The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト歯根膜組織の遺伝子発現プロフィール解析とPLAP-1分子の同定
Author(s)	小澤, 康宏
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45157
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ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【42】

氏　　名	小澤康宏（おざわ やすひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　18613　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	**ヒト歯根膜組織の遺伝子発現プロフィール解析とPLAP-1分子の同定**
論文審査委員	（主査） 教　授　村上　伸也 （副査） 教　授　伊集院直邦　　助教授　西村　理行　　助教授　新谷　誠康

論文内容の要旨

【研究目的】

ヒト歯根膜組織は、歯の支持組織として重要なだけでなく歯周組織の修復・再生に必須の役割を果たす未分化間葉系細胞群の供給源となっているユニークな組織と考えられている。同組織に対しては、これまで主に解剖学的・形態学的な解析及び生物学的な表現型について研究がなされてきたが、遺伝子レベルでの特異性及び機能発現のメカニズムについては十分に解明されているとはいいがたい。そこで本研究では、ヒト歯根膜組織における遺伝子発現状況を解析し、分子生物学的な側面からヒト歯根膜組織の特徴を理解することを目的として、実際の組織での遺伝子発現状況を忠実に再現するといわれている3'末端cDNAライブラリを用いてヒト歯根膜組織遺伝子発現プロフィールを作成し、解析した。さらにその情報を基に、歯根膜組織に高頻度、特異的に発現している新規分子 periodontal ligament associated protein-1（PLAP-1）を単離・同定し、その機能解析を行った。

【材料および方法】

1) ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロフィールの作成：矯正治療のため便宜抜歯した第一小臼歯の歯根膜組織より mRNA を抽出し、ヒト歯根膜組織 3'末端 cDNA ライブラリを作製した。無作為に選択した 1752 個のクローンの塩基配列を解読し、出現頻度解析及び BLAST 解析を行い、ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロフィールを作成した。同時に他のヒト組織・細胞の遺伝子発現プロフィールデータベースとの比較検討を行った。2) 完全長 *PLAP-1* 遺伝子の単離・同定：ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロフィール解析の結果、歯根膜組織に高頻度かつ特異的に発現している未知の配列が見出された。その塩基配列を基に、完全長 cDNA 配列を決定し、*PLAP-1* 遺伝子と命名した。PLAP-1 予想アミノ酸配列を基にタンパクデータベースにおける相同性解析を行った。3) 培養ヒト歯根膜細胞（HPDL）における *PLAP-1* 遺伝子発現：①50 μg/ml アスコルビン酸及び 10 mM β-グリセロリン酸を添加した培地にて 20 日間培養した HPDL 及び、培養 15 日目から Fibroblast growth factor-2（FGF-2）を 20 ng/ml 加えて培養した HPDL より RNA を抽出し、半定量性 RT-PCR 法により *PLAP-1* 遺伝子発現を検出した。②各種サイトカインを用いて 48 時間刺激を行った HPDL より RNA を抽出し、半定量性 RT-PCR 法により *PLAP-1* 遺伝子発現を検出した。4) HPDL における PLAP-1 タンパクの発現：①PLAP-1 アミノ酸配列を基に合成したペプチドをウサギに免疫し、抗 PLAP-1 抗体を作製した。②200 ng/ml 及び 400 ng/ml の Bone morphogenetic protein-2（BMP-2）で刺激した HPDL を、抗 PLAP-1 抗体を用いて免疫化学的に染色し、PLAP-1 タンパクの発現を検出した。5) マウス歯周組織におけるマウス *PLAP-1* 遺伝

子発現：ヒト *PLAP-1* 遺伝子完全長 cDNA 配列を基にマウス *PLAP-1* 遺伝子を同定し、マウス *PLAP-1* 特異的 RNA プローブを作製した。作製したプローブを用いて、5週齢マウス上顎骨及び脛骨組織より RNA を抽出しノザンブロット解析を行い、*PLAP-1* 遺伝子発現の局在を検討した。また、3週齢マウス歯周組織のパラフィン包埋標本を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションによりマウス歯周組織における *PLAP-1* 遺伝子の発現を検出した。6) *PLAP-1* 遺伝子強発現による *in vitro* 機能解析：①当教室において樹立した培養マウス歯根膜細胞株 MPDL22 に PLAP-1 タンパクコード領域を組み込んだ発現ベクターを脂質導入法により遺伝子導入した後、G-418 Sulfate（400 μg/ml）存在下にて選択培養し *PLAP-1* 遺伝子強発現株を得た。②*PLAL-1* 遺伝子強発現株及び、発現ベクターのみを遺伝子導入した対照株を、12 日間培養しアルカリフォスファターゼ（ALPase）活性を測定・比較した。また、石灰化物形成についてアリザリンレッド染色を行い、比較・検討した。さらに、BMP-2（100 ng/ml）で 24、48、72 時間刺激し、各時点における ALPase 活性を測定・比較した。

【結果】

1）ヒト歯根膜遺伝子発現プロフィールにおいて、*Collagen type I* 及び *type III* 遺伝子の発現頻度が最も高く、さらに *Osteonectin* 及び *Periostin* 遺伝子の高発現が認められた。2）歯根膜組織に特徴的かつ高頻度で発現している *PLAP-1* 遺伝子を単離・同定した。予想アミノ酸配列から、PLAP-1 タンパクは Biglycan と Decorin に高い相同性を示し、small leucine-rich repeat proteoglycan（SLRP）family class I に属する新規の分泌型プロテオグリカン様分子であることが示された。3）長期培養により分化誘導した HPDL において、*PLAP-1* 遺伝子の発現は上昇した。また、*PLAP-1* 遺伝子の発現は FGF-2 刺激により抑制され、BMP-2 刺激により亢進した。4) PLAP-1 タンパクは HPDL に発現しており、その発現は BMP-2 刺激により増強した。5）マウス歯周組織において、*PLAP-1* 遺伝子は歯根膜組織に特異的な発現を示した。6）*PLAP-1* 遺伝子強発現歯根膜細胞株を、長期培養した際の ALPase 活性、石灰化物形成及び BMP-2 により誘導される ALPase 活性は、対照株と比し有意に低レベルであった。

【結論と考察】

新規 *PLAP-1* 遺伝子は歯根膜組織に特異的に発現し、その過剰発現は歯根膜細胞の硬組織形成に対し抑制的に作用することが示された。このことから、PLAP-1 は硬組織形成能を有していながらも石灰化せず線維性の結合組織として機能する歯根膜組織の恒常性維持に重要な役割を持つ因子の一つであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト歯根膜組織の特徴を遺伝子発現状況の側面から理解するために、ヒト歯根膜組織の 3'末端 cDNA ライブラリを用いて遺伝子発現プロフィール解析を行ったものである。その結果、硬組織形成能を有する歯根膜組織の特徴が遺伝子発現状況から明らかとなった。さらに、同組織に特徴的に発現する新規プロテオグリカン様分子 PLAP-1 の単離・同定に成功し、同分子が歯根膜組織の恒常性維持に重要な役割を担うことを示す結果を得た。これらの知見は、歯根膜組織の特徴を分子生物学的な側面から理解する上において極めて有益なものであり、本研究は博士（歯学）の学位を得るに値するものと認める。