



Title	ヒト歯根膜細胞の全遺伝子発現プロファイリング解析により同定されたId1の機能解析
Author(s)	米田, 晋也
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49245">https://hdl.handle.net/11094/49245</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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	米田晋也
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第21936号
学位授与年月日	平成20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	ヒト歯根膜細胞の全遺伝子発現プロファイリング解析により同定されたId1の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 村上伸也 (副査) 教授 阪井丘芳 准教授 今里聰 講師 齋藤正寛

### 論文内容の要旨

#### (研究目的)

ヒトゲノムプロジェクトの結果、ヒトの全ゲノム配列が解読され、その遺伝子総数は2万5千個前後であることが明らかとなり、DNAからヒトへという新しい生命科学研究アプローチがなされつつある。一方、歯根膜組織はその形態的、機能的な特徴から生体内でもユニークな組織であると考えられているが、歯根膜組織における網羅的な遺伝子発現状況についての解析は未だ十分なされていない。そこで本研究では、硬組織新生を伴う歯周組織再生の分子基盤を解明するために、ヒト歯根膜細胞を硬組織形形成分化させた際のすべての遺伝子発現変化を網羅的かつ詳細に解析することによりデータベース化し、それを利用することによって歯根膜細胞分化過程における転写レベルでの調節機構の解明を行うことを目的として実験を行った。更にその過程において、歯根膜細胞分化に伴ってその発現が減少する転写調節因子Id1を見出し、同因子の機能解析を行った。

#### (材料および方法)

##### 1) ヒト歯根膜細胞分化過程における遺伝子発現データベースの作成

①オリゴDNAチップを用いたヒト歯根膜細胞の硬組織形形成分化過程における網羅的遺伝子発現解析：本実験への協力に同意を得た患者から便宜抜歯された歯根面より歯根膜組織を採取。培養し、out-growthしてきたヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地(10%FCS、10 mM  $\beta$ -glycerophosphate、50  $\mu$ g/ml ascorbic acid含有 $\alpha$ -MEM)中に培養した。最初の3日間は12時間毎に、続いて4、6、9、12、15、18日後にRNAを抽出し、それぞれのRNAを鑄型にしてamino allyl RNA法で増幅しながら蛍光標識したaRNAをオリゴDNAチップ(日立ソフトウェアエンジニアリング)にハイブリダイズし、0日目を対照群とした各タイムポイントにおける遺伝子発現変化を解析した。②統計学的手法を用いたクラスタリング解析：各タイムポイントのいずれかで発現変化率が2.0以上を示した遺伝子を抽出し、統計学的解析を行うことで各遺伝子の発現パターンに基づいたクラスタリングを行った。③Gene Ontology(GO)解析：発現パターンによって分類したそれぞれのクラスターの中に如何なる機能や細胞内局在等を示す遺伝子の集積を認めるか解析した。

##### 2) データベースにより同定された硬組織形形成因子の機能解析

①ヒト歯根膜細胞の硬組織形形成分化に関与する転写因子の抽出：作成したデータベースをもとに硬組織形形成分化過程

において発現が減少した遺伝子群の中から転写に関与する因子を抽出した。②歯根膜細胞での Id1 発現解析：硬組織形成分化過程や BMP-2 (100 ng/ml) 刺激による *Id1* 発現変化について Real time PCR 法により解析した。③歯根膜細胞への遺伝子導入による機能解析：当教室にて樹立したマウス歯根膜細胞株 MPDL22 に、*Id1* 特異的 siRNA 発現ベクターを導入し、ハイグロマイン存在下にて選択培養することにより、内在性 *Id1* 抑制株を樹立した。次に、同細胞株を石灰化誘導培地にて培養し、15 日目まで 3 日おきに ALPase 活性、石灰化物形成、および *Runx2*, *Osterix*, *Osteocalcin*, *Osteopontin* 遺伝子の発現をコントロール群と比較検討した。さらに、Id ファミリーの 4 つの遺伝子 *Id1*, 2, 3, 4 それぞれに特異的な 19 mer の塩基配列からなる siRNA mix を MPDL22 ～ transient に細胞導入し、内在性 *Id* ファミリー遺伝子の発現を抑制した。同細胞を BMP-2 (100 ng/ml) で刺激し、刺激後 24 時間、48 時間、72 時間後に ALPase 活性、および *Osteocalcin* 遺伝子発現をコントロール群と比較検討した。

#### (結果)

1) ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程において、その発現変化率が 2.0 を超える遺伝子が 3175 個存在することが明らかとなった。同遺伝子群の発現パターンに基づいたクラスタリング解析の結果、硬組織形成分化過程において 5 つのクラスターに分類された。その過程において発現減少の程度で 2 つのクラスターに、発現上昇の程度で 2 つのクラスターに、また全体としては大きく発現が変動しない 1 つのクラスターに分類された。また、GO 解析により発現減少を示したクラスターには細胞増殖や細胞周期に関する遺伝子が、発現増加を示したクラスターには脂質代謝や細胞接着に関する遺伝子が、また全体として大きく発現が変動しないクラスターにはアポトーシスや細胞死に関する遺伝子が集積していることが明らかとなった。以上の結果を基に作成した、ヒト歯根膜細胞分化過程における遺伝子発現データベースを、GenePerio データベース (whole gene expression profile of periodontal ligament cyto-differentiation) と命名した。

2) 抽出した転写調節因子の中から、硬組織形成に伴って発現減少を示すクラスターに *Id1* を見出した。更にヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程において *Id1* の発現が減少することを Real time PCR 法により確認した。また歯根膜細胞を BMP-2 刺激することにより *Id1* の発現が上昇することが明らかとなった。MPDL22 を用いて機能解析を行った結果、siRNA による内在性 *Id1* の発現抑制により、硬組織形成分化に伴って誘導される ALPase 活性、石灰化物形成、および *Runx2*, *Osterix*, *Osteocalcin*, *Osteopontin* 遺伝子の発現が抑制された。さらに、内在性 *Id1*, 2, 3, 4 遺伝子を同時に発現抑制することにより、BMP-2 刺激で誘導される ALPase 活性、*Osteocalcin* 遺伝子の発現が抑制された。

#### (結論と考察)

ヒト歯根膜細胞の全遺伝子プロファイリング解析の結果、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程においてはヒト全遺伝子中 3175 個の遺伝子が有意な発現変化を示すことが明らかとなり、クラスタリング解析の結果分類された 5 つのクラスターにはそれぞれ特徴的な遺伝子群の集積を認めた。また今回見出された転写調節因子 *Id1* は、歯根膜組織、特に未分化な細胞に恒常に発現しており、そういう細胞の硬組織形成分化へのポテンシャルを維持させるように働きながら、その恒常性を維持していることが示唆された。また歯周組織が傷害された時には、その再生に伴って未分化な細胞が硬組織形成分化を始めるとともに *Id1* はその役目を終え、発現が減少していくことが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程における遺伝子発現プロファイリング解析に基づきデータベースを確立すると共に、そのデータベースを利用することによって同定された転写調節因子 *Id1* の機能解析を行ったものである。

その結果、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程において、3175 個の遺伝子の有意な発現変化が検出された。さらにクラスタリング解析の結果分類された 5 つのクラスターにはそれぞれ特徴的な遺伝子群の集積が明らかにされた。また今回見出された *Id1* はヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化を制御する可能性が示唆された。

これらの知見は硬組織新生を伴う歯周組織再生の分子基盤を理解する上で重要な知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。