は、5週齢、20週齢のマウスより歯牙、歯周組織を切り出し、10%

中性ホルマリンで数日間固定後、プラנקリヒロ液にて1日脱灰し、パラフィン包埋後、ミクロームにて5μの切片標本作製したものを、アセトンで-20°C、15分間固定後、FITC 標識抗体をのせ、3時間染色した。染色後、それぞれ15分間 PBS (pH 7.2) で洗浄し、さらに、蒸留水で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

5. 抗体を用いた pFN の定量法

Laser Nephelometer 法や Laurell のロケット電気泳動法を用いて pFN の定量を行なった。Laser Nephelometer 法は、得られた抗 FN 特異抗体を5倍希釈したものの200μl と検体としてクエン酸ナトリウム加血漿を10倍希釈したものの100μl を室温で60分反応後、Laser Nephelometer により定量した。Laurell のロケット電気泳動法は、アガロース1%のゲル平板を抗 FN 特異抗体を5倍希釈したものにひたし、その後、ゲルに小孔をあけ、そこに2μlのクエン酸加血漿を入れ3~4時間通電後、抗原抗体反応によりロケット状に形成された沈降帯の長さを測定し定量を行なった。

6. 細胞培養

精製 FN (1~100μg/ml) をプラスチックシャーレ (直径35mm, Nunc, Denmark) に2ml 入れ、4°C で1晩反応させた後、PBS で3回洗浄したものを FN 被服シャーレとした。細胞は10% calf serum (CS) を添加したイーグルの MEM 培地で培養していたものを0.25% trypsin, 0.02% EDTA ではがし、PBS で洗浄後それぞれの培養液に 1×10^5 /ml に浮遊したものを2ml ずつシャーレに入れ、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。培養後、経時的に0.25% trypsin, 0.02% EDTA で吸着細胞をはがし、洗浄後 MEM 培地に浮遊し、ヘモサイトメーターを用いて細胞数を測定した。

7. 骨髄からのマクロファージ前駆細胞の培養

6~8週齢の C3H/He マウス雄 (舟橋農場, 東京) の両大腿骨より骨髄細胞を採取し、RPMI 培地に 2×10^6 /ml に浮遊させた。骨髄細胞1ml に対し、0.1ml の5%カルボニール鉄と10%新鮮自家血清を加え、37°C、1時間培養後、Ficoll-Isopaque 比重遠心法にて貪食細胞を除去した。

次に非貪食細胞を集め、PBS で3回洗浄後、10% fetal calf serum (FCS)・RPMI 1640培地に $2 \times 10^6/ml$ の濃度に浮遊させ、プラスチックシャーレ (直径93mm, Nunc, Denmark) に10ml 入れ37°C, 1時間, 5% CO₂ インキュベーターで培養し、吸着細胞を除去した。この様に、マクロファージ前駆細胞として非貪食非吸着細胞を得た。Colony stimulating factor (CSF) は、L-929細胞を RPMI 1640培地に $5 \times 10^5/ml$ に浮遊させ、そこに15% FCS, 5% horse serum (HS) を加え7日間培養後、培養上清を集め、0.45μ のミリポアフィルターで滅菌したものを用いた²⁰⁾。RPMI 1640培地に30% CSF, 15% FCS, 5% HS を加えたものを L-929 conditioned medium とした。得られたマクロファージ前駆細胞 2×10^6 個を L-929 conditioned medium に浮遊させ、プラスチックシャーレ (直径58mm, Nunc, Denmark) にまき、37°C, 5% CO₂ インキュベーターで培養した。

結 果

1. FN の分離と精製 FN の性状

Gelatin-Sepharose 4B カラムを用いた FN 分離パターンを示したのが Fig. 1 である。最初の大きなピークは FN を含まない血漿蛋白であり、次のピークが gelatin-Sepharose 4B に非特異的にゆるく結合している物質である。FN の溶出には4M 尿素を用いた。この方法で得られる FN 量は、ヒト、マウス両者とも50ml の血漿から0.5 mg/ml~0.6mg/ml のものが25ml 前後得られた。Laser Nephelometer, Raurell の免疫電気泳動法による定量により、マウス、ヒト血漿中にはともに約0.3mg/ml の FN の存在が示されているので

(後記)、およそ95%の収率となる。このように分離精製したヒト pFN は SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分子量210,000以上の位置に1本のバンドとして、マウス pFN は近接する2本のバンドとして得られた (Fig. 2)。それぞれヒト、マウスの単量体に相当する。

2. 精製 FN の生物学的性状

FN は細胞と基質との間の粘着性糖蛋白であり、種々の細胞とくに線維芽細胞などのプラスチック、ガラス表面への粘着を促す。分離精製したヒト、マウス FN を用いて線維芽細胞および腹腔マクロファージの基質への吸着活性を検討した。

Fig. 1 Isolation of human plasma fibronectin (FN) from citrated human plasma by an affinity chromatography on gelatin-coated Sepharose 4B column.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human and mouse fibronectin purified on gelatin-Sepharose 4B

Fig. 2 SDS-acrylamide gel electrophoresis of human and mouse plasma FN.

Fig. 3 Growth promoting effect of FN-coated petri dishes on human embryonic lung (HEL) cells in MEM medium in the presence of bovine serum albumin (BSA). 2×10^5 HEL cells were inoculated into the petri dishes coated with human plasma FN at a concentration of $100 \mu\text{g/ml}$ and cultivated in the MEM containing 2% BSA (Δ), 10% calf serum (CS) ($\circ$) or medium alone ($\blacktriangle$) at 37°C in a CO_2 incubator. The control cells ($\bullet$) were cultivated in the petri dishes uncoated with FN containing MEM plus 2% BSA.

(1) 線維芽細胞

2%のアルブミン (BSA) 加無血清培地 (MEM) を含む精製ヒト pFN で被服したプラスチックシャーレにヒト胎児線維芽細胞 (HEL) をまき、培養後の細胞の接着、伸展、増殖を観察すると、対照として用いた血清加 MEM 培地におけると全く同様に細胞は接着、伸展し、 37°C 下で増殖を示す。これに反し、無 FN の状態では、HEL 細胞は全く伸展は見られず増殖も示さない (Fig. 3)。さらに、プラスチックシャーレに被服する FN の濃度について検討したところ、 $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で血清加 MEM 培地におけると同様な増殖を示すことが分った。 $1 \mu\text{g/ml}$ では伸展、増殖は全く示さない (Fig. 4)。次に種々の細胞を用い

Fig. 4 Growth of HEL cells in the FN-coated petri dishes cultivated containing MEM + BSA medium.

2×10^5 HEL cells were cultivated with MEM plus 2% BSA in the petri dishes coated with FN at 100 ($\circ$), 10 (Δ), and 1 ($\bullet$) $\mu\text{g/ml}$ of human plasma FN or with the MEM plus 2% BSA in the petri dishes uncoated with FN ($\square$).

て同様に FN の効果を検討した。細胞由来の動物種にかかわらず正常線維芽細胞は FN によって増殖したが、正常上皮細胞や癌化した線維芽細胞、上皮細胞は増殖を示さなかった (Table 1)。精製マウス pFN を被服したプラスチックシャーレで HEL を培養しても精製ヒト pFN の場合と同様な結果を得た。

(2) マクロファージ ($M\phi$)

精製ヒトあるいはマウス pFN で被服したプラスチックシャーレにマウス腹腔細胞をまき、FN への $M\phi$ の吸着と細胞の伸展を経時的に観察した。 $M\phi$ はシャーレ注入後、ほとんどが即座にシャーレ面へ吸着し、以後経時的にシャーレ上で伸展をおこす (Fig. 5)。吸着した $M\phi$ は3時間後にはその相当部分が伸展をおこし、24時間後にはほとんどすべて伸展している。その反応は血清添加のみのシャーレにおけるよりも速やかであった。これに反し、血清無添加 FN 非被服シャーレでは細胞添加後早期には約半数の $M\phi$ は伸展するが、

Table 1 Effect of fibronectin and serum on growth of various types of cells

Type of cell		Origin	Morphology and nature		Growth		
					Serum ^a	None ^b	FN ^b
I	HEL	Human	Fibro	Normal	+	—	+
	CEC	Chicken	Fibro	Normal	+	—	+
	C3H2K	Mouse	Fibro	Normal	+	—	+
	BHK	Hamster	Fibro	Normal	+	—	+
	Wish	Human	Epith	Normal	+	—	—
	HeP-2	Human	Epith	Tumor	+	—	—
II	GMK	Monkey	Epith	Normal	+	—	—
	CV-1	Monkey	Epith	Normal	+	—	—
	HT-1	Hamster	Epith	Tumor	+	—	—
	X C	Rat	Epith	Tumor	+	—	—
	SV2KC2	Mouse	Fibro	Tumor	+	—	—

a : Eagle's MEM

b : Eagle's MEM with 0.5% BSA

Fig. 5 Spreading of mouse peritoneal macrophages on the FN-coated petri dishes.

Mouse peritoneal exudate cells were incubated in the petri dishes containing MEM fortified with 10% calf serum (□), or in the FN (100 μ g/ml)-coated (○) or uncoated (Δ) petri dishes containing MEM without calf serum.

その伸展面積は極めて小さく、24時間以降はシャーレ面より剝離して液中に浮遊して死滅した。骨髓、血液単核球細胞について、対照として非刺激マウス腹腔 M ϕ (resident M ϕ) と BCG で誘

Fig. 6 Spreading on the FN-coated plate of mouse bone marrow cells, circulating monocytes, resident and BCG-activated peritoneal macrophages.

Bone marrow cells (Δ), monocytes (□), and resident (●) and BCG-activated (○) macrophages were incubated at 37°C in the FN-coated petri dishes. Spreading of cells on the petri dishes were observed an inverted phase-contrast microscope.

導した3日目の活性化 M ϕ をおきながら同様なことを行なった (Fig. 6)。BCG 誘導 M ϕ が最も

Table 2 Divalent cation dependency of macrophage-spreading on fibronectin-coated plate

Chelating agents*	% macrophage spreading
—	80.0
EDTA (10 mM)	0
EGTA (10 mM)	81.9
EGTA+Mg ²⁺ (10 mM)	87.0

* Medium : MEM+10% BSA

早く, resident Mφ も早期に伸展した。これに対し, 血液単核球中の単球も吸着, 伸展したがより長い時間を要した。一方, 骨髓細胞には FN シャーレ上で伸展する細胞は認められなかった。次に, この腹腔 Mφ の FN 上の伸展と 2 価陽イオンとの関係を検討した (Table 2)。EDTA で Mφ を処理すると伸展 Mφ が全く検出されないし, また, Mg²⁺ を加えると伸展することから, 伸展は Mg²⁺ の存在で進行すると思われる。Ca²⁺ の依存性は認められなかった。

3. FN 抗体の特異性と蛍光染色による FN の検出

(1) FN 抗体の特異性

ウサギに免疫して得た抗マウス FN 抗体と精製マウス FN, マウス血漿, および FN を吸収したマウス血漿 [P(-FN)] とのアガロース double diffusion 泳動を示したのが Fig. 7 である。抗 FN 抗体は精製 FN と 1 本の沈降線を示し, 抗体と血漿間の沈降線と融合を示した。抗 FN 抗体と血漿との間には 1 本の沈降線しか認められず, FN(-) 血漿と抗 FN 抗体との間には全く反応を示さなかった。マウス FN に対して特異的な抗血清が得られたものといえる。ヒト pFN をウサギに免疫して得られた抗ヒト FN 抗体も同様の方法で FN に対して特異的であることが示された。

(2) 特異的抗 FN 抗体を用いた pFN の定量

Laser Nephelometer, Laurell の免疫電気泳動法によりヒト pFN の定量を行なった (Fig. 8)。正常人は 31.43mg/dl で従来報告された値とほぼ同様であった。特徴的なのは, DIC における減少と, 膠原病における増加である。DIC において正常人と近い値を示しているのは妊娠被験者であった。膠原病で特に高い値を示したのは強皮症

Double-diffusion reactions in agarose between anti-mouse fibronectin antiserum and mouse fibronectin

A-FN, rabbit anti-mouse fibronectin antiserum

FN, mouse fibronectin

P, mouse plasma

P(-FN), mouse fibronectin negative plasma

Fig. 7 Double-diffusion immunoprecipitation test of mouse plasma FN and rabbit anti-FN antibody.

Fig. 8 Concentrations of plasma FN in the healthy persons and patients with different diseases measured by Laser-Nephelometer using human plasma FN antibody.

患者であった。癌, 糖尿病患者と正常人との間には差は見られなかった。

(3) 蛍光抗体法による FN の検出

Fig. 9 FN in human embryonic lung (HEL) cells detected by immunofluorescence using FITC-labeled human plasma FN antibody ($\times 1000$).

Table 3 Fibronectin-bearing cells among the mouse blood and peritoneal mononuclear cells and polymorphonuclear cells

cells	% positive cells		
	FN	ANAE*	Phagocytosis
Peripheral blood mononuclear cells	<1	10.7	10.3
Polymorphonuclear cells	<1	<1	92.6
Peritoneal exudate cells	35.0	ND	37.8

* Acid α -naphthyl acetate esterase staining

i) 線維芽細胞における FN の検出

線維芽細胞として HEL を用いた。カバースリップ上で培養した HEL をアセトンで固定し、FITC 標識抗体で染色すると、FN が細胞全層に線維状に分布して見られ、さらに、細胞周辺に線維状のマトリックス (pericellular fibrillar matrix) を形成しているのが認められた (Fig. 9)^{21, 22)}。

ii) マクロファージにおける FN の検出

マウスより、リンパ球、多核白血球、単球および $M\phi$ が 35~40% 含まれている腹腔滲出細胞を採取し、FITC 標識抗体で染色した (Table 3)。リンパ球、多核白血球、単球において FN はほとんど検出されなかったが、腹腔滲出細胞では $M\phi$ に相当する 35% の細胞に FN が検出できた。腹腔滲出細胞の $M\phi$ を FITC 標識抗体で染色したのが Fig. 10 である。線維芽細胞に見られた FN の細胞周辺の線維状マトリックスは形成されてい

Fig. 10 FN in mouse peritoneal macrophages detected by immunofluorescence using mouse plasma FN antibody ($\times 400$).

いが、細胞質内に著明な蛍光抗原として検出された。

iii) マクロファージの分化過程における FN の検出

マウス骨髄より マクロファージ前駆細胞として非貪食、非吸着細胞を得て、この細胞群を L-929 由来の CSF (colony stimulating factor)²⁰⁾ で培養した (Fig. 11)。吸着細胞、非吸着細胞を経時的に FITC 標識抗体で染色すると、吸着細胞において、培養後 2 日目から FN 保有細胞が検出され、5 日目ではほぼ全ての細胞に FN が検出された。貪食能、Mäy-Giemsa 染色などからも、この培養系ではほぼ 5 日間で $M\phi$ に分化している。これに反し、非吸着細胞は 5 日間の培養でも FN 保有細胞は検出されなかった。以上のことは骨髄中のマクロファージ (単球) 前駆細胞には FN が存在しないが、成熟分化の過程で FN を産生するようになることを示している。

iv) 歯牙および歯周組織における FN の検出

5 週齢、20 週齢のマウス歯周組織脱灰切片を FITC 標識抗体で染色した。FN は歯肉固有層、歯根膜、歯髓、骨細胞に検出された (Fig. 12-1)。歯肉では上皮は染色されず固有層のみが染色された。歯根膜では 5 週齢マウスにおいては細胞成分が明瞭に染色され、間質も薄く染色されている (Fig. 12-2)。一方、20 週齢マウスでは歯根膜全体が強く染色され、そのため細胞成分が明確に判定できなくなっている。さらに特徴的なのは、セメント質表面に帯状の明瞭な染色が見られ FN が

Fig. 11 Appearance of FN in the macrophages when developed in culture of precursor cells from bone marrow.

Nonphagocytic and nonadherent precursor cells of monocytes from mouse bone marrow were inoculated into the petri dishes containing RPMI 1640 medium with colony stimulating factor (CSF) and cultivated at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

Adherent cells (○) and nonadherent cells (●) in the culture were examined for FN-staining by immunofluorescence. Before culture (■), no FN-positive cells were found.

強く集積していることである (Fig. 12-3)。しかし、歯槽骨表面にはこの様な FN の集積は見られなかった。H-E 染色標本の観察では、セメント質表面の細胞、コラーゲン線維の状態は、5週齢、20週齢両マウスの間で差異は認められなかった。また、FN はセメント質内には検出されなかった。歯槽骨そのものは染色されないが一部骨細胞は FN を保有していた。

考 察

本研究で用いた変性コラーゲンを利用した pFN の分離精製法は、ヒト、マウス血漿から約95%の

Fig. 12 FN detected by immunofluorescence in the tooth and periodontal tissues of mice.

PL, periodontal ligament; D, dentin; B, alveolar bone; P, tooth pulp; LP, lamina propria.

Fig. 12-1 shows that FN is found in the lamina propria, periodontal ligament and tooth pulp ($\times 25$).

Fig. 12-2 shows that FN is found in the cells distributed in the periodontal ligament and osteocytes in the alveolar bone ($\times 250$).

Fig. 12-3 shows that FN is distributed in the periodontal ligament and condensed as a band on the border of cementum ($\times 250$).

回収率で pFN を分離することができた。pFN の分離精製にはアルギニンを利用した方法などが報告されているが²³⁾、本研究に用いた方法で十分に pFN の回収目的は達成されるものと思われる。この分離精製したマウス、ヒト pFN は SDS・ポリアクリルアミド電気泳動で他の血漿成分の混在が殆んど認められず、分子量210,000~250,000の単純成分として検出された。分離精製 pFN (ヒト pFN による試験) には、ヒト、ニワトリ、マウス、ハムスターなどの培養線維芽細胞を無血清培地でプラスチックシャーレに吸着させる活性が確認された。これらの細胞は pFN を 4°C で被服したプラスチックシャーレに吸着し、ウシ血清アルブミン添加無血清培地中で、血清添加培地中と全く同様に分裂増殖した。これらの細胞は、pFN を被服せぬ裸のシャーレ中では、血清アルブミン添加培地でも非特異的吸着はするが、増殖は全く認められない。従って、pFN はこれらの細胞にウシ血清アルブミン中に含まれる増殖因子に反応して増殖できるような機能的吸着をもたらすものと思われる。細胞の pFN 被服シャーレへの吸着は EDTA によって阻害される二価イオン(とくに Mg^{2+}) 依存性であった。細胞と pFN あるいは細胞膜上の cFN の細胞側の結合部位は硫酸化プロテオグリカンであることが示唆されている²⁴⁾。かつ、この結合は細胞の骨格蛋白 (micro-filament) と連結しており²⁵⁾、従って、cFN や細胞の pFN への結合は細胞の運動、伸展と関連している。pFN の被服したシャーレへの線維芽細胞の吸着は、培地中の一定の因子の介助によって面上の伸展、そして、分裂、増殖の引き金として働くものと思われる。分離精製した pFN は、また、マウス血中単球や腹腔マクロファージをプラスチック面に吸着させる機能のあることも示された。その吸着はやはり Mg^{2+} 依存性であり、EDTA によって抑制された。この pFN を介しての吸着は単球-マクロファージの分化過程に密接に関連していることが示唆された。骨髄中にある単球前駆細胞には吸着性が認められず、単球になって出現し、成熟したマクロファージに強く、種々の刺激で活性化されたマクロファージにはより強い吸着性が認められた。線維芽細胞やマクロファージ

の pFN 被服シャーレへの吸着は pFN に対する細胞膜上の受容体 (レセプター) を介した Mg^{2+} 依存性の吸着によるものと思われる。実際に我々は pFN 被服ラテックスビーズを用いて単球、マクロファージ上の FN レセプターの定量的変動を明らかにしている(松井他、未発表)。

本実験では、次いで、このような精製 pFN に対するウサギ抗体を精製した。抗ヒト、マウス pFN ウサギ抗体は、いずれもそれぞれの血漿中の pFN にのみ反応し、免疫電気泳動的に特異的であることが示された。抗ヒト pFN 抗体により、種々の疾患患者や対照健康人血漿中の FN 量を定量的に測定可能であることもわかった。さらに、本抗体に FITC をラベルした蛍光抗体により、種々の組織、培養細胞の cFN を特異的に検出することができた。例えば、培養線維芽細胞に特有な fibrillar な cFN が検出された。FITC ラベル抗マウス pFN 抗体でマクロファージの分化に伴う細胞内 FN の変動も定性的にとらえることができた。すなわち、マクロファージ増殖因子 (CSF) を加えた培地中での骨髄細胞の培養による単球前駆細胞には全く FN が認められないが、これがプラスチック面に吸着し、分化増殖が始まると細胞質内に FN を産生するようになり、典型的なマクロファージへと分化すると多量の FN が産生されるようになることからマクロファージと FN 産生との密接な関連が示唆された。

蛍光抗体を用いて本実験の最終目的である歯牙、歯周組織における FN の存在とその分布を検討した。その結果、マウス歯牙および歯周組織において、FN は歯肉、歯根膜、歯槽骨などの歯周組織、および歯髄内に広く検出された。歯肉では上皮は染色されず固有層に認められた。歯根膜にはより強い蛍光として検出された。とくにセメント質表面に帯状に強い蛍光として認められた。セメント質表面の局在している FN は歯根膜にて産生された FN に基くものではないかと考えられる。歯根膜における FN は幼若 (5 週齢) マウスより老齢 (20 週齢) マウスに著しく、とくに老齢マウスの歯根膜セメント質面は極めて強い帯状の蛍光として認められた。ヘマトキシリン・エオジン染色所見では、この部の細胞、コラーゲン線

維に両週齢間でとくに著しい差異は認められなかった。週齢にもとづく歯周組織におけるこの FN の違いは興味深い。歯槽骨では osteocyte が FN 陽性である以外全体的な分布は認められなかった。歯牙においては歯髄にのみ FN および FN 保有細胞と思われるものが検出された。以上の各組織内の詳細な FN および FN 保有細胞の分布と年齢的、疾患ごとの変動については今後検討の予定である。

結 論

粘着性糖蛋白である Fibronectin(FN) をヒト、マウス血漿より分離精製し、さらに、この FN に対する特異的抗体を精製した。得られた精製 FN の生物活性ならびに FN 抗体の特異性を検討し、また、蛍光抗体法により歯牙、歯周組織における FN の存在を検討し、次の結果を得た。

1. 得られた精製 FN は、SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりヒト pFN は分子量210,000以上の位置に1本のバンドとして、マウ

ス pFN は近接する2本のバンドとして得られた。

2. この精製 pFN は、線維芽細胞、マクロファージの基質への伸展を促進する生物活性を示した。

3. 精製 FN をウサギに免疫することにより得られた抗 FN 抗体は、アガロース double diffusion 泳動で精製 FN、血漿と1本の沈降線のみを示し、FN に対して特異的であることが証明された。

4. Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 FN 抗体による蛍光抗体法により、歯牙、歯周組織では、歯肉固有層、歯根膜、歯髄、歯槽骨内骨細胞に広く FN が存在することを明らかにした。

5. 特に、加齢にともない歯根膜のセメント質面に強く FN が局在するようになることがわかった。

稿を終るに臨み、終始御指導を賜った熊谷教授に心から感謝の意を捧げます。

抄録：歯牙ならび歯周組織における粘着性糖蛋白である Fibronectin (FN) の存在と、その生物学的意義を明らかにするため、マウスおよびヒト血漿より FN を分離精製し、さらに、FN に対する特異抗体を精製した。精製 FN は SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量210,000以上の位置に現われ、その生物活性は FN を被服したシャーレへの線維芽細胞、マクロファージの伸展を促進することにより確認できた。精製した FN 抗体はアガロース double diffusion により、精製 FN、血漿と1本の沈降線を示し、FN に対して特異的な抗体であることが確認された。この特異的抗体を用い蛍光抗体法にて歯牙および歯周組織における FN の検出を行なった。FN は歯肉固有層、歯根膜、歯髄、骨細胞に検出された。歯根膜では FN はセメント質表面に帯状に強く局在していることが示され、このセメント質表面における FN の存在は加齢とともに著しくなることが示唆された。

文 献

- 1) Morrison, P. R., Edsall, J. T. and Miller, S. G.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J. Amer. Chem. Soc.* **70** : 3103-3108, 1948.
- 2) Mosesson, M. W., Colman, R. W. and Sherry, S.: Chronic intravascular coagulation syndrome. Report of a case with special studies of an associated plasma cryoprecipitate (Cryofibrinogen). *New Engl. J. Med.* **278** : 815-821, 1968.
- 3) Wolff, I., Timpl, R., Pecher, I., Steffen, C.: A two-component system of human serum agglutinating gelatin-coated erythrocytes. *Vox Sang.* **12** : 443-456, 1967.
- 4) Ross, R. and Bornstein, P.: The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J. Cell Biol.* **40** : 366-372, 1969.
- 5) Gahamberg, C. G. and Hakomori, S.: Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycolipid. *Natl. Acad. Sci. USA.* **70** : 3329-3333, 1973.
- 6) Ruoslahti, E., Baheri, A., Kuusela, P. and Linder, E.: Fibroblast surface antigen: A new serum protein. *Biochem. Biophys. Acta.* **322** : 352-358, 1973.

- 7) Mosesson, M. W. and Umfient, R. A.: The cold-insoluble globulin of human plasma. *J. Biol. Chem.* **245** : 5728-5736, 1970.
- 8) Engvall, E. and Ruoslahti, E.: Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer.* **20** : 1-5, 1977.
- 9) Yamada, K. M. and Olden, K.: Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* **275** : 179-184, 1978.
- 10) Mosher, F. D.: Cross-Linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *J. Biol. Chem.* **250** : 6614-6621, 1975.
- 11) Mosher, F. D.: Action of fibrin-stabilizing factor on cold-insoluble globulin and α_2 -macroglobulin in clotting plasma. *J. Biol. Chem.* **251** : 1639-1645, 1976.
- 12) Mosher, F. D. and Schd, E. P.: Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation factor XIIIa. *J. Clin. Invest.* **64** : 781-788, 1979.
- 13) Iwanaga, S., Suzuki, K. and Hashimoto, S.: Bovine plasma cold-insoluble globulin: Cross structure and function. In "Fibroblast surface protein". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **321** : 56-73, 1978.
- 14) 熊谷勝男, 日沼州司: 生体防御の機構 (水野伝一, 武谷健二, 石田名香雄) 163-181, 東京大学出版会, 東京, 1980.
- 15) 熊谷勝男, 日沼州司: Fibronectin の生物学的意義: 感染, 炎症, 免疫 11-19, 第1巻, 第2号, 医学の門社, 東京, 1981.
- 16) Alitalo, K., Hovi, T. and Vaheri, A.: Fibronectin is produced by human macrophages. *J. Exp. Med.* **151** : 602-613, 1980.
- 17) Weiss, R. F. and Reddi, H. A.: Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77** : 2074-2078, 1980.
- 18) Weiss, R. E. and Reddi, H. A.: Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow. *J. Cell. Biol.*, **88** : 630-636, 1981.
- 19) Kawamura, A. Jr.: Fluorescent antibody techniques and their applications. (Kawamura, A. Jr.). University of Tokyo press and University Park press, Baltimore and Manchester. 33-38, 1969.
- 20) Austin, E. P., McCulloch, A. E. and Till, E. J.: Characterization of the factor in L-cell conditioned medium capable of stimulating colony formation by mouse marrow cells in culture. *J. Cell. Physiol.* **77** : 121-134, 1970.
- 21) Vaheri, A., Alitalo, K., Hedman, K., Wartiovaara, J.: Fibronectin and the pericellular matrix of normal and transformed adherent cells. *N. Y. Acad. Sci.* **36** : 343-353, 1978.
- 22) 熊谷勝男, 日沼州司, 松井英夫, 荒井澄夫, 清水義信: 単層培養の必須蛋白としての Fibronectin. 日本癌学会総会記事. 148, 1979.
- 23) Vuento, M. and Vaheri, A.: Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. *Biochem. J.* **183** : 331-337, 1979.
- 24) Perkins, M. E., Ji, T. H. and Hynes, R. O.: Cross-linking of fibronectin to sulfate proteoglycans at the cell surface. *Cell* **16** : 941-952, 1979.
- 25) Marshall, C. J., and Humphries, K. C.: Microfilament bundles, LETS protein growth control in somatic cell hybrids. *J. Cell. Sci.* **33** : 191-204, 1978.