



Title	新規歯根膜特異的Periostinアイソフォームの機能解析
Author(s)	田内, 拓史
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57598
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"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉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	田 内 拓 史
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 23738 号
学位授与年月日	平成22年3月23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	新規歯根膜特異的Periostinアイソフォームの機能解析
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 永田 英樹 講師 佐藤 淳

論文内容の要旨

<研究目的>

歯根膜は、歯と歯槽骨という 2 つの硬組織の間に存在するコラーゲン線維に富む非石灰化の結合組織であり、その形態的、機能的な特徴を維持するために、同組織中の細胞外基質が重要な役割を果たしている。我々の研究室では、ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル解析の結果、高い頻度での *Periostin* 遺伝子の発現を既に明らかにしている。*Periostin* はもともと、骨膜、歯根膜に特異的に発現する細胞外基質タンパクとして同定され、最近の研究から *Periostin* は間葉系の細胞に発現しており、癌細胞の転移において上皮間葉転換を促進すること、また心筋梗塞後の心筋の再生・治癒に重要な役割を果たすこと等が明らかとなっている。しかしながら歯根膜における機能についての詳細は、未だ十分に解明されていない。一方、マウスにおいて *Periostin* には機能が異なる複数のアイソフォームの存在が報告されており、当研究室においてヒト歯根膜細胞における *Periostin* アイソフォームの単離を試みた結果、5 種類のアイソフォーム (Type I~V) を単離し、その中でも新規のアイソフォームである Type II の同定に成功している。そこで本研究では、*Periostin* アイソフォームの発現および歯根膜細胞における詳細な機能の検討を、特に歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化に与える影響という観点から行った。

<材料および方法>

1) *Periostin* の発現および機能解析

①人体各組織およびヒト口腔組織由来細胞株における *Periostin* mRNA の発現解析: 人体各組織 (歯根膜、皮膚、肺、心臓、胸腺、腎臓、肝臓、骨格筋、骨髄、脳、脾臓、精巣) および、ヒト口腔組織由来細胞株 (歯根膜細胞、歯髓細胞、歯肉線維芽細胞、歯肉上皮細胞) における *Periostin* mRNA の発現をリアルタイム PCR にて解析した。②ヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程における *Periostin* の発現解析: ヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地 (10% FCS、10 mM β -glycerophosphate、50 μ g/ml ascorbic acid 含有 α -MEM) 中にて長期培養し、3 日おきに採取した全 RNA および全細胞画分を用いて *Periostin* mRNA およびタンパクの発現をリアルタイム PCR およびウェスタンブロットング法にて解析した。③ヒト歯根膜細胞における各種サイトカイン刺激による *Periostin* mRNA の発現解析: ヒト歯根膜細胞を BMP-2 (20 ng/ml)、BMP-4 (20 ng/ml)、TGF- β (20 ng/ml)、IGF-1 (100 ng/ml)、EGF (100 ng/ml)、FGF-2 (100 ng/ml)、PDGF-BB (100 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)、IFN- γ (50 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml) で 48 時間刺激し *Periostin* mRNA の発現をリアルタイム PCR にて解析した。④歯周組織における *Periostin* の発現解析: 6 週齢の C57BL/6 マウスを 4% PFA にて灌流固定した後、上顎組織を採取し、7.5% EDTA にて脱灰を行い、凍結切片法にて厚さ 14 μ m で組織切片を作製した。作製した切片について抗 *Periostin* 抗体を用いた免疫組織染色を行った。⑤歯根膜細胞における *Periostin* の機能解析: 当研究室にて樹立したマウス歯根膜細胞株 MPDL22 に、マウス *Periostin* 特異的 siRNA 発現ベクターを導入し、内在性 *Periostin* 抑制株を作製した。同細胞株を石灰化誘導培地にて培養し、3 日おきに ALPase 活性を測定した。

2) *Periostin* アイソフォームの発現および機能解析

① *Periostin* アイソフォームの発現解析: *Periostin* アイソフォーム特異的プライマーを用いた RT-PCR により、人体各組織およびヒト口腔組織由来細胞株における *Periostin* アイソフォームの発現を解析した。さらに、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程における *Periostin* アイソフォームの発現を RT-PCR にて解析した。②歯根膜細胞への遺伝子導入による機能解析: MPDL22 に *Periostin* アイソフォーム発現ベクターを導入し、 3 H-チミジンの取り込み量を指標に細胞増殖能を比較検討した。また、同細胞株を石灰化誘導培地にて長期培養を行い、3 日おきに ALPase 活性および石灰化物形成能を解析した。さらに、*Periostin* のレセプターとして報告のある Integrin α v に対する中和抗体を添加した際の ALPase 活性および石灰化物形成におよぼす影響を解析した。③ *Periostin* アイソフォームと Integrin α v β 3 との免疫共沈解析: FLAG 標識 Type I あるいは Type II 発現アデノウイルスを感染させた細胞のコンディショニングメディウムとリコンビナントヒト Integrin α v β 3 タンパクを混合し、抗 FLAG 抗体結合ビーズで免疫沈降を行い、抗 Integrin α v 抗体を用いたウェスタンブロットング法にて Integrin α v β 3 の共沈の有無を解析した。

<結果>

1) *Periostin* は他の人体各組織およびヒト口腔組織由来細胞株と比較して歯根膜で高い発現を認

め、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程において経時的に高い発現上昇を示した。また、ヒト歯根膜細胞を BMP-2、BMP-4、TGF- β 、IGF-1 で刺激した際に同遺伝子の発現上昇を認めた。さらに、Periostin はマウス歯周組織の歯根膜に特異的な発現を示し、内在性 Periostin 抑制 MPDL22 株において硬組織形成細胞への分化に伴って上昇する ALPase 活性が有意に抑制された。

2) Type II は他の人体各組織およびヒト口腔組織由来細胞株と比較して歯根膜で高い発現を認め、さらにヒト歯根膜細胞を硬組織形成細胞へ分化誘導した際に高い発現上昇を示した。

Type I, II, III を過剰発現させることで細胞増殖能に差は認めなかったが、Type II を過剰発現した MPDL22 において ALPase 活性および石灰化物形成が有意に促進された。一方、同細胞培養系に抗 Integrin αv 中和抗体を添加することで、Type II により促進された ALPase 活性および石灰化物形成が有意に抑制された。免疫共沈解析の結果、Type II は Integrin $\alpha v \beta 3$ と結合することが明らかとなった。

<結論および考察>

歯根膜特異的 Periostin アイソフォーム Type II は、Integrin $\alpha v \beta 3$ を介して歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化に対して促進的に作用することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜に高い発現を認める細胞外基質タンパクである Periostin に着目し、同分子の発現および、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化におよぼす機能について検討したものである。

その結果、Periostin は歯根膜に特異的に発現を認め、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。さらに、新規のアイソフォームである Periostin Type II は、他のアイソフォームと比較して、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化をより促進すること、その作用発現は Integrin $\alpha v \beta 3$ を介することが示された。

これらの知見は、歯根膜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）の学位を授与するに値するものと認める。