

Title	腫瘍壊死因子（TNF）- α による歯根膜由来細胞の遊走性への阻害作用
Author(s)	武村, あかね
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46391
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	武村あかね
博士の専攻分野の名称	博士(学術)
学位記番号	第 20238 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学系研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	腫瘍壊死因子 (TNF)- α による歯根膜由来細胞の遊走性への阻害作用
論文審査委員	(主査) 教授 天野 敦雄 (副査) 教授 雫石 聰 講師 北村 正博 講師 中川 一路

論文内容の要旨

目的：慢性炎症を伴う歯周病局所において産生される腫瘍壊死因子 (TNF)- α は、歯周組織の破壊を促進する因子と考えられている。しかし、歯周組織の創傷治癒および再生における TNF- α の影響については知見に乏しい。そこで本研究では歯根膜由来 (PDL) 細胞の遊走性と増殖性に及ぼす TNF- α の影響について検討をした。

方法と材料：PDL 細胞はボランティアから提供された便宜抜去歯の歯根膜組織により分離し、5~8 回の継代培養を行ったものを用いた。細胞遊走性は、*in vitro* wounding assay にて評価した。すなわち、コンフルエントまで培養した細胞層にチップ尖端で創傷を作成し、ヒト TNF- α と抗ヒト TNF- α 抗体の存在・非存在下における創傷への遊走細胞数を経時的に測定した。細胞接着因子の発現と関連シグナル伝達因子のリン酸化は、ウェスタンブロッティング法にて検出した。PVDF 膜に転写したタンパクは、抗ヒトインテグリン $\alpha 5$ 抗体、インテグリン $\beta 1$ 抗体、リン酸化 FAK (pTyr³⁹⁷) 抗体、リン酸化パキシリン (pTyr¹¹⁸) 抗体、非リン酸化 FAK 抗体およびパキシリン抗体により検出した。RhoA 活性化は、Rho-GTP pull-down assay を行った。すなわち、TNF- α (10 ng/ml) で 0~120 分間刺激した細胞を溶解し、遠心後に上清と Rhotekin-Rho 結合ドメインアガロースビーズとを反応させた。ウェスタンブロッティング法にて、抗 RhoA 抗体によりビーズに結合した活性化 RhoA を検出した。フォーカルアドヒージョン (FA) は、緑色蛍光蛋白質 (GFP) をパキシリンと融合させたタンパク発現ベクターを PDL 細胞に導入し、TNF- α (10 ng/ml) で 24 時間刺激後のパキシリンの PDL 細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

結果：TNF- α 添加により PDL 細胞の増殖性は影響を受けなかったが、細胞遊走性は有意に抑制された。細胞遊走に関連する因子への影響を評価したところ、TNF- α 添加により細胞接着に関与する因子であるインテグリン $\alpha 5$ および $\beta 1$ サブユニットのタンパク発現が有意に促進され、さらにインテグリン下流シグナル伝達因子であるパキシリンと FAK のリン酸化も誘導された。一方、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ のリガンドであるフィブロネクチンの遺伝子発現には影響が見られなかった。さらに、細胞遊走を制御する RhoA も TNF- α 処理によって活性化された。さらに、TNF- α 処理により PDL 細胞の FA 形成は顕著に誘導されるとともに、細胞形態は極性を消失し紡錘形を呈した。

結論：これらの結果から、TNF- α は PDL 細胞の FA の過形成を促すことにより細胞接着性を亢進させ、その結果、細胞遊走性は抑制され歯根膜の再生の阻害、遅延に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜由来細胞の遊走性に及ぼす腫瘍壊死因子 (TNF- α) の影響とその作用機序について検討したものである。その結果、TNF- α は細胞遊走に対し阻害能を有し、その作用の発揮には、細胞接着斑の形成促進、インテグリン発現亢進ならびにインテグリン下流のシグナル伝達因子の活性化を介した細胞接着性の亢進が関与していることが示唆された。これらの知見は、歯周炎罹患歯根膜組織の再生遅延メカニズムを明らかにする上で貴重な示唆を与えるものであり、博士 (学術) の学位授与に値するものと認める。