

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍)	八 城 祐 一 (神奈川県)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 429 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目	Function of chemokine (CXC motif) ligand 12 in periodontal ligament fibroblasts (歯根膜線維芽細胞の CXCL12 の機能について) PLOS ONE impress
論 文 審 査 委 員	主査 教授 佐藤哲二 副査 教授 花田信弘 副査 教授 中村芳樹

内 容 の 要 旨

研究目的

Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) は造血幹細胞に対する遊走作用が知られているが、近年、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSCs) にもその受容体 CXCR4 が発現し CXCL12 が MSCs を遊走させるという報告もされている。MSCs は骨芽細胞などに分化することが多くの研究で明らかとなっている。CXCL12 は全身各所の組織に発現していることが動物モデルで示されているが、ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDLF) における CXCL12 遺伝子の発現や機能を検討した報告は少ない。本研究の目的は HPDLF における CXCL12 の発現及び MSCs 遊走能、また遊走後の MSCs 遺伝子発現の変化を検討することである。

【諸言】歯根膜は他の結合組織と比較して非常に代謝回転が速く、この代謝を担うのは歯根膜線維芽細胞(PDLFs)であるといわれている。しかし、この歯根膜の線維芽細胞の供給については不明な点が多い。我々はこの PDLFs の発現遺伝子の網羅的解析から、線維芽細胞や骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)に対する走化性をもつ遺伝子 Chemokine ligand12 の高い発現を認めた。本研究の目的はヒト歯根膜線維芽細胞(HPDLFs)における CXCL12 の発現および MSCs の走化性を検討し、PDLFs における CXCL12 の機能を明らかにすることである。

【資料および方法】ヒト歯根膜線維芽細胞(HPDLFs)およびヒト皮膚線維芽細胞(HDFs)を用い、マイクロアレイ解析により細胞内発現遺伝子を網羅的に比較検討し、次いで qRT-PCR (mRNA levels) 及び ELISA(protein levels)により CXCL12 発現量を解析した。さらに HPDLFs における CXCL12 の機能的解析を目的として MSCs を用いた Migration assay を行った。また、CXCR4 中和抗体、AMD3100 (CXCR4 低分子阻害剤) の影響についても検討した。Migration 後の MSCs 発現遺伝子プロファイルの変化を検討するため、HPDLFs およびリコンビナントタンパク (CXCL12)、HPDLFs(CXCL12-siRNA)の Condition Medium(CM)を使用し、MSCs を 24 時間暴露させた後、そ

の MSCs の発現遺伝子について qRT-PCR により検索した。全ての実験において siRNA 導入によるノックダウン実験を行った。コントロールとしてはスクランブル siRNA を用いた。CXCL12 の局在についてもラット歯根膜領域のパラフィン切片を使用し免疫組織学的に検討した。

【結果】マイクロアレイ解析の結果より、HPDLFs の CXCL12 の発現は HDFs の 200 倍以上の高発現を認めた。また RT-PCR、qRT-PCR、ELISA の結果からもマイクロアレイと同様の結果が得られた。また siRNA の導入により有意に HPDLFs の CXCL2 発現量は減少した。Migration assay の結果、HPDLFs による MSCs の走化性は HDFs に対し有意に高かった。また HPDLFs による MSCs 遊走能は CXCL2 リコンビナントタンパクと同程度の遊走能を示した。HPDLFs CM に暴露された MSCs では CXCL12 および COL1A1 の発現が Control medium 群の MSCs と比較して上昇していた。一方、COL3A1 と PLAP1 については発現量の変化を認めなかった。【結論】これらの結果から PDLFs は CXCL12 を産生し、細胞外に分泌することで MSCs を 歯根膜内に引き寄せ、活発な代謝回転を示す PDL への新たな線維芽細胞供給において重要な役割を果たしているものと推察された。