

|              |                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | CD44 isoform expression in periodontal tissues :<br>Cell-type specific regulation of alternative<br>splicing                                                       |
| Author(s)    | 平野, 富希                                                                                                                                                             |
| Citation     | 大阪大学, 1998, 博士論文                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41006">https://hdl.handle.net/11094/41006</a>                                                                                |
| rights       |                                                                                                                                                                    |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていない<br>ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利<br>用をご希望の場合は、<a<br>href="https://www.library.osaka-<br>u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文につい<br>て</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 平 野 富 希                                                                                                                               |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (歯 学)                                                                                                                             |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 3 5 2 2 号                                                                                                                         |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 10 年 1 月 30 日                                                                                                                     |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                      |
| 学 位 論 文 名     | CD44 isoform expression in periodontal tissues: Cell-type specific regulation of alternative splicing<br>(歯周組織における CD44 分子のアイソフォーム発現) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 岡 田 宏<br>(副査)<br>教 授 米 田 俊 之    助教授 木 村 重 信    講 師 岩 本 容 泰                                                                |

## 論 文 内 容 の 要 旨

CD44 はヒアルロン酸等の細胞外基質レセプターとして機能し、同種・異種細胞間の接着に関与しており、T リンパ球とヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) 間の接着にも重要な役割を果たすことが明らかにされている。近年、CD44 には mRNA のスプライシングの違いにより多数のアイソフォームが存在し、各アイソフォーム間で組織分布やヒアルロン酸結合能が異なり、更にサイトカイン刺激等によりその発現様式が変化する可能性が報告されている。しかしながら、歯周組織においては CD44 アイソフォームの発現様式のみならず組織分布も明らかにされていない。そこで本研究では、歯周組織およびその主要な構成細胞である HGF、ヒト歯根膜細胞 (HPDL)、ヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) における CD44 アイソフォームの発現を詳細に解析し、炎症性刺激や細胞分化過程の CD44 アイソフォーム発現への影響の検討を通して歯周組織の恒常性維持、組織破壊、創傷治癒の過程における CD44 分子の関与を探る礎を得ることを目的とした。

まず、歯周組織における CD44 分子の発現分布を明らかにするために抗ヒト CD44 単クローン抗体 (mAb) OS/37 を用いて凍結歯肉切片を免疫組織染色したところ、角化層を除く口腔上皮、基底膜、歯肉結合組織を構成する線維芽細胞や血管内皮細胞が CD44 陽性を示した。そこで、細胞レベルで CD44 分子の発現を検討するために、歯周組織由来の細胞株 HGF、HPDL、HGEC を *in vitro* で樹立した。フローサイトメトリーによる解析の結果、これら全ての細胞が CD44 蛋白陽性であった。次に、OS/37 による免疫沈降反応により CD44 蛋白の分子量を検討した結果、HGF、HPDL が分子量 85-90 kDa の CD44 を発現しているのに対し、HGEC は 130 kDa の CD44 分子を加えて発現していることが示された。この蛋白レベルでの細胞特異性を mRNA レベルで検討するためにノーザンブロット法による解析を行ったところ、全長 CD44cDNA プローブにより各細胞から分子量の異なる 3 種類以上の CD44mRNA が検出された。HGEC は HGF、HPDL に比して分子量の大きな mRNA を発現しており可変エクソンの挿入を有する可能性がうかがわれた。そこで、可変エクソンの挿入による CD44 アイソフォームの発現様式を詳細に検討するために Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) およびサザンブロット法による解析を行った。歯周組織由来細胞および末梢血単核球、ヒト白血病細胞 Molt-4、ヒト顎下腺由来腺癌細胞 HSG、ヒト顎下リンパ節由来扁平上皮

癌細胞 SCCNI, ヒト肺由来扁平上皮癌細胞 A549 より全 RNA を抽出し RT-PCR を行った。CD44 mRNA の増幅には CD44 細胞外ドメインに存在する可変エクソン挿入部位を囲む位置にプライマー F5, R15 を設定した。更に CD44 PCR 産物共通部位に相当する R5, および可変エクソン 6 (v6) に相当する R10 をそれぞれプローブとして微量な PCR 産物をサザンブロット法により検出した。その結果, HGF, HPDL は単核球, Molt-4, HSG, A549 と同様に可変エクソンを有さない造血細胞型 CD44 (CD44 H) 由来の約 130 bp の PCR 産物を優勢に発現しており, 更に R5 によるサザンブロット解析から, 発現量は少ないものの 300 bp 付近に増幅される可変エクソンを含むアイソフォームを発現していることが示された。一方, HGEC は SCCNI と共に 300 bp から 1200 bp に増幅される可変エクソンの挿入を有する分子量の大きな CD44 mRNA の発現が CD44 H の発現に比して多く, CD44 アイソフォーム発現に細胞特異性が認められた。また, CD44 v6 mRNA の発現が HGEC 特異的であることが R10 によるサザンブロット解析により, v6 蛋白陽性細胞が歯肉上皮層に局限されることが抗 CD44 v6 mAb 2F10 による歯肉切片の免疫組織染色から示された。次に, CD44 アイソフォームの発現が炎症過程においていかなる影響を受けるかを検討するために歯周組織由来細胞を炎症性サイトカインを含む液性因子存在下に培養しノーザンブロット法, RT-PCR およびサザンブロット法により解析した。HGF, HPDL では phorbol 12-myristate 13-acetate, インターロイキン  $1\beta$ , 腫瘍壊死因子  $\alpha$  の添加により CD44 の全 mRNA 量が増加したが, アイソフォーム発現様式に変化は認められず, HGEC においても炎症性サイトカイン刺激による著明なアイソフォーム発現の変動は検出されなかった。最後に, 上皮細胞の増殖や分化が CD44 アイソフォームの発現にいかなる影響を与えるかを検討するために, コンフルエントに到達する前後の HGEC より検出される CD44 および上皮細胞の分化指標の一つであるサイトケラチン 2p (CK-2p) の発現を RT-PCR およびサザンブロット法により解析した。HGEC ではコンフルエントに到達後更に培養を継続すると CK-2p の発現が増加することが確認され, それに伴い上皮細胞に特有の CD44 高分子量アイソフォームの発現が減少し CD44 H の発現増加が認められた。

以上の結果から, 歯周組織における CD44 アイソフォームの発現が細胞特異的に制御されていることが明らかとなり, 炎症や細胞分化の過程においても CD44 アイソフォームの発現が関連している可能性が示唆された。今後, CD44 分子の可変エクソン挿入により惹起される機能の変化を詳細に解析することにより, 歯周組織における CD44 アイソフォームの生理学的および病態生理学的な役割がさらに明らかにされることか期待される。

## 論文審査の結果の要旨

CD44 分子は細胞外基質などに結合する接着分子であり, 細胞内情報伝達分子としても機能し細胞増殖やサイトカイン産生を誘導することが知られている。本論文はこのような多様な機能を有する CD44 分子の歯周組織における発現を *in vivo* ならびに *in vitro* にて詳細に解析したものである。その結果, 歯肉上皮細胞は歯肉線維芽細胞, 歯根膜細胞に比べて多くの可変エクソンの挿入に起因する特有のアイソフォームを発現していることを明らかにした。また炎症性の刺激や細胞分化により CD44 分子の発現量やアイソフォームの発現パターンが変化することを見いだした。以上の業績は, 同分子が歯周組織の恒常性の維持, 及び病的変化に大きく関与する可能性を示したものであり, 博士(歯学)の申請に値するものと認める。