The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	カスタマイズドDNAマイクロアレイを用いた歯根膜の硬組織形成過程における遺伝子発現解析
Author(s)	前田, 憲一郎
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45568
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

氏　　名　前田　憲一郎（まえだ　けんいちろう）

博士の専攻分野の名称　博　士（歯　学）

学位記番号　第　19404　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　**カスタマイズドDNAマイクロアレイを用いた歯根膜の硬組織形成過程における遺伝子発現解析**

論文審査委員　（主査）
教　授　村上　伸也

（副査）
教　授　天野　敦雄　　助教授　新谷　誠康　　助教授　原田　英光

論文内容の要旨

【研究目的】

ゲノム研究進展の中、数々の研究成果を挙げているものの1つが、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析である。一方、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組織であるが、同組織間葉細胞の硬組織形成細胞への分化過程における遺伝子発現制御についてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析から得られた約 1200 種の遺伝子を搭載したカスタムメイドの DNA マイクロアレイを作製し、同マイクロアレイを用いてヒト歯根膜細胞を *in vitro* で硬組織形成細胞へと分化誘導した際の経時的な遺伝子発現変化を解析することにより、ヒト歯根膜細胞の分化過程を制御する分子基盤の一端を解明することを目的とした。

【材料及び方法】

1）ヒト歯根膜組織由来カスタマイズド DNA マイクロアレイの作製：ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析の結果をもとに、3’末端 cDNA クローンをターゲット DNA として選定し、遺伝子を RT-PCR 法により増幅した後スライドガラス上にスタンプし、ヒト歯根膜組織由来カスタマイズド DNA チップを作製、PerioGen Chip と命名した。2）ヒト歯根膜細胞の硬組織形成過程における遺伝子発現解析：矯正治療のため便宜抜歯した歯から歯根膜組織を採取、培養し out-growth してきた細胞をヒト歯根膜細胞(HPDL) とした。HPDL を石灰化誘導培地（10%FCS、50 μg/ml アスコルビン酸および 10 nM β-グリセロリン酸含有 α-MEM）にて培養し、RNA を培養 0 日目、3 日目、7 日目、10 日目、および 20 日目に抽出した。それぞれの RNA から逆転写反応により、Cyamine dye にて標識されたプローブを調整し、PerioGen Chip にハイブリダイゼーションを行った後、発光強度を検出し、培養 0 日目を対照群として各日における遺伝子の発現量を比較検討した。その結果、発現量の上昇を認めた遺伝子群のうち高い上昇率を示した *DAN*、*Periostin* について RT-PCR 法を用いて発現変化の確認を行った。3）DAN および Periostin タンパクの発現解析：石灰化誘導培地で培養した HPDL における DAN および Periostin のタンパク発現変化を、ウエスタンブロッティング法により解析した。4）DAN 強発現による *in vitro* 機能解析：DAN 発現アデノウイルスを作製、HPDL に感染させ、石灰化誘導培地にて培養し、アルカリフォスファターゼ（ALPase）活性を測定した。さらに WST-1 法を用いて、DAN 強発現による細胞増殖への影響を検討した。また、DAN が BMP-antagonist として機能

しているとの報告があることから、BMP2/4やそのレセプターのHPDL硬組織形成過程における遺伝子発現と、DAN強発現によるBMP-2シグナルの阻害作用を、RT-PCR法にて解析した。5）HPDL特異的新規Periostinアイソフォームの同定：HPDLから抽出したRNAをもとに、*Periostin*のOpen Reading Frame 5'末端側および3'末端側特異的なプライマーを用いたRT-PCR法を行い、各アイソフォームを同時に増幅した。同PCR産物をクローニングベクターに挿入後、cDNAクローンを無作為に選択してシークエンスを行い、HPDLにおけるPeriostinアイソフォームの発現解析を行った。さらにヒト培養細胞株におけるPeriostinアイソフォームの発現解析をRT-PCR法にて行った。6）Periostin強発現による*in vitro*機能解析：HPDL特異的新規Periostinアイソフォーム発現アデノウイルスを作製し、HPDLに感染させ、石灰化誘導培地にて培養した際のALPase活性の測定およびアリザリンレッド染色による石灰化物形成能の比較・検討を行った。

【結果】

1）ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析に基づいて、約1200個の遺伝子を搭載したヒト歯根膜組織由来カスタマイズドDNAチップ(PerioGen Chip)を作製した。2)HPDLの硬組織形成過程における遺伝子発現をPerioGen Chipを用いて解析した結果、*DAN*および*Periostin*遺伝子の著明な発現の上昇を認めた。3)硬組織形成過程のHPDLにおけるDANおよびPeriostinタンパクの発現上昇が確認された。4）DAN強発現によりHPDLのALPase活性および細胞増殖が抑制された。また、RT-PCR法によりBMP2/4およびそのレセプターの発現上昇も認められ、さらにDAN強発現により、BMP-2刺激による*Osteocalcin*遺伝子の発現上昇が抑制された。5）HPDLにおけるシークエンス解析の結果、HPDLに高発現するHPDL特異的新規Periostinアイソフォーム（PDL-POSTIN）が同定された。6）HPDLにPDL-POSTINを強発現することにより、硬組織形成過程に伴うALPase活性と石灰化物形成の促進が認められた。

【結論と考察】

PerioGen Chip解析により、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程において発現が上昇することが明らかになったDANおよびPeriostinに関して、DANはHPDLの増殖・分化に対し抑制的に作用することが示唆された一方、HPDL特異的新規Periostinアイソフォーム、PDL-POSTINはHPDLの硬組織形成に対し促進的に働くことが示唆された。以上のことからPerioGen Chipは、HPDLの網羅的遺伝子発現解析に有効であり、PerioGen Chip解析により同定されたDANおよびPeriostinは、歯根膜組織において恒常性の維持やその分化過程の制御に関与している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜組織の特徴を遺伝子発現変化の側面から理解するために、ヒト歯根膜由来カスタマイズドDNAマイクロアレイ（PerioGen Chip）を作製し、同マイクロアレイを用いてヒト歯根膜細胞を*in vitro*で硬組織形成細胞へと分化誘導した際の経時的な遺伝子発現変化を解析したものである。その結果、*DAN*、*Periostin*遺伝子の顕著な発現上昇が認められ、さらにそれらの機能解析を行うことにより、DAN、Periostinが歯根膜組織において恒常性の維持や硬組織形成細胞への分化過程の制御に関与している可能性が示された。本知見は、PerioGen Chipの有用性を示すとともに、歯根膜組織の硬組織形成過程を制御する分子基盤を理解する上で極めて有意なものであり、本研究は博士（歯学）の学位を得るに値するものと認める。