The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯肉線維芽細胞におけるTBP-2による炎症反応制御
Author(s)	菱川, 祥郎
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49765
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

【40】

氏　　名	菱　川　祥　郎（ひし かわ よし ろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２２８６２　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	**歯肉線維芽細胞における TBP-2 による炎症反応制御**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　村上　伸也 （副査） 教　授　豊澤　　悟　　准教授　竹村　元秀　　講　師　墨　　哲郎

論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

プリン代謝産物であるアデノシンは、炎症巣において局所的にその濃度が亢進し、アデノシンレセプターを介して細胞内へシグナルを伝達することにより、炎症反応制御に積極的に関与している可能性が示唆されている。我々の研究室ではこれまでに、歯周病の病態成立においてもアデノシンが重要な役割を演じている可能性を報告してきている。

しかしながらアデノシンレセプターの活性化を介して如何なる遺伝子群が発現調節を受け、その結果、内因性アデノシンの作用が発現するのかについての詳細な分子機構に関しては未だ十分には検討されていない。そこで本研究では、歯周組織の主要構成細胞の一つである歯肉線維芽細胞に対してアデノシン刺激がいかなる遺伝子発現の変動を誘導するのかについて、DNA チップを用いて網羅的に検討を行った。さらに高発現が認められた遺伝子の一つである *Thioredoxin binding protein-2*(*TBP-2*)について解析を行った。

【材料及び方法】

1) 健康辺縁歯肉を採取し outgrowth してきた細胞を継代培養し、得られた細胞をヒト歯肉線維芽細胞（HGF）として実験に供した。

2) HGF をアデノシン(100μM)存在あるいは非存在下で 3, 6, 12, 24 時間培養後、全 RNA を抽出し、解析したタイムポイントのいずれかで発現変化率が 1.8 以上を示した遺伝子を抽出し、Gene spring GX7.3.1 を用いて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。各クラスターに分類されたそれぞれの遺伝子において、その機能や細胞内局在を示す gene ontology (GO) term に基づいて GO 解析を行った。

3) HGF をアデノシン(100μM)存在あるいは非存在下で 3 時間培養後、全 RNA を抽出し、Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array(47,000 Genes)を用いて網羅的に分析し、Gene spring GX7.3.1 を用いて解析した。

4) DNA チップで高い発現が認められた *TBP-2* mRNA について、その発現を、HGF をアデノシン(100μM)存在下で培養後、全 RNA を抽出し、Real time PCR を用いることにより確認した。また HGF をアデノシン（100μM）存在下で、アデノシンレセプターA1 特異的アンタゴニスト(CPX)、アデノシンレセプターA2a 特異的アンタゴニスト(CSC)を添加し、Real time PCR を用いて、*TBP-2* mRNA の発現について解析を行った。

5)マウスより単離してきたマウス歯肉線維芽細胞(MG/B6)を抗生物質非存在下で、24 時間培養後、トランスフェクション試薬と siRNA の複合体を培地中に添加、さらに 24 時間培養し、トランジェントに *TBP-2* を RNAi した細胞株を準備した。また、*TBP-2* 特異的 siRNA をトランスフェクション後、24, 25.5, 27, 30 時間培養し、全 RNA を抽出、その後 Real time PCR を用いて、*TBP-2* mRNA について抑制効果を調べた。

6) *TBP-2* 特異的 siRNA をトランジェントにトランスフェクションされた MG/B6 を用いて、アデノシン(100μM)存在下で、1.5, 3 時間培養後、全 RNA を抽出し、Real time PCR を用いて、ヒアルロン酸合成酵素 1(*Has1*)における mRNA 発現について解析を行った。

【結果】

1) HGF をアデノシンにて 24 時間まで刺激することにより、その発現変化率が 1.8 を超える遺伝子が 822 個見い出された。さらに同遺伝子群はその発現変動パターンに基づき 4 つのクラスターに分類された。また、各クラスターには特徴的な遺伝子群が集積していることが GO 解析により明らかになった。

2) HGF をアデノシンにて 3 時間培養することにより、47 遺伝子の発現の増強（Ratio＞2）を認め、無刺激の場合と比較して *TBP-2* mRNA の発現の著しい増加（Ratio=14.4）が認めら

れた。

3)アデノシン刺激は *Thioredoxin* mRNA 発現に影響を及ぼすことなく HGF 中の *TBP-2* mRNA 発現を上昇させ、その発現は刺激後 3 時間でピークに達することが明らかとなった。

4) アデノシンによる HGF 中の *TBP-2* mRNA 発現の増加は、CSC 添加では、著明な変化は見られなかったが、CPX の添加により抑制されることが確認された。

5) MG/B6 をアデノシンで刺激することにより 1.5 時間後をピークに MG/B6 中の *Has1* mRNA の発現の増強が認められた。またこの MG/B6 中の *TBP-2* mRNA 発現を siRNA により抑制することにより *Has1* mRNA 発現の著明な抑制を認めた。

【考察および結論】

ヒト歯肉線維芽細胞をアデノシン刺激し、DNA チップを用いて網羅的に解析をすることにより生物学的に意味を持つ 822 個の遺伝子が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 4 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、特に刺激培養後 3 時間をピークに発現増加を示すクラスターについては代謝、細胞外基質に関する遺伝子が多く集積していることを認めた。また、アデノシン刺激により HGF 中の *TBP-2* mRNA 発現が著明に増強されることが明らかになり、その作用発現には少なくともアデノシン A1 レセプターが関与している可能性が示唆された。さらに *TBP-2* 特異的 siRNA をトランスフェクションされたマウス歯肉線維芽細胞においてアデノシンによる *Has1* mRNA 発現が抑制された。Has1 は創傷治癒過程において主要な役割を演じる高分子ヒアルロン酸を産生する酵素の一つとして知られており、TBP-2 が細胞外基質産生制御を介して炎症巣における創傷治癒に関わっている可能性が考えられる。また TBP-2 は、ラジカル消去作用や抗酸化作用など細胞内外のレドックス環境を調節すると考えられており、炎症歯周組織における酸化ストレス制御へも関与しているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周病の病態形成におけるアデノシンの関与を分子レベルで解明することを目的として、アデノシンにより発現調節される歯肉線維芽細胞の遺伝子群に関して DNA チップを用いて網羅的に解析したものである。

その結果、ヒト歯肉線維芽細胞をアデノシン刺激することにより著明な発現変動を示す 822 個の遺伝子を抽出するとともに、培養初期に強発現する *TBP-2* mRNA を見出した。さらに、内在性 *TBP-2* mRNA の発現制御実験により、Has 1 の発現制御を介して TBP-2 がアデノシンによる炎症反応制御に関与している可能性が示唆された。

これらの知見は歯周病の病態形成におけるアデノシンの影響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。