The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マウス歯根膜由来クローン細胞におけるオステオポンチン発現制御の解析
Author(s)	寺島, 祥充
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45555
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

【22】

氏　　名	寺　島　祥　充（てら しま よし みつ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　１９４０３　号
学位授与年月日	平成 17 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	**マウス歯根膜由来クローン細胞におけるオステオポンチン発現制御の解析**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　村上　伸也 （副査） 教　授　大嶋　　隆　　助教授　西村　理行　　講　師　豊澤　　悟

論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

オステオポンチン（以下 OP と称す）は高度にリン酸化したタンパクであり骨芽細胞の分化マーカーとして知られ、細胞外基質として硬組織形成時のミネラル結晶生成のコントロールや RGDS 配列を介して細胞の接着に関わるだけでなく、分泌タンパクとして細胞間のシグナル分子としても機能していることが知られている。歯根膜組織中においては歯根のセメント質表層や歯槽骨に接する部分に発現が強く認められ、一方、同組織の再生過程においては、新生骨、歯根膜組織にその発現が強く誘導されるとの報告もある。しかしながら、OP はその機能の多様性ゆえに、歯周組織における同分子の発現制御に関しては、不明な点が多く残されている。そこで本研究では、当研究室で樹立したマウス歯根膜由来クローン細胞を用い、長期培養による分化誘導過程、さらに歯周組織再生誘導剤としての応用が期待される塩基性線維芽細胞増殖因子（以下 FGF-2 と称す）刺激により誘導される OP の発現パターンについて検討した。

【材料及び方法】

1）細胞の調整：マウス歯根膜由来クローン細胞は、BALB/c マウスの下顎大臼歯の歯根表面より組織を採取し、得られた細胞を FGF-2 存在下で限界希釈法にてクローニングを行うことによって樹立した。得られたクローンの中から、最もアルカリフォスファターゼ（以下 ALPase と称す）活性の高いクローン MPDL22 とその対照株として最も ALPase 活性の低いクローン MPDL6 を本研究に供した。2）試薬：石灰化誘導培地として 10%FCS 含有 α-MEM 培地に 10 mM β-グリセロリン酸と 50 μg/ml アスコルビン酸を添加した培地を用いた。無機リン酸として Na_2HPO_4、無機リン酸の細胞内輸送阻害剤として Foscarnet、各種シグナル経路のインヒビターとして U0126（ERK1/2 経路）、U0124（U0126 の構造異性体）、SB203580（P38 経路）、SP600125（JNK 経路）、Wortmanin と LY294002（PI3K 経路）、H-89（PKA 経路）、Calphostin C（PKC 経路）を使用した。3）石灰化ノジュール形成の検討：細胞を種々の条件下にて培養し、形成される石灰化ノジュールをアリザリン染色にて検出し比較検討した。4）OP mRNA の検出：種々の条件下にて培養を行なった細胞から、全 RNA を抽出し、半定量性 RT-PCR にて OP mRNA 発現量の定量を行ない比較検討した。5）OP タンパクの検出：①ウエスタンブロッティングによる解析：細胞を種々の条件下にて培養を行ない、OP に対する特異抗体を用いてウエスタンブロティングを行ない OP タンパクの発現を比較検討し

た。②免疫組織学的解析：種々の条件下にて培養した細胞を２％パラホルムアルデヒドで固定後、OP に対する特異抗体を用いて免疫組織染色を行なった。同細胞内 OP タンパクの発現も合わせて検出する際には細胞を Triton X で処理した後、同様に免疫組織染色した。６）培養上清中の OP の検出：細胞を種々の条件下にて培養後、培養上清を回収し、同上清中の OP タンパクを OP ELISA Kit を用いて定量した。

【結果】

１）MPDL6 及び MPDL22 を石灰化誘導培地にて長期培養を行ない分化誘導した場合の石灰化ノジュール形成及び OP 発現と、これらの発現に及ぼす無機リン酸の関与について検討を行なった。その結果、MPDL22 は ALPase 活性が高く、石灰化ノジュールを強く形成するのに対し、MPDL6 は ALPase 活性が低く、石灰化ノジュールを形成しないことが確認された。これらの結果と一致して MPDL22 は MPDL6 に比べて OP を強発現することが明らかとなった。また MPDL22 において、無機リン酸刺激により石灰化ノジュールの形成および OP 発現の上昇が誘導され、その効果は Foscarnet によって抑制されることが明らかとなった。また MPDL22 を石灰化誘導培地で長期培養した際の石灰化ノジュール形成及び OP 発現が Foscarnet によって抑制されることが明らかとなった。これらの結果から MPDL22 は石灰化誘導培地で長期培養し分化を誘導させると硬組織を形成し、OP 発現を上昇することが確認された。さらに、これらの石灰化ノジュール及び OP 発現誘導には ALPase と同酵素によって生じる無機リン酸が関与していることが強く示唆された。２）歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を可逆的に抑制することが知られている FGF-2 が歯根膜細胞による OP 発現に及ぼす影響について検討した。その結果、興味深いことに FGF-2 刺激にて MPDL6 では弱い、MPDL22 においては強い OP mRNA 及びタンパクの発現誘導が認められ、次に FGF-2 刺激が誘導する MPDL22 による OP の発現誘導にいかなるシグナル伝達系が関与するのかについて、各種シグナルのインヒビターを用いて検討した。その結果、FGF-2 が誘導する MPDL22 によるによる OP の発現上昇は mRNA およびタンパクレベルで U0126 あるいは Calphostin C によって抑制され、ERK1/2 および PKC シグナルが OP 発現上昇に関与していることが強く示唆された。３）FGF-2 刺激と無機リン酸刺激によって誘導される OP 発現パターンに違いが有るか否かについて、その局在を免疫組織学およびウエスタンブロット検索にて、また培養上清中の OP 量を ELISA 法にて検討した。その結果、無機リン酸刺激によって誘導される OP 発現は主に細胞外基質中に認められるのに対し、FGF-2 刺激によって誘導される OP 発現は細胞内、および培養上清中に主として検出されることが明らかとなった。また、OP は細胞表層の細胞外基質である Collagen などと親和性が高いことが知られており、無機リン酸刺激によって誘導される細胞外基質中の OP 発現は細胞を Collagenase 処理することによって強く抑制されることが明らかとなった。さらに MPDL22 よる Type I collagen の発現は FGF-2 刺激にて抑制される一方、無機リン酸刺激にて上昇することも明らかとなった。以上のことから、MPDL22 において無機リン酸刺激によって発現誘導される OP は、少なくとも細胞外基質の Collagen ネットワークに取り込まれることで細胞外基質中に存在し、一方、FGF-2 は歯根膜細胞の Collagen 産生を抑制することから、FGF-2 刺激によって誘導される OP は、細胞外基質中に取り込まれることなく、培養上清中へと分泌されている可能性が考えられた。

【結論と考察】

本研究で明らかとなったように、OP は細胞が受ける刺激によってその発現様式が異なり、そのことが OP の生物学的機能の差異に反映されている可能性が示唆された。近年、細胞内 OP が創傷治癒過程における細胞の遊走に関与し、可溶性 OP が細胞のサバイバル活性を亢進するなどの報告がなされている。これらの報告と既に報告されている歯根膜組織での OP の局在と本研究結果とも重ね合わせて考えてみると、硬組織に接している部分に発現している OP は歯槽骨やセメント質の形成に関連して、同硬組織基質タンパクとしての機能を担っており、再生過程における OP は、FGF-2 誘導性 OP と同じく細胞内 OP や可溶性 OP として歯周組織再生に関わる歯根膜細胞内、および再生が期待される歯槽骨欠損部に局在し、歯根膜細胞のサバイバルや同上欠損部への遊走に関連しているものと推測される。

論文審査の結果の要旨

本研究はマウス歯根膜由来クローン細胞（MPDL）を用いて、歯根膜組織におけるオステオポンチン（OP）の発現制御について解析を行なったものである。その結果、MPDLにおいて長期培養ならびに無機リン酸刺激による分化誘導時に加え、塩基性線維芽細胞増殖因子刺激によってもOPが発現誘導されることを明らかにした。さらに前者の場合には無機リン酸が細胞内に取り込まれることによってOPが細胞外基質中に局在すること、後者の場合には少なくともERK1/2、PKCを介したシグナル伝達によりOPが細胞内および可溶性OPとして局在することが明らかとなった。これらの知見は、歯根膜組織の機能を特徴づける分子基盤を理解する上で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。