

Title	メカニカルストレスにより誘導されるグルタミン酸シグナル関連分子の歯根膜細胞における役割
Author(s)	藤原, 千春
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49762
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	藤原千春
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 22863 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	メカニカルストレスにより誘導されるグルタミン酸シグナル関連分子の 歯根膜細胞における役割
論文審査委員	(主査) 教授 村上 伸也 (副査) 教授 脇坂 聡 准教授 西村 理行 講師 佐伯万騎男

論文内容の要旨

<研究目的>

歯周組織の恒常性の維持並びに同組織の再生機序を考える上で、歯根膜は中心的な役割を担っている。生体内において歯根膜は咬合力というメカニカルストレスを常に受けており、歯根膜の特性、機能を考える上で、メカニカルストレスの影響を無視することはできない。そこで本研究では、メカニカルストレス存在下での歯根膜の機能を明らかにするため、歯根膜細胞がメカニカルストレスを受けることによりいかなる遺伝子の発現プロファイル変化が引き起こされるかについて網羅的に解析を行った。解析の結果、グルタミン酸関連分子の遺伝子発現の上昇が見いだされ、歯根膜細胞の機能発現におけるグルタミン酸シグナルの関与について検討した。

<材料及び方法>

- 1) メカニカルストレス存在下におけるヒト歯根膜細胞の網羅的遺伝子発現解析: 本実験への協力を同意を得た患者から便宜抜歯された歯より、歯根膜組織を採取、培養し、out-growthしてきたヒト歯根膜細胞(以下HPDL)を用いた。HPDLをチャンバーに播種し、培養後、細胞伸展装置に設置し、メカニカルストレスを与えた。伸展刺激の条件は、細胞伸展率 110%、伸展周期 0.5Hz、伸展時間 48 時間とした。48 時間メカニカルストレスを付与した後、抽出した RNA から、aRNA を作製、オリゴ DNA チップ (AceGene, DNA チップ研究所) にハイブリダイズした。メカニカルストレスを付与しなかったものをコントロール群として、遺伝子発現変化を解析した。結果のうち、コントロール群に対して発現上昇率が、2.0 以上を示した遺伝子を抽出した。
- 2) HPDL におけるグルタミン酸関連分子の発現と機能性: メカニカルストレスを与えた HPDL に

おけるグルタミン酸関連分子の遺伝子発現を RT-PCR 解析にて検討した。また、培養上清中に放出されたグルタミン酸量を Glutamate Dehydrogenase を用いた酵素活性法により測定した。HPDL をグルタミン酸 (100 μ M) で刺激した際の細胞内 Ca^{2+} 量の変化を、細胞内 Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fluo 3-AM を用いて測定した。3) HPDL 硬組織形成細胞への分化過程におけるグルタミン酸シグナルの関与: HPDL を石灰化誘導培地 (10%FCS, 10mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid 含有 α -MEM) 中にて 21 日間培養し、3 日おきに培養上清中のグルタミン酸量と ALP (Alkaline Phosphatase) 活性を測定した。さらに、グルタミン酸存在下 (0-100 μ M) で、HPDL を石灰化誘導培地にて 21 日間培養した際の ALP 活性を測定した。4) グルタミン酸シグナル阻害薬が HPDL の硬組織形成細胞への分化に及ぼす影響: グルタミン酸放出阻害薬 Riluzole (0-25 μ M) 存在下で HPDL を石灰化誘導培地にて培養した際の ALP 活性、石灰化物形成、*Runx2*, *ALP* mRNA の発現を解析した。さらに、グルタミン酸受容体アンタゴニスト MK801 (0-100 μ M) 存在下で HPDL を石灰化誘導培地にて培養した際の ALP 活性、石灰化物形成を測定した。5) メカニカルストレスにおけるグルタミン酸シグナルの関与: Riluzole (12.5 μ M) 存在下で、HPDL へメカニカルストレスを与えた時、メカニカルストレスによって誘導される遺伝子 *HOMER1*, *GRIN3A*, *c-fos*, *RUNX2*, *ALP* の遺伝子発現変化を Real-time PCR 解析にて検討した。

<結果>

- 1) DNA チップを用いた遺伝子発現変化の解析により、48 時間メカニカルストレスを加えた群で、2.0 倍以上の発現上昇を認める遺伝子を 17 個認めた。この中には、シグナル伝達に関与する遺伝子である *CNTFR* および *DSCR1* 遺伝子や細胞外マトリックスのリモデリングに関与する遺伝子 *MMP15*、さらに、細胞外マトリックスの構成要素である *LRRFIP1* 遺伝子などの他、機能未知の遺伝子が存在した。さらに、グルタミン酸受容体結合タンパクである *HOMER1* 遺伝子及び、グルタミン酸受容体サブユニットである *GRIN3A* 遺伝子といったグルタミン酸シグナルに関与する遺伝子を見いだした。
- 2) HPDL は、グルタミン酸関連分子 *mGluR2-6* (グルタミン酸代謝型受容体)、*GRIA3*, *GRIN1*, *2C*, *2D*, *3B* (グルタミン酸イオンチャネル型受容体)、*VGLUT1* (グルタミン酸細胞内輸送体) 遺伝子の mRNA も発現しており、この内、*mGluR2-6*, *VGLUT1* 遺伝子はメカニカルストレスによりその mRNA 発現が上昇した。さらに、メカニカルストレスにより、HPDL 細胞内からのグルタミン酸の放出が増加することが明らかとなった。また、HPDL をグルタミン酸で刺激すると、細胞内 Ca^{2+} 流入が増加することが明らかとなった。
- 3) 硬組織形成細胞への分化過程において、HPDL からのグルタミン酸放出が増加することが明らかとなった。さらに、外来性にグルタミン酸を添加することで、HPDL の ALP 活性が有意に上昇した。
- 4) グルタミン酸放出阻害薬 Riluzole 添加により、HPDL の硬組織形成細胞への分化に伴って誘導される ALP 活性、石灰化物形成及び、*Runx2*, *ALP* 遺伝子の mRNA 発現が抑制された。さらに、グルタミン酸受容体アンタゴニスト MK801 添加によっても、ALP 活性、石灰化物形成が抑制されることが示された。
- 5) Riluzole はメカニカルストレスによって誘導される *HOMER1*, *GRIN3A*, *c-fos*, *RUNX2*, *ALP* 遺伝子の mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。

<結論と考察>

HPDL を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、メカニカルストレスにより有意に発現上昇を

認める遺伝子を、グルタミン酸関連分子を含めて 17 個見いだした。さらに、HPDL において、メカニカルストレスを負荷すると、グルタミン酸シグナルが誘導されること、および、メカニカルストレスによって誘導されるグルタミン酸シグナルは HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進させることが明らかとなった。これらの結論より、グルタミン酸シグナルは HPDL が本来有する硬組織形成細胞への分化能を維持する役割を担うことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト歯根膜細胞へメカニカルストレスを加えた際にいかなる細胞特徴の変化がもたらされるかを分子レベルで解明する事を目的として、同細胞の遺伝子発現変動を網羅的に解析すると共に、その結果同定されたグルタミン酸シグナル関連分子の歯根膜細胞における発現・機能について検討したものである。

その結果、メカニカルストレスにて発現が著明に上昇した遺伝子を、グルタミン酸シグナル関連分子を含めて 17 個見いだした。さらに、メカニカルストレスによって誘導されるグルタミン酸シグナルはヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進させることが明らかとなった。

これらの知見は、歯根膜細胞の生物学的特性を解明する上で重要な知見を提供するものであり、博士 (歯学) の学位を授与するのに値するものと認める。