

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

### 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 松澤 匡 純 (神奈川県)  
博士の専攻分野 博士(歯学)  
学位記番号 甲第 446 号  
学位授与年月日 平成 27 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 Periostin of human periodontal ligament fibroblasts promotes migration of human mesenchymal stem cell through the  $\alpha v \beta 3$  integrin/FAK/PI3K/Akt Pathway (ヒト歯根膜線維芽細胞におけるペリオスチンは integrin  $\alpha v \beta 3$ /FAK/PI3K/Akt 経路を介して、ヒト間葉系幹細胞の遊走を促進する)  
Journal of Periodontal Research DOI:10.1111/jre.12277 平成 27 年 4 月 20 日発行  
論文審査委員 主査 教授 佐藤 哲二  
副査 教授 二藤 彰 副査 教授 中村 芳樹

### 内容の要旨

#### 【研究目的】

本研究の目的は、ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDLFs) に発現するペリオスチンの細胞遊走能とその細胞内シグナル伝達機構について、ヒト間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : hMSCs) を用いて *in vitro* にて検討することである。

#### 【諸言】

歯根膜は歯根と歯槽骨の間に介在し、歯の植立や咀嚼圧の軽減に重要な役割を担う結合組織である。歯根膜は他の結合組織と比較して非常に代謝回転が速いことが知られている。

ペリオスチンは骨膜や歯根膜に高発現し、コラーゲン線維の形成や血管形成、細胞増殖などに重要な役割を担う分泌タンパクである。近年では、ペリオスチンは心筋梗塞など損傷を受けた組織において、ペリオスチンの受容体である integrin  $\alpha v \beta 3$  を介した  $\alpha v \beta 3$  integrin/FAK 経路により、線維芽細胞の遊走や分化を促し損傷組織の修復に関与することが報告されている。本研究の目的は、ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDLFs) が発現するペリオスチンの細胞遊走能とその細胞内シグナル伝達機構について、ヒト間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : hMSCs) を用いて *in vitro* にて検討することである。

#### 【資料および方法】

hPDLFs とヒト皮膚線維芽細胞 (hDFs) のペリオスチンの発現を mRNA レベルおよび、タンパクレベルで比較検討した。Boyden 法にて① hPDLFs が発現するペリオスチンの hMSCs に対する細胞遊走能について ②リコンビナントペリオスチンの濃度別における細胞遊走能について ③ペリオスチンのレセプターである Integrin  $\alpha v \beta 3$  の中和抗体、及び細胞内シグナル伝達物質の阻害剤を添加時の細胞遊走能について、検討した。ペリオスチンの hMSCs 遊走における細胞内シグナル伝達物質のリン酸化の有無についてウエスタンブロット法にて検討した。

#### 【結果】

hPDLFs におけるペリオスチンの発現は、mRNA レベルおよびタンパクレベルともに hDFs と比べ顕著に高かった。

Boyden 法より、① hPDLFs と hMSCs の共培養群と siRNA を用いペリオスチンをノックダウンした hPDLFs と hMSCs の共培養群の比較では、ペリオスチンノックダウン群の細胞遊走能は有意に減少した。②リコンビナントペリオスチン添加群では非添加群に比べ有意に高い hMSCs の遊走能を示した。③ペリオスチンの hMSCs 遊走に対する細胞内シグナル伝達

機構の検討のため、integrin  $\alpha v \beta 3$  中和抗体 (Anti-CD51/61 antibody), FAK 阻害剤 (PF431396), PI3K 阻害剤 (LY294002) を hMSCs にそれぞれ添加したところ、全ての群において遊走能は有意に減少した。

細胞内シグナル伝達物質のリン酸化の有無の確認のため、ウエスタンブロット法にて検討した。培養した hMSCs にペリオスチンを添加し FAK 及び Akt のリン酸化を検討したところ、FAK は、ペリオスチン添加 15 分後にリン酸化の亢進を示し、添加 20 分後には Akt のリン酸化の亢進を示した。次に hMSCs に中和抗体または阻害剤添加後、ペリオスチンを添加した。Anti-CD51/61 antibody 添加群では、FAK, Akt のリン酸化は抑制された。PF431396 添加群においても FAK, Akt のリン酸化は抑制された。しかし、LY294002 添加群では、Akt のリン酸化は抑制されたが、FAK のリン酸化は抑制されなかった。

#### 【考 察】

生体の歯根膜においてペリオスチンは恒常的に発現していることが知られている。これは常に咬合力などのメカニカルストレスが負荷されることによるものだと考えられている。一方、培養条件下の歯根膜線維芽細胞は、メカニカルストレスを与えない状況においてもペリオスチンを恒常的に発現することが報告されている。本研究の結果、これまでの報告と同様に、メカニカルストレスを負荷しない hPDLFs が hDFs と比較して mRNA およびタンパクレベルでペリオスチンを著しく発現することが明らかとなった。

歯根膜の特徴である非常に速い代謝回転には、新たな細胞の活発な供給が重要である。これには歯根膜の構成細胞のうち、最も優位に存在する歯根膜線維芽細胞が重要な因子であることが多く報告されている。歯根膜線維芽細胞は自己複製能に優れるほか、骨芽細胞やセメント芽細胞などに分化する能力も有していることが報告されている。一方、近年になり歯根膜において間葉系幹細胞の存在が同定されて以降、この細胞も歯根膜の恒常性の維持や修復に重要な役割を担う可能性が示唆されているが、その由来については不明な点が多い。

本研究の結果、Boyden 法より hPDLFs に発現するペリオスチンが、hMSCs の細胞遊走を促進させることが明らかになった。ペリオスチンは他の組織において線維芽細胞を遊走することが知られていることから、歯根膜線維芽細胞に恒常的に発現するペリオスチンが、歯根膜に豊富に存在する血管を介して間葉系幹細胞を遊走する可能性が示唆される。

これまで、ペリオスチンによる細胞遊走の細胞内シグナル伝達機構として、 $\alpha v \beta 3$  integrin/FAK 経路と、PI3K/Akt/mTOR 経路が報告されている。本研究の結果、①  $\alpha v \beta 3$  integrin 中和抗体を添加し、リコンビナントペリオスチンを添加した群では FAK, Akt のリン酸化が抑制され、hMSCs の遊走が有意に減少し、② FAK 阻害剤を添加した群では FAK, Akt のリン酸化が抑制され、hMSCs の遊走が有意に減少し、③ PI3K の阻害剤を添加した群では Akt のリン酸化が抑制され、hMSCs の遊走は有意に減少したが、FAK のリン酸化は抑制されなかった。このことから、 $\alpha v \beta 3$  integrin/FAK/PI3K/Akt 経路を介して hMSCs の遊走が行われる可能性が示唆された。また、心筋においてペリオスチンは MSCs の線維芽細胞に分化に関与することが報告されていることから、歯根膜に遊走された MSCs もペリオスチンにより歯根膜線維芽細胞に分化するのではないかとと思われる。

さらにペリオスチンは、歯の移動や低酸素のようなストレス環境下においてその発現が増加することが知られている。またペリオスチンは、損傷した組織の修復において重要な役割を果たすことから、歯の移動時の歯根膜の再構成に重要な役割を担う可能性が示唆される。今後、歯根膜に発現するペリオスチンと MSCs における相互作用を *in vivo* にて検討する予定である。

#### 【結 論】

hPDLFs に発現するペリオスチンは、*in vitro* において  $\alpha v \beta 3$  integrin/FAK/PI3K/Akt シグナル伝達経路を介して MSCs の細胞遊走能を促進することが明らかとなった。

#### 審査の結果の要旨

歯根と歯槽骨間に介在する歯根膜は、歯の植立や咀嚼圧の軽減に重要な役割を果たす結合組織である。歯根膜の主要な構成細胞は線維芽細胞であるが、歯根膜の代謝活性は極めて高い。

近年、ペリオスチンが急性心筋梗塞の初期修復に重要な役割を果たすことが報告された。その修復機構は、ペリオスチンの受容体である  $\alpha v$ -integrin を介した FAK-integrin のシグナル経路により、線維芽細胞の遊走や分化が促進されることで起こる。ペリオスチンは、発生初期の骨膜、心臓弁、歯根膜に強く発現し、コラーゲン線維の形成や血管形成、細胞増殖などに重要な役割を果たす分泌性タンパクである。

本研究は、ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDLFs) が産生するペリオスチンのヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) への細胞遊走能効

果、ペリオスチンの細胞内シグナル伝達機構を明らかにすることを目的として行われた。実験法としては、hPDLFs とヒト皮膚線維芽細胞 (hDFs) のペリオスチン発現量を mRNA とタンパク質レベルで比較解析した。さらに、細胞遊走能、シグナル伝達機構の解析、細胞内シグナル伝達物質のリン酸化の有無についてウエスタンブロット法を用いて検討した。

hPDLFs のペリオスチン発現は、hDFs に比べ mRNA とタンパク質レベルのいずれにおいても有意に高かった。hMSCs の遊走能は、hPDLFs との共培養やリコンビナントペリオスチンによって増加し、ペリオスチンの siRNA によって有意に抑制された。integrin  $\alpha v \beta 3$  の中和抗体、FAK 阻害剤、PI3K 阻害剤を用いた実験では、全ての細胞群で遊走能は有意に減少した。さらに、ペリオスチンの作用を受けた細胞群では FAK と Akt のリン酸化がウエスタンブロット法により確認されたが、中和抗体や阻害剤の添加により抑制された。

以上の結果から、歯根膜線維芽細胞はペリオスチンを産生、分泌することで間葉系幹細胞を誘導し、歯根膜の恒常性維持に大きな役割を果たすと考えられる。しかしながら、心筋梗塞や肝障害の損傷治癒に際して、myofibroblasts がその治癒過程に重要な役割を果たすとされるが、今回の研究では触れられていない。今回の *in vitro* での研究結果が、*in vivo* でも再現できるか検討する必要がある。

歯根膜は、歯の矯正的移动や歯周病臨床において重要な部位である。歯根膜は代謝が活発であり、再生も盛んであるが、メカニズムについては不明である。本研究結果は、急性心筋梗塞の再生治癒に関わっているペリオスチンが歯根膜の再生においても重要な役割を果たす可能性を示した点で、大変意義が大きいと言える。よって、本論文は博士 (歯学) の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。