

氏	山城圭介
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3102 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	ヒト歯根膜線維芽細胞における機械的刺激誘導性遺伝子についての研究

論文審査委員 教授 滝川 正春 教授 山本 照子 教授 高柴 正悟

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯根膜は歯槽骨と歯の間に介在する結合組織であり、咬合による機械的刺激を常に受けている。そして、その主たる構成成分である歯根膜線維芽細胞は歯周組織の創傷治癒や組織再生の中心的な役割を担うと考えられている。そこで、咬合力などの間欠的な力が加わる生理的環境下で、ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLF) がどのように反応するのかを調べることで、細胞の恒常性の維持や、歯周組織の組織修復、再生などのメカニズムに関して理解できると考えられる。そこで本研究では、HPLF に間欠的な機械的刺激を与えることにより発現が変化する遺伝子を、マイクロアレイを用いて検出することとした。そして、得られた遺伝子について、遺伝子間やその産物であるタンパク間の相互的な関係に関する種々の文献を基に構築されたパスウェイ解析ソフトを用いて解析を行い、各遺伝子間の相互関係について調べることにした。さらに、これら遺伝子がアクチン線維を利用した経路を介して転写が制御されているかどうか調べることにした。

【材料および方法】

1. HPLF の培養および全 RNA の抽出：HPLF は、Myokai らの方法にしたがって全身的に健康な 4 人のドナーの抜去歯から単離後、培養した。それぞれの細胞を 5 回から 9 回継代したのち、フレキシブルボトムディッシュに細胞を播種し間欠的な機械的刺激を与えた。なお、刺激の時間は 0.5, 1, 2, あるいは 16 時間とした。それぞれの細胞から全 RNA を抽出した。
2. マイクロアレイ解析：1) 得られた全 RNA を用いて、アレイとのハイブリダイゼーション、およびシグナルの検出を行った。2) 上記の解析で得られたデータについて、分散分析 (ANOVA) を行い、機械的刺激によって有意に発現が変化する遺伝子を抽出した。そして、それらの既知の機能を調べたのち、K-means 法によるクラスター解析を行った。3) マイクロアレイでの結果を検証するため、リアルタイム PCR 法で mRNA の発現量を測定した。
3. パスウェイ解析：ANOVA による統計学的解析によって機械的刺激によって有意に発現が変化した遺伝子に対して、Ingenuity Signaling Pathway (IPA ; Ingenuity Systems) を用いてパスウェイ解析を行った。
4. アクチン線維依存性シグナル伝達系の検索：1) 機械的刺激がアクチン線維を介し

て細胞内に刺激を伝えるかどうかを調べるために、HPLFのアクチン線維を弛緩させた細胞に機械的刺激を与え、遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法で定量した。HPLFは、4人目のドナー（17歳、女性）の抜去歯から得たものを上記と同様に培養して用いた。そして、アクチン重合の阻害剤であるY27632を培地に加えて、アクチン線維を弛緩した。2) 細胞内のアクチン線維をcoumarin phalloidinを用いて染色した。3) 最も多くの遺伝子が関与していたパスウェイ中で、13個の遺伝子を選択し、アクチン線維を弛緩した細胞に機械的刺激を与えた際のこれら遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法で定量した。

【結果】

1. 機械的刺激によって発現が変動した遺伝子：機械的刺激によって発現が有意に変化する遺伝子は、マイクロアレイ上の8,500種の遺伝子のうち122種であった。これらを経時的変化における発現パターン別に、8つのクラスターに分類した。すべてのクラスターにおいて、Cell Growth & Maintenanceと Intracellular Signalingの機能カテゴリーに属する遺伝子が多かった。またマイクロアレイの結果とリアルタイムPCRの結果は類似していた。
2. パスウェイ解析：機械的刺激によって有意に発現が変化したとマイクロアレイの解析で判断した遺伝子122種は、IPAの解析においてデータベース内の既知遺伝子が関与する生体内分子のプロセスやパスウェイとを組み合わせて、有意に影響しているものをright-tailed Fisher Exact Testを用いて検討した結果、4つの大きなパスウェイが見いだされた。その中でも最も有意と判定されたパスウェイには、マイクロアレイで判定された遺伝子と、既知の遺伝子を合わせて35種が含まれていた。また、このパスウェイには、癌や細胞死に関わる機能が割振られている遺伝子が多く存在した。
3. アクチン線維を弛緩した細胞での遺伝子発現の変化：アクチン線維を染色後に顕微鏡を用いて細胞を観察すると、Y27632を添加した細胞においては、無添加の細胞に比べてアクチン線維は薄く、その量も少なかった。13種の遺伝子について発現量を調べると、9種はマイクロアレイの結果と近似した値を示した。アクチン線維を弛緩させた細胞に機械的刺激を与えると、*aminoacylase 1* (ACY1) と *tumor protein p53 binding protein 2* (TP53BP2) ではその発現の上昇が一部抑制された。*Activating transcription factor 1* (ATF1) と *golgi SNAP receptor complex member 1* (GOSR1) では発現の減少が抑制された。一方、*adrenergic receptor β 2* (ADRB2) と *v-fos* (FOS) ではアクチン線維の弛緩による発現の影響はなかった。なお、*caspase 3* (CASP3)、*histone deacetylase 4* (HDAC4)、そして *calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV* (CAMK4) についてはいかなる刺激においても、その発現は変化しなかった。

【考察】

生理的な機械的刺激をHPLFに与えることによって成長や増殖の調整に関わる多くの遺伝子の発現が変化し、組織が恒常性を維持していると考えられる。また、これら遺伝子の一部は機械刺激の際に活性化する細胞内シグナル伝達経路 (mechanotransduction) を介して転写制御されていると考えられる。

【結論】

HPLFに機械的刺激を与えることによって発現が変動する遺伝子は、Cell Growth & Maintenanceと Intracellular Signalingの機能カテゴリーに含まれるものが多かった。また、アクチン線維を介したシグナル伝達が、これら遺伝子の発現に関与している可能性があることがわかった。

論文審査の結果の要旨

「ヒト歯根膜線維芽細胞における機械的刺激誘導性遺伝子に関する研究」

歯根膜は歯槽骨と歯の間に介在する結合組織であり、咬合による機械的刺激を常に受けている。そしてその主たる構成成分である歯根膜線維芽細胞は、歯周組織の創傷治癒や組織再生の中心的な役割を担うと考えられている。そこで咬合力などの間欠的な力が加わる生理的環境下で、ヒト歯根膜線維芽細胞（HPLF）がどのように反応するのかを調べることで、細胞の恒常性の維持や歯周組織の組織修復再生などのメカニズムに関して理解できると考えられる。そこで本研究では、HPLFに間欠的な機械的刺激を与えることにより発現が変化する遺伝子を、マイクロアレイを用いて検出した。そして得られた遺伝子について、遺伝子間やその産物であるタンパク間の相互的な関係に関する種々の文献を基に構築されたパスウェイ解析ソフトを用いて解析を行い、各遺伝子間の相互関係について調べた。さらにこれら遺伝子がアクチン線維を利用した経路を介して転写が制御されているかどうかを調べるために、抑制剤を用いてアクチン線維を弛緩させた細胞に機械的刺激を与えて遺伝子の発現変化を調べた。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

- 1) HPLFに機械的刺激を与えることによって発現が変動する遺伝子を、刺激開始後の経時的発現変化のパターン別に8つのクラスターに分類した。すべてのクラスターにおいて、Cell Growth & Maintenanceと Intracellular Signalingのカテゴリーに属する遺伝子が多かった。
- 2) それらの遺伝子の中で、ACY1, TP53BP2, ATF1およびGOSR1はアクチン線維を介して転写が制御されている可能性があることが示唆された。

これらの結果から HPLF に適切な機械的刺激が加わることで細胞がその恒常性を維持することが示唆された。また機械的刺激が細胞内に伝わり標的遺伝子の発現を促す際にアクチン線維が刺激を伝達することに関与していることが示唆された。

以上のことから、本申請論文は学位論文として価値があると認めた。