

| | |
|--------------|---|
| Title | ヒト歯根膜完全長cDNAライブラリーを用いた cathepsin Kの同定および機能解析 |
| Author(s) | 尾崎, 亘弘 |
| Citation | 大阪大学, 2012, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/59274 |
| 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。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【36】

| | |
|------------|---|
| 氏名 | お 尾 崎 亘 弘 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（歯学） |
| 学位記番号 | 第 25044 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 | ヒト歯根膜完全長 cDNA ライブラリーを用いた cathepsin K の同定および機能解析 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 村上 伸也 (副査) 教授 天野 敦雄 准教授 小川 裕三 講師 波多 賢二 |

論文内容の要旨

【研究目的】

歯根膜は歯周組織の恒常性維持にとって重要な役割を演じているのみならず、

同組織再生に必須である未分化間葉系幹細胞群の供給源としての機能を担っている。従って、歯根膜に特徴的な形態や機能を分子・遺伝子レベルで理解することは、歯周組織をよりよく理解し次世代の歯周治療を創出する上で重要な知見を与えるものと考えられる。そこで本研究では、歯根膜から完全長 cDNA を多数含むライブラリーを作製し、歯根膜における遺伝子発現状況を 20,000 個の cDNA クローンの解析を目標とし網羅的に解析することを試みた。さらにその結果、これまでにヒト歯根膜での発現や機能について全く報告されていない遺伝子 *cathepsin K* が見出され、*cathepsin K* の歯根膜細胞における発現とその機能について解析を行った。

【材料および方法】

1) ヒト歯根膜完全長 cDNA ライブラリーを用いた歯根膜における機能未知遺伝子の選出：矯正治療患者から便宜抜去された歯の歯根膜を用いてヒト歯根膜完全長 cDNA ライブラリーを作製した。さらに約 20,000 個の cDNA クローンを塩基配列解析し遺伝子発現データベースを構築した。同データベース解析の結果、歯根膜において高頻度で発現が認められ、これまでに歯根膜での発現および機能が報告されていない遺伝子を選出した。

2) ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程における各遺伝子の発現解析：ヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地にて長期培養し、各遺伝子の発現動態を real-time PCR 法により解析した。

3) ウェスタンブロッティング法による *cathepsin K* タンパク発現の解析：ヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地にて培養、経時的に細胞を回収し、RIPA Lysis Buffer を用いて可溶化した全細胞画分をマウス抗・ヒト *cathepsin K* 抗体を用いてウェスタンブロッティング法にて解析した。

4) *Cathepsin K* 酵素活性の測定：上記 2) と同じ条件で長期培養したヒト歯根膜細胞を細胞溶解液にて溶解し、*cathepsin K* 特異的基質と反応させ、*cathepsin K* の酵素活性を測定した。

5) Immunocytochemistry による *cathepsin K*、LAMP-1 の検出：ヒト歯根膜細胞における *cathepsin K* の発現局在を解析するために、抗・ヒト *cathepsin K* 抗体およびリソソームを標的とする抗・ヒト LAMP-1 抗体を用い、蛍光二重染色を行った。

6) *Cathepsin K* 酵素活性抑制による歯根膜細胞分化への影響の検討：*cathepsin K inhibitor II* を石灰化誘導培地に添加し、ヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地にて長期培養を行い、ALPase 活性、石灰化物形成能、real-time PCR 解析を行った。

【結果】

完全長 cDNA ライブラリーよりランダムに抽出された約 20,000 個の遺伝子の

うち発現頻度 30 以上の高頻度の遺伝子を 26 種類見出し、歯根膜 3'末端 cDNA ライブラリーでは発現が確認されなかった遺伝子が 8 種類明らかになった。上記 8 種類の遺伝子のうち、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 *cathepsin K* は最も発現が上昇した。

Cathepsin K はヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化誘導に伴い、mRNA および活性型 *cathepsin K* タンパクの発現が著明に上昇すること、さらにその酵素活性が上昇することが明らかとなった。ヒト歯根膜細胞において *cathepsin K* のリソソームへの発現局在が認められた。*Cathepsin K* の酵素活性を抑制することで、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化誘導過程において、ALPase 活性および *RUNX2* 発現への影響は及ぼさない一方、石灰化物形成の亢進、*collagen type I* や *osteocalcin* などの ECM 関連遺伝子の発現上昇が認められた。

【結論および考察】

ヒト歯根膜完全長 cDNA ライブラリーを作製し解析することにより、ヒト歯根膜で高い発現頻度を示すにもかかわらず、これまでに歯根膜における発現や機能について全く報告されていない遺伝子を抽出することが可能となった。その一例として、ヒト歯根膜における *cathepsin K* の発現が初めて見出された。ヒト歯根膜細胞において *cathepsin K* はリソソーム内に恒常的に発現しており、歯根膜細胞内に取り込まれた *collagen type I* や *type III* などを分解することにより、ECM 中の適切な *collagen* 量を一定に保つという同細胞の恒常性を維持している。一方、歯周組織の修復・再生時に歯根膜細胞の骨芽細胞、セメント芽細胞などの硬組織形成細胞への分化誘導過程において、*cathepsin K* が *collagen type I* や *type III* などの ECM を分解し、代謝、再構築することで、制御的に機能しているものと考えられる。これらの機能により、歯周組織において、*collagen* の分解代謝を担う分子として *cathepsin K* が発現することで、歯周組織中の *collagen* が分解され、*collagen* が新たに生産されるという *collagen* 代謝を介して、歯根膜の恒常性の維持、歯周組織の修復・再生へ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、歯根膜から完全長 cDNA を多数含むライブラリーを作製、解析することを試み、これまでにヒト歯根膜での発現や機能について全く報告のされていない遺伝子 *cathepsin K* が見出され、*cathepsin K* の歯根膜細胞における発現とその機能について解析を行ったものである。

その結果、*cathepsin K* が歯根膜において恒常的に高発現していること、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化誘導過程において発現が上昇し細胞外基質代謝を介して同分化過程に対し制御的に機能していることが明らかとなった。

以上の知見は、歯周組織において、コラーゲンの分解代謝を担う分子として *cathepsin K* が発現することで、コラーゲン代謝を介して、歯根膜の恒常性の維持、歯周組織の修復・再生へ関与しているものと考えられるという新たな知見を報告するものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。