



Title	歯根膜細胞の石灰化過程におけるTGF- β シグナルの機能解析
Author(s)	河原, 貴展
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59268
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

【37】

氏 名	かわ 河 原 貴 展
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯学)
学 位 記 番 号	第 2 5 0 4 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 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	歯根膜細胞の石灰化過程における TGF- β シグナルの機能解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村上 伸也 (副査) 教 授 豊澤 悟 准教授 大倉 正也 講 師 波多 賢二

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

歯根膜は、歯を支持する弾性軟組織としての機能のみならず、歯周組織における創傷治癒や再生において中心的役割を担っている。歯根膜細胞は自己複製能を有しており、骨

芽細胞やセメント芽細胞などの硬組織形成に関わる細胞へと分化する性質を保持している。一方、生体の組織発生・再生並びに創傷治癒過程においては、様々なサイトカインが時空間特異的に作用し、細胞機能を制御することでその生理的機構が維持されている。なかでも TGF- β (Transforming Growth Factor beta) は広汎な組織で発現が認められ、細胞の増殖分化、遊走、接着、アポトーシス、細胞外基質産生といった多様な高次機能発現を通じて生体の恒常性を担うサイトカインである。歯周組織においては歯胚の発生や分化誘導に際し TGF- β を介した細胞内シグナルが発生・分化にとって重要であることが明らかにされている。しかしながら、歯根膜細胞に対して TGF- β シグナルが果たす役割は未だ十分に解明されていない。そこで本研究においては *in vitro* の歯根膜細胞培養モデルを用いて歯根膜細胞に及ぼす TGF- β シグナルの生理的意義を解明することを目的とし、TGF- β I 型受容体阻害剤を用いて歯根膜細胞内の内在性 TGF- β シグナルを遮断することで、同細胞の硬組織形成能に与える影響に注目して解析を行った。

【材料および方法】

マウス歯根膜細胞株 (MPDL22) における TGF- β I 型受容体及びII型受容体、BMP 受容体の発現を RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により検討した。また歯根膜細胞が TGF- β を産生しているか否か ELISA 法を用いて検討した。TGF- β I 型受容体阻害剤 SB431542 が実際に歯根膜細胞において TGF- β シグナルを遮断しているかウエスタンブロット法およびルシフェラーゼアッセイ法を用いて検討した。次にヒト初代培養歯根膜細胞株および MPDL22 をアスコルビン酸および β -グリセロリン酸を含む石灰化誘導培地中で長期培養を行った。その際、BMP-2、TGF- β そして FGF-2 といったサイトカインおよび TGF- β I 型受容体阻害剤 (SB431542、LY364947、Inhibitor II) を時期特異的に添加し、石灰化物形成に及ぼす影響をアルカリフォスファターゼ活性の測定およびアリザリン染色で、また骨芽細胞分化遺伝子の発現を real-time PCR 法により検討した。歯根膜細胞におけるコラーゲン産生は *van Gieson* 染色を行い、細胞増殖については *BrdU* (5-bromo-2'-deoxyuridine) 取り込み試験にて検討を行った。さらに TGF- β I 型受容体阻害剤処理による石灰化物形成促進の遺伝子発現プロファイルを検討する為、DNA マイクロアレイによる網羅解析を行った。

【結果】

MPDL22 は TGF- β I 型受容体及びII型受容体を発現し、BMP 受容体を発現していることを mRNA 並びに蛋白レベルで確認した。TGF- β I 型受容体阻害剤 SB431542 を用いて内在性 TGF- β シグナルを遮断することで、同細胞の増殖は抑制された。次に MPDL22 は TGF- β を恒常的に産生していることを ELISA 法により確認し、SB431542 は MPDL22 において TGF- β により誘導される Smad3 のリン酸化および標的遺伝子の発現を転写レベルで抑制していることを確認した。MPDL22 の石灰化誘導長期培養下に SB431542 を添加すると、BMP-2 誘導性のアルカリフォスファターゼ活性および石灰化物形成の著しい亢進を認め、骨芽細胞分化遺伝子である *Runx2* や *osterix* の mRNA 発現上昇が認められた。また、歯根膜細胞の石灰化誘導長期培養モデルにおいて SB431542 処理を培養期間の初期のみに行っ

た際、石灰化物形成は増強された。一方、SB431542 処理によりコラーゲン産生の低下が認められた。さらに、TGF- β シグナル細胞内刺激伝達系においてネガティブフィードバック機構に関わる遺伝子である *Smad7* や *Smurf1* の mRNA 発現は SB431542 処理により抑制された。当教室において樹立した 3 種類の初代培養ヒト歯根膜細胞株においても、SB431542 を用いて TGF- β シグナルを遮断することで、BMP-2 誘導性の石灰化物形成の亢進が認められた。また異なる化学構造の小分子化合物である TGF- β I 型受容体阻害剤 LY364947 や Inhibitor II を石灰化誘導培地中での長期培養に添加した場合においても、BMP-2 誘導性の石灰化物形成の亢進を認めた。また DNA マイクロアレイによる遺伝子の網羅解析により、TGF- β および BMP シグナルの修飾因子として *Skil*, *Evi2a* といった遺伝子の発現変動を認めた。

【結論および考察】

歯根膜細胞において内在性の TGF- β シグナルは BMP-2 誘導性の石灰化物形成を抑制していた。その細胞内機構の一つとして、BMP シグナルに対しても作用する TGF- β 誘導性のネガティブフィードバック機構の制御が考えられる。また、TGF- β シグナルは初期の分化段階では抑制的に作用する一方、コラーゲンをはじめとする細胞外基質産生を通じて石灰化の成熟は誘導している可能性が示唆された。つまり TGF- β の機能は歯根膜細胞の硬組織形成細胞への各分化過程に特異的に作用していることが示唆された。これは、時期特異的な TGF- β シグナルの遮断がヒトの歯周組織再生治療へと応用できる可能性を示唆するものと考えられ、歯周組織再生過程における歯根膜細胞の特性を理解するうえで重要な情報である。小分子ケミカルライブラリーのスクリーニングにより近年開発された TGF- β I 型受容体の拮抗阻害剤である SB431542 は膜透過性の小分子化合物であり、TGF- β 刺激を特異的に遮断する。このような小分子化合物は化学的に合成される為、リコンビナント製剤に比べて、品質が安定し安価に供給できるという利点を有している。将来的に SB431542 に類する化合物である薬剤と増殖因子の併用療法を開発することにより次世代歯周組織再生療法樹立につながるのではないかと期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜細胞の機能に TGF- β が果たす役割、なかでも石灰化の制御に注目し、TGF- β I 型受容体阻害剤を用いて解析を行ったものである。その結果、TGF- β は BMP-2 にて誘導される歯根膜細胞の初期の石灰化過程に対しては抑制的に作用し、石灰化の後期過程においてはコラーゲン産生の誘導を通じて硬組織形成の制御に関与することが明らかとなった。

以上の研究成果は、TGF- β シグナルの時期特異的な歯根膜細胞への機能を明らかにし、

TGF- β I 型受容体阻害剤を用いた TGF- β シグナルの制御による歯周組織再生療法の開発につながる基盤情報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。