

氏名	鵜川 祐樹
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4518号
学位授与の日付	平成24年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	アクチン細胞骨格を制御する Rho kinase が歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞への分化に及ぼす影響
学位論文審査委員	教授 山本 敏男      教授 高柴 正悟 准教授 久保田 聡

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

歯根膜は、セメント質と歯槽骨を結ぶ線維性の結合組織であり、コラーゲンのターンオーバー、セメント質の吸収・修復、歯槽骨の改造などを調整することで歯周組織の恒常性維持を担っている。歯根膜の主要な細胞成分である歯根膜線維芽細胞は、高いコラーゲンの合成・分解能を示すとともに、alkaline phosphatase (ALP) 活性も示しており、硬組織形成細胞への分化は、歯周組織の創傷治癒や再生に必須であると考えられているが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。

細胞が分化するためには、成長因子によるシグナルだけでなく、細胞外マトリックス (ECM) によって細胞の微小環境が整えられる必要があり、これら環境変化に対する細胞骨格の性状変化が分化制御に重要であると考えられている。さらに、Rho kinase (ROCK) はアクチン細胞骨格の制御を介して、細胞とECMとの接着に関与することが報告されている。以上のことから、ECM-細胞骨格複合体は細胞分化の重要な制御機構であると考えられる。

本研究では、ECMによって歯根膜線維芽細胞が分化するメカニズムに対するROCKの影響を調べることを目的に、歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞への分化における、アクチン細胞骨格の発現、ECMの発現、およびECMの分化シグナルに対するROCK阻害剤の影響を調べた。

### 【材料・方法】

1. **歯根膜線維芽細胞の分離・培養**：健康な歯周組織を有するドナーの抜去智歯から歯根膜組織を採取し、既報 (Seo, *et al*, *Lancet* 2004) に従い歯根膜線維芽細胞を分離した。ECM基材を用いた培養は、ECMコーティングプレート上で行った。硬組織形成細胞への分化誘導は、50  $\mu$ M ascorbic acid-2-phosphate, 100 nM dexamethasone, および 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate を添加した培地を用いて、12日間培養した。ROCK阻害剤は、Y-27632を用い、24時間ごとに添加した。
2. **細胞増殖活性の測定**：細胞増殖活性に対するROCK阻害剤の影響を、MTS法を用いて調べた。
3. **ALP染色法**：ナフトールを発色基質として染色し、ALP陽性細胞を観察した。

4. 免疫蛍光染色法：Filamentous actin (F-actin) は AlexaFluor<sup>®</sup>594-phalloidin を用いて、ECM 分子は抗 procollgen type I 抗体および抗 fibronectin 抗体と AlexaFluor<sup>®</sup>488 を用いて処理し、タンパク局在を蛍光顕微鏡下で検出した。
5. ウェスタンブロット法：抗 F-actin 抗体を用いて硬組織形成細胞への分化時のアクチンの蛋白産生を定量解析した。
6. リアルタイム RT-PCR 法：全 RNA を抽出し、*collagen type I*, *fibronectin-1* および ALP 発現量を、蓄積された mRNA 量として定量解析した。
7. ALP 活性：*p*-ニトロフェニルリン酸を基質として、細胞内の ALP 活性を定量解析し、硬組織分化の指標とした。
8. 統計処理：全ての実験系は、Student's *t*-test を用いて検定した。なお、*p* 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

### 【結果】

1. 分化誘導培地で細胞を培養すると  $\alpha$ -MEM で培養した細胞と比較して、ALP 陽性細胞数の割合が増加し、F-actin の免疫蛍光シグナルが増強した
2. 細胞増殖活性は、20  $\mu$ M の ROCK 阻害剤で減少傾向を示し、50  $\mu$ M 以上で有意に減少した
3. F-actin の蛋白産生量は、ROCK 阻害剤の濃度に依存的に低下した
4. ALP 発現および ALP 活性は経時的に増加したが、ROCK 阻害剤添加群ではそれらが分化誘導開始後 12 日目に抑制された
5. 分化誘導開始後 12 日目に *collagen type I* および *fibronectin-1* は発現していたが、ROCK 阻害剤添加群ではそれらが抑制され、procollgen type I および fibronectin の免疫染色シグナルは、ROCK 阻害剤添加群では減弱していた
6. Collagen type I および Fibronectin をコートしたプレートで培養すると、コートしていないプレートと比較して、9 日目および 12 日目における ALP 活性は増加したが、ROCK 阻害剤添加群ではその活性が抑制された

### 【考察】

歯根膜線維芽細胞は、ECM の産生に伴って硬組織形成細胞に分化することによって、歯周組織の創傷治癒や再生に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究は、歯根膜線維芽細胞の分化を制御する微小環境、とりわけ ECM - アクチン細胞骨格複合体と ROCK による分化制御機構に着目した。本研究結果から、歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞への分化において、ROCK が制御するアクチン細胞骨格が増強すること、さらに ROCK 阻害剤によって、歯根膜線維芽細胞の ECM 発現が抑制され、ECM 刺激による硬組織形成細胞への分化が抑制されることが明らかになった。すなわち、ROCK は、アクチン細胞骨格を介して ECM からのシグナルを伝達する役目を果たしていると考えられる。

歯周組織の恒常性維持のためには、歯根膜線維芽細胞の環境因子である成長因子、ECM、そして細胞骨格のそれぞれが協調して、適切に細胞内シグナリングを調整することが必要である。歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞分化において ROCK が制御する微小環境調整の概念を応用することは、歯周治療後の創傷治癒・再生のメカニズムを解明する分子基盤となり得ると考えられる。

### 【結論】

ROCK は、ECM の発現を制御し、ECM による分化シグナルを伝達することで、歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞への分化に関与する。

## 学位論文審査結果の要旨

歯根膜は、セメント質と歯槽骨を結ぶ線維性の結合組織であり、コラーゲンのターンオーバー、セメント質の吸収・修復、歯槽骨の改造などを調整することで歯周組織の恒常性維持を担っている。歯根膜の主要な細胞成分である歯根膜線維芽細胞は、活発なコラーゲンの合成・分解能を示すとともに、alkaline phosphatase (ALP) 活性も示すことが知られている。歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞への分化は、歯周組織の創傷治癒や再生に必須であると考えられているが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。

細胞が分化するためには、成長因子によるシグナルだけでなく、細胞外基質 (ECM) によって細胞の微小環境が整えられる必要がある。これら環境変化に対する細胞骨格の変化が分化制御に重要であると考えられている。一方、Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) はアクチン細胞骨格の制御を介して、細胞とECMとの接着に関与することが報告されている。以上のことから、ECM - 細胞骨格系は細胞分化の重要な制御機構であると考えられる。

本研究は、ECM による歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞への分化機構における ROCK の影響を調べることを目的に、分化時におけるアクチン細胞骨格の動態、ECM の発現、および ECM の分化シグナルに対する ROCK 阻害剤の影響を調べた。

研究結果は、以下の内容であった。

- 1) 歯根膜線維芽細胞の硬組織形成細胞への分化において、分化誘導開始後12日目にアクチンの発現およびECMの遺伝子発現は、ROCK阻害剤添加群で非添加群と比較して減少した。
- 2) collagen type Iおよびfibronectinをコートしたプレートで歯根膜線維芽細胞を培養すると、コートしていないプレートで培養した細胞と比較して、9日目および12日目におけるALP活性は増加したが、ROCK阻害剤添加群では非添加群と比較してALP活性が減少した。

以上の所見より、本論文では、歯根膜線維芽細胞において ROCK は、ECM 産生を制御し、さらに ECM からのシグナルを伝達することで硬組織形成細胞への分化を制御している可能性が示された。これらの結果は、歯周治療後の創傷治癒・再生のメカニズムを解明する上で細胞骨格の関与を考慮することはきわめて重要である、と今後の課題を示した。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文に博士（歯学）の学位論文として価値があるものと認めた。