

学 位 論 文 題 名

Expression of N-cadherin and cadherin-11
in human periodontal ligament fibroblasts

（ヒト歯根膜線維芽細胞における N-cadherin および cadherin-11 の発現）

学位論文内容の要旨

【 緒 言 】

近年、ヒト歯根膜線維芽細胞（以後、PDLF）はギャップ結合およびデスモゾームを構成する蛋白を発現することが明らかにされた。ギャップ結合はセカンドメッセンジャーの通路であり、組織細胞間の固定結合である接着結合およびデスモゾームとは異なる。固定結合は、心臓・皮膚など機械的刺激を強く受ける組織に多く分布しており、応力に対する生体防御を担っている。

一方、歯根膜は、歯根膜線維を主体とする靱帯組織であり、介在する PDLF は歯根膜線維と固定結合を形成してその配向に貢献すること、また細胞同士は固定結合することで生活活性を維持することが考えられる。デスモゾームに関する最近の我々の研究において、PDLF はデスモゾーム蛋白のうちデスモプラキンを産生するものの、細胞膜には発現しないこと、またデスモゾームカドヘリンを発現しないことが明らかにされた。そこで我々は PDLF がデスモゾーム以外のもう一つの固定結合である接着結合によって細胞間結合を形成する可能性を考えた。接着結合の構成分子はクラシックカドヘリンであり、その細胞外領域にある接着領域は隣接細胞の同種カドヘリンと結合する。また細胞内領域はカテニンを介して細胞骨格であるアクチンフィラメントに結合し固定結合の安定化に貢献する。クラシックカドヘリンは、接着領域にヒスチジン・アラニン・バリンモチーフを含むタイプ I カドヘリンと、これを含まないタイプ II カドヘリンとに分けられる。一般的な発現が報告されているクラシックカドヘリンとして、タイプ I カドヘリンでは上皮細胞が発現する epithelial cadherin（以後、E カドヘリン）、間葉系細胞が発現する neural cadherin（以後、N カドヘリン）、またタイプ II カドヘリンでは間葉系細胞が発現するカドヘリン 11 がある。細胞間における接着結合の存在は、これらカドヘリンに対する免疫染色によって光学顕微鏡下で同定することができる。そこで本研究は、PDLF が細胞間接着結合を形成する可能性を検討することを目的として、PDLF における E カドヘリン、N カドヘリンおよびカドヘリン 11 の発現を検索した。

【 材料と方法 】

1) PDLF の確立

矯正治療を理由として抜去された小白歯（17-30 才、n=3）と、カリエスのため抜去された第3大臼歯（23-30 才、n=4）を用いた。歯根表層から根尖部と歯頸部を含まずに歯根膜組織を採取し、血清および抗生物質を添加した DMEM で培養した。得られた細胞に対して、アルカリフォスファターゼに対する酵素染色およびオステオネクチンに対する免疫染色を行い、アルカリフォスファターゼ活性とオステオネクチンの陽性細胞のみからなるクローンを確立し、PDLF（第 2-4 継代細胞、population doubling 2-4）とした。また、ヒト胎児肺線維芽細胞（IMR-90）とヒト正常表皮角化細胞（PHK16-0b）を以下の検索の対照として用いた。

2) 免疫染色

PDLF、IMR-90 および PHK16-0b に対して、抗ヒト E カドヘリンモノクローナル抗体、抗ヒト N カドヘリンポリクローナル抗体、および抗ヒトカドヘリン 11 モノクローナル抗体を反応させ、Alexa 488 標識2次抗体で可視化した後、レーザー顕微鏡で 0.5 μm 厚の光学切片にてカドヘリン発現を検索した。

3) RT-PCR

PDLF、IMR-90 および PHK16-0b から全 RNA を抽出した。全 RNA に対して、すでに塩基配列の報告されているプライマーを用いて E カドヘリン、N カドヘリンならびにカドヘリン 11 の mRNA 発現を検索した。

4) Western blotting

PDLF および IMR-90 を用いた。培養シャーレで 100% コンフルエントとなった培養細胞をスクレイパーで採取し、RIPA 緩衝液に溶解した。細胞溶解液について SDS-PAGE を行った後、蛋白を PVDF 膜に転写し、免疫染色で使用したのと同じ抗カドヘリン抗体によって PVDF 膜を処理した。その後、ペルオキシダーゼ標識2次抗体と酵素発色基質を用いて抗体反応産物を可視化した。

【 結果 】

PDLF、および IMR-90 は E カドヘリンを遺伝子レベルで発現しなかった。PDLF は N カドヘリンを核に強く発現し、細胞質においても発現が見られた。しかし、隣接細胞との接触部位には発現しなかった。また、PDLF はカドヘリン 11 を隣接細胞との接触部位に発現した。これに対して IMR-90 は N カドヘリンとカドヘリン 11 の両者を隣接細胞との接触部位に発現した。隣接細胞との接触部位におけるカドヘリン 11 の発現は、PDLF では IMR-90 よりも少なかった。PDLF は N カドヘリン mRNA を IMR-90 より弱く、またカドヘリン 11 mRNA を IMR-90 と同程度に発現した。さらに、PDLF は N カドヘリン蛋白を IMR-90 より少なく、またカドヘリン 11 蛋白を IMR-90 と同程度に発現した。

なお、PHK16-0b は E カドヘリンを発現したものの、N カドヘリンとカドヘリン 11 に関しては mRNA を発現し、蛋白を発現しなかった。

【考察】

PDLF は隣接細胞との接触部位にカドヘリン 11 を発現したことから、PDLF がカドヘリン 11 によって細胞間接着結合を形成することが示唆された。PDLF は隣接細胞との接触部位に N カドヘリンを発現しなかった。しかしながら対照とした IMR-90 は隣接細胞との接触部位に N カドヘリンとカドヘリン 11 の両者を発現したこと、また隣接細胞との接触部位におけるカドヘリン 11 の発現は PDLF では IMR-90 よりも少なかったことから、歯根膜組織における主要な固定結合は細胞間接着結合ではなく、むしろ細胞-マトリックス間結合である可能性が考えられた。

本研究ではオステオネクチン産生細胞を PDLF として用いた。一方、N カドヘリンはカルシウムイオンが奪われることで立体構造が変わり、細胞膜から外れること、またオステオネクチンはカルシウム結合型タンパクで、細胞外マトリックスに存在して抗接着分子として機能することが知られている。本研究では PDLF における N カドヘリンの産生は IMR-90 より少なく、また N カドヘリンの細胞質内分布は観察されたものの、IMR-90 とは異なり、隣接細胞との接触部位における発現は見られなかった。これらのことから、PDLF が産生するオステオネクチンが細胞膜における N カドヘリンの発現を抑制する可能性が考えられた。

さらには、PDLF は IMR-90 とは異なり、N カドヘリンを核に強く発現した。現在、骨芽細胞やある種の腫瘍細胞において、N カドヘリンがカテニン類を介して転写因子を活性化することで、分化調節因子として種々の細胞内情報伝達に貢献する可能性が考えられている。N カドヘリンは PDLF においても、細胞内情報伝達などの細胞接着以外の機能を担うかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生

副 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

Expression of N-cadherin and cadherin-11 in human periodontal ligament fibroblasts

(ヒト歯根膜線維芽細胞における N-cadherin および cadherin-11 の発現)

審査は、吉田、脇田および川崎の各審査担当者が個別に、学位申請者に対して提出論文の内容ならびにそれに関連する学科目について口頭試問により行った。

歯根膜線維芽細胞 (PDLF) は隣接する歯根膜線維芽細胞および歯根膜線維と結合することで生活活性を維持していると考えられている。近年、学位申請者らの研究グループは、ヒト歯根膜線維芽細胞が gap junction (Gj) を有すること、および desmosome (Des) 構成蛋白の一部を発現することを明らかにした。しかし、Gj はセカンドメッセンジャーの通路であり、厳密な意味での細胞間結合装置ではない。また Des についても、発現する蛋白は Des 構成蛋白の一部のみであるので、PDLF が細胞間結合装置として Des を有している可能性は少ない。そこで学位申請者は、本研究で PDLF が adherens junction (Aj) によって結合する可能性を検討することにした。なお、対照としてヒト肺線維芽細胞 (IMR-90) を用いた。

Aj の構成分子は classic cadherin であり、その細胞外領域にある接着領域は隣接細胞の同種 cadherin と結合する。そのため、細胞間における Aj の存在は cadherin に対する免疫染色を施すことによって光学顕微鏡下で同定することが可能である。そこで学位申請者は、培養ヒト PDLF を用い、Aj に関連すると考えられている E-cadherin, N-cadherin, ならびに cadherin-11 の発現を免疫染色, western blotting, および RT-PCR により検索した。

その結果、学位申請者は① PDLF と IMR-90 の両者とも N-cadherin と cadherin-11 の mRNA と蛋白の両者を発現するが、E-cadherin については mRNA レベルでも発現しないこと。② N-cadherin の発現は、IMR-90 では隣接細胞との接触部位で強く、細胞質で弱く、核では全くみられないのに対し、PDLF では隣接細胞との接触部位ではみ

られず、細胞質で弱く、核で強くみられること。③一方で、cadherin-11 の発現は、IMR-90, PDLF の両者とも隣接細胞との接触部位で強く、細胞質で弱く、核では全くみられないこと。④しかし、PDLF での隣接細胞との接触部位における cadherin-11 の発現は、IMR-90 に比べると明らかに弱いこと。⑤また、PDLF における N-cadherin mRNA の発現は IMR-90 よりも弱く、cadherin-11 mRNA の発現は IMR-90 と同程度であること、などを明らかにした。

これらの結果から、学位申請者は、PDLF は cadherin-11 によって Aj を形成している可能性があるが、対照として用いた IMR-90 が隣接細胞との接触部位に N-cadherin と cadherin-11 の両者を発現したのに対し、PDLF は cadherin-11 しか発現しなかったこと、ならびにその発現は IMR-90 よりも明らかに弱かったことを考えると、その結合対象は、隣接細胞と言うよりはむしろ細胞間マトリックスである可能性が高いのではないかと述べている。また、PDLF の核における N-cadherin の強い発現は、細胞内情報伝達などの機能に関与しているのではないかと推測している。

これに対し、各審査担当者から

1. 咬合力に対する歯根膜線維芽細胞の関与
2. 歯根膜線維芽細胞の特異性
3. 細胞接着に関連する因子
4. cadherin の機能
5. 歯根膜線維芽細胞が核内に N-cadherin を発現することの意味
6. PHK16-0b における N-cadherin と cadherin-11 の mRNA 発現の意味
7. 本研究の発展性ならびに将来展望

などに関する口頭試問が行われたが、いずれの質問に対しても明快な回答が得られたことから、学位申請者は本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野全般に亘って広い学識を有していると認められた。また、本研究は、歯根膜線維芽細胞の特異性を明らかにするための一連の研究の中で重要な位置を占めるものであり、研究の将来性も十分に高いと評価された。

そこで主査ならびに副査は、学位申請者は博士（歯学）の学位を授与されるにふさわしいと認めた。