

学位論文題名

ヒト歯根膜細胞に対するポリリン酸の 細胞運動亢進効果について

学位論文内容の要旨

[目的]

歯周病は、高齢化の進行で患者数はますます増加することが予測されている。そのため、歯周組織再生療法の早期の実現化が望まれている。ポリリン酸は、リン酸が直鎖上に重合した生体高分子で、食品の変色防止剤などとして使用され人体への安全性が確立されている物質である。ポリリン酸は、細菌からほ乳類までほとんど全ての生体内に存在しており、原核生物では様々な生物学的機能が明らかにされているが、真核生物における役割はほとんど知られていない。最近、ポリリン酸が FGF を安定化することや、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の osteocalcin や osteopontin 遺伝子の発現を誘導すること、口腔内細菌である *P.gingivalis*, *S.mutans* の増殖抑制をすることが明らかになった。さらに、ラットに作製した人工的歯周病モデルを用いてポリリン酸の効果を評価した結果、ポリリン酸投与群ではセメント質・歯槽骨の再生が促進され、その効果が注目されている。

本研究では、歯周組織再生に必要な歯根膜に着目し、その歯根膜の主な構成成分である歯根膜線維芽細胞の走化性におよぼすポリリン酸の影響について検索した。

[材料と方法]

北海道大学病院歯科診療センターで埋伏智歯抜歯時に抜去歯牙に付着した歯根膜組織から単離したヒト由来歯根膜線維芽細胞（PDL）を継代し実験に用いた。この PDL を平均鎖長 65 のポリリン酸ナトリウム溶液あるいはオルソリン酸溶液（コントロール）で処理し実験を行った。

Boyden チャンバーの下部チャンバーにポリリン酸やコントロールを含む試験培地を、上部チャンバーには細胞懸濁液を入れ 6 時間培養し、membrane 裏側に移動した細胞数を顕微鏡下で測定し細胞走化性におよぼす影響を検索した。

ポリリン酸あるいはコントロール培地でPDLを6時間培養後、Rhodamine phalloidin 染色、さらに細胞核をDAPIで染色し、アクチン再構成におよぼすポリリン酸の影響を検索した。同様の培養条件下の細胞からタンパクを抽出し、活性化型 RhoA の検出は Rho Activation Assay Kit を用いた pull-down アッセイで、Rac1,FAK,JNK/SAPK のリン酸化はウェスタンブロットにより検索した。

[結果と考察]

歯根膜線維芽細胞は歯根膜の主な構成成分であり、歯周疾患により破壊された歯根膜の再生には、歯根膜線維芽細胞の運動と伸展が必要である。細胞運動能の亢進は、このような歯根膜線維芽細胞による歯周組織の再生において重要な役割を担っている。本研究では、歯根膜細胞を使用し歯根膜へのポリリン酸の効果を検索した。

歯根膜細胞の細胞運動におけるポリリン酸の効果を明らかにするために、Boyden チャンバーを用いて検索した。この結果、ポリリン酸は歯根膜線維芽細胞の細胞運動能を有意に亢進した。

細胞運動にはアクチンファイバーの形成を伴った細胞骨格の再構築が必要である。Rhodamine phalloidin で細胞の免疫蛍光染色を行いアクチンファイバーの局在を検索した。その結果、ポリリン酸は発達したアクチンを形成し、細胞の辺縁部では葉状仮足形成が認められたが、コントロールでは認められなかった。細胞の葉状仮足の突出は、細胞運動における最初の過程であると考えられている。最近、葉状仮足形成増加により膜ラッフルの形成が促進され、高い運動活性を持つことが明らかになっている。今回の検索の結果、ポリリン酸は歯根膜線維芽細胞のアクチンファイバー形成、葉状仮足形成を亢進し、高い運動活性をもつことが示された。

インテグリンは、細胞膜における接着因子として細胞外マトリックスとの接着に関与するだけでなく、細胞内シグナル伝達系においても重要な役割を演じている。インテグリンシグナル伝達の下流にはFAKが存在し、FAKシグナルはアクチン細胞骨格の構築を制御する Rho ファミリーに伝えられる。FAK のリン酸化について検索した結果、ポリリン酸処理により、約3倍の FAK リン酸化の亢進が認められた。Rho ファミリーは、アクチン細胞骨格の構築を制御するだけでなく様々な生理機能に関与することが報告されている。Rho ファミリーの中で、RhoA はアクチン細胞骨格の構築に作用し、Rac1 は葉状仮足形成と膜ラッフル形成に作用する。ポリリン酸による Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性について検索した結果、ポリリン酸処理により、RhoA は僅かながら活性が亢進したが有意な差は認められなかった。

一方、Rac1 のリン酸化は約 2.5 倍に亢進された。このため、ポリリン酸は、Rac1 を選択的に活性化し、歯根膜細胞の運動の際に、細胞辺縁部の葉状仮足形成と膜ラッフリングを亢進し、高い細胞運動活性に繋がる可能性が示唆された。

FAK, Rac1 のリン酸化により MAPK である JNK/SAPK の活性化が報告されている。ポリリン酸が FAK, Rac1 のリン酸化を亢進したため JNK/SAPK の活性化について検索した。その結果、ポリリン酸処理により、JNK/SAPK リン酸化は約 4 倍に亢進した。一般に、JNKs は分化やアポトーシスの誘導で重要な役割を持つと考えられているが、ポリリン酸が FAK, Rac1 の活性化を通じて、JNK/SAPK のカスケードを亢進し、細胞運動に関与した可能性が示唆された。

本研究の検索結果により、ポリリン酸は、インテグリンの下流の FAK リン酸化を亢進し、それに続く Rho ファミリーの活性化、そして、その下流の MAPK の JNK/SAPK リン酸化を亢進する歯根膜細胞内シグナル伝達カスケードの存在が明らかになった。Rho ファミリーの中でも Rac1 が特異的に亢進されたことから、ポリリン酸は細胞運動に関与するタンパクを選択的に活性化し、アクチンファイバーの形成亢進、葉状仮足形成が亢進され高い運動活性を生じる可能性が示唆された。

【結論】

歯周組織再生に必要な歯根膜の主な構成成分であるヒト歯根膜線維芽細胞の走化性におよぼすポリリン酸の効果について検索した。その結果、ポリリン酸はヒト歯根膜線維芽細胞の Rho ファミリー-Rac1 をリン酸化し、アクチン重合形成、葉状仮足形成を亢進し細胞運動を活性化することが示された。ポリリン酸が、細胞の活性化を通じて歯根膜形成促進に関与できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

ヒト歯根膜細胞に対するポリリン酸の 細胞運動亢進効果について

審査は、審査員全員が出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

論文の審査にあたって、論文申請者により以下に示す研究要旨の説明が行われた。

歯周病は、高齢化の進行で患者数はますます増加することが予測されている。そのため、歯周組織再生療法の早期の実現化が望まれている。ポリリン酸は、リン酸が直鎖上に重合した生体高分子で、細菌からほ乳類までほとんど全ての生体内に存在しており、原核生物では様々な生物学的機能が明らかにされているが、真核生物における役割はほとんど知られていない。申請者は、歯周組織再生に必要な歯根膜に着目し、その歯根膜の主な構成成分である歯根膜線維芽細胞の走化性におよぼすポリリン酸の影響について検索した。

北海道大学病院歯科診療センターで埋伏智歯抜歯時に抜去歯牙に付着した歯根膜組織から単離したヒト由来歯根膜線維芽細胞 (PDL) を継代し実験に用いた。この PDL を平均鎖長 65 のポリリン酸ナトリウム溶液あるいはオルソリン酸溶液 (コントロール) で処理し実験を行った。Boyden chamber を用いて細胞走化性を検索したところ、ポリリン酸は有意に細胞走化活性を亢進し、1mM の濃度で最も高い活性が認められた。細胞運動の際には、細胞骨格の再構築がおこりアクチン重合が活発に行われることが知られている。ポリリン酸が細胞走化性を亢進したため、Rhodamine phalloidin で細胞を蛍光染色し、アクチンファイバーの局在について検索した。その結果、ポリリン酸処理した細胞ではコントロールに比べ発達したアクチンファイバーがみら

れ、細胞辺縁部では葉状仮足形成が認められた。細胞の接着依存性増殖や細胞外マトリックス上での細胞移動では、FAK (Focal adhesion kinase) が重要であることが明らかになっている。FAK はインテグリンからの刺激を受けるだけでなく、細胞内シグナル伝達系において細胞運動に関与する Rho ファミリーの上流に位置する。そこで、FAK のリン酸化について検索したところ、ポリリン酸処理により FAK リン酸化は約 3 倍に亢進した。次いで、Rho ファミリー (RhoA、Rac1) へのポリリン酸の影響について検索した。RhoA の pull-down アッセイにより、ポリリン酸処理細胞では、RhoA の有意な活性亢進はみられなかったが、Rac1 はポリリン酸処理により、約 2.5 倍のリン酸化亢進がみられた。Rac1 のリン酸化により MAPK の一つである JNK/SAPK の活性化が報告されている。ポリリン酸が Rac1 のリン酸化を亢進したため JNK/SAPK の活性化について検索した。その結果、ポリリン酸処理により、JNK/SAPK リン酸化は約 4 倍に亢進した。

本研究の検索結果により、ポリリン酸は、FAK リン酸化を亢進し、それに続く Rac1 の活性化、そして、その下流の MAPK の JNK/SAPK リン酸化を亢進する歯根膜細胞内シグナル伝達カスケードの存在が明らかになった。Rho ファミリーの中でも Rac1 が特異的に亢進されたことから、ポリリン酸は細胞運動に関与するタンパクを選択的に活性化し、高い運動活性を生じることが示され、ポリリン酸が、細胞の活性化を通じて歯根膜形成促進に関与できる可能性が示唆された。

その後、本研究ならびに関連する研究について審査担当者からの質問が行われた。主な質問項目は、

- 1) ポリリン酸の作用はインテグリンによる細胞接着から始まるのか細胞内にダイレクトにはたらくのか
- 2) 細胞接着に作用するとしたらどのようなメカニズムなのか
- 3) FAK の kinase domain と Rac1 の関係はどのようになっているのか
- 4) Rho inhibitor と細胞運動能の抑制機構
- 5) 歯根膜細胞以外で走化性の亢進はみられるのか
- 6) 今後の展望

などであり、申請者から適切かつ明快な回答が得られた。実験手技についても詳細を熟知していることが明らかになり、関連する分野について幅広い知識を有し、今後の研究に対して積極的に向かう姿勢が示され、申請者は学位を授与するに十分な学識・資質を有していることが明らかになった。本研究の成果は、今後ますます必要性が増すと思われる再生医療に寄与するところが大きいと考えられ、学位を授与されるにふさわしいものと認められた。