

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名           | 山 元 貴 弘   |
| 学 位 の 種 類     | 博 士 (医 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 博 士 (論) 第 3 8 5 号   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 2 3 年 9 月 1 4 日   |
| 学 位 論 文 題 目   | Dexamethasone-induced up-regulation of two-pore domain K <sup>+</sup> channel genes, TASK-1 and TWIK-2, in cultured human periodontal ligament fibroblasts.<br><br>(培養ヒト歯根膜線維芽細胞におけるデキサメタゾンによる two-pore domain K <sup>+</sup> チャネル<TASK-1, TWIK-2>遺伝子の発現誘導) |
| 審 査 委 員       | 主 査 教 授 松 浦 博<br>副 査 教 授 前 川 聡<br>副 査 教 授 三 ッ 浪 健 一   |

## 論文内容要旨

|  |   |              |                    |
|--|---|--------------|--------------------|
| ※整理番号  | 389   | (ふりがな)<br>氏名 | やまもと たかひろ<br>山元 貴弘 |
| 学位論文題目   | Dexamethasone-induced up-regulation of two-pore domain K <sup>+</sup> channel genes, TASK-1 and TWIK-2, in cultured human periodontal ligament fibroblasts<br>(培養ヒト歯根膜線維芽細胞におけるデキサメタゾンによる two-pore domain K <sup>+</sup> チャンネル<TASK-1, TWIK-2>遺伝子の発現誘導) |              |                    |
| <p>【目的】歯周組織の重要な構成要素である歯根膜は、歯のセメント質と歯槽骨の間に存在し、歯の支持に最も大きな役割を果たしている。その組成は、細胞成分と I 型コラーゲンを主体とした細胞外器質で構成され、この細胞成分の主となるのは歯根膜線維芽細胞 (Periodontal ligament fibroblasts : PDL fibroblasts) である。われわれは、これまでの研究で中枢神経系や消化管に発現が認められ、不飽和脂肪酸や機械的伸展刺激によって活性化される two-pore domain K<sup>+</sup> チャンネルが、PDL fibroblasts において発現していることを見いだした。すなわち、ヒトでは中枢神経系組織や消化管において 15 種類の two-pore domain K<sup>+</sup> チャンネルが発現していることが明らかとなっているが、われわれは PDL fibroblasts において、TWIK-2、TREK-1、TWIK-1、TASK-1、TRAAK、TASK-2 の 6 種類が発現していることを RT-PCR 法にて見いだした。この 6 種類の中で、TWIK-2 は不飽和脂肪酸によって、また TREK-1、TREK-2、TRAAK は不飽和脂肪酸もしくは機械的進展刺激によって活性化されることが知られている。また、Dexamethasone (Dex) は炎症と疼痛の軽減をふくむ広範な生理学的反応を引き起こすことが知られている。Dex は骨原細胞において骨芽細胞の表現型を増強し、コラゲナーゼの表現を減少させ、PTH が媒介する PDL fibroblasts をふくむ cAMP 反応を増加させることも知られている。Dex は PDL fibroblasts の多くの機能に影響を与えるが、これらの反応の基盤はよく分かっていない。ところで、イオンチャンネルは細胞の増殖に影響を与えることが知られており、癌細胞をふくむ様々な細胞で機能している。Dex が種々の細胞でイオンチャンネルの表現に影響を与えることについて多くの報告がなされているが、PDL fibroblasts のイオンチャンネルと Dex についての報告はこれまで見当たらない。また、Dex はイオンチャンネルの表現の調節を通じて PDL fibroblasts の生理学的反応を引き起こす可能性がある。そこで、われわれは Dex が PDL fibroblasts のイオンチャンネルの遺伝子の表現にどのような影響を与えるかどうか注目し、RT-PCR 法を用いた分析を行った。</p> <p>【方法】患者の同意を得た上で抜歯した歯の歯根表面中央部 1/3 より採取した歯根膜組織からクローニングした PDL fibroblasts を 10% FCS、100 unit/ml のペニシリン、100 µg/ml のストレプトマイシンを添加した DMEM 中で培養した。実験には 2~7 代継代した細胞を使用し、</p> |   |              |                    |

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

まず PDL fibroblasts において 15 種類の two-pore domain  $K^+$  チャンネルのうち、どのチャンネルが発現しているかを確認後、コンフルエントに達した PDL fibroblasts に濃度 (1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100nM) および時間経過別 (0, 3, 6, 12, 18, 24 時間) で Dex 処理を行い、two-pore domain  $K^+$  チャンネル (TASK-1, TWIK-2) の mRNA 発現量について RT-PCR 法にて半定量分析を行った。また、他のステロイドホルモン (estradiol, aldosterone, retinoic acid, 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ ) に関して、一部同様の分析を行った。

**【結果】** RT-PCR 法の結果、15 種類の two-pore domain  $K^+$  チャンネルのうち、TWIK-1、TREK-1、TASK-1、TRAAK、TASK-2、TWIK-2、KCNK7、TASK-3、TALK-1、TASK-4 (TALK-2) が PDL fibroblasts にて mRNA の発現を認め、このうち TASK-1 と TWIK-2 のみが Dex によって mRNA の発現量増加を認めた。なお、TREK-2、THIK-2、THIK-1、TASK-5、TRESK に関しては mRNA の発現が認められなかった。PDL fibroblasts における Dex 処理の濃度および時間経過での mRNA 発現量については、濃度に関しては、TASK-1 では 25 nM、TWIK-2 では 50 nM で最も mRNA の発現量増加を認め、コントロールと比較し、TASK-1 では約 15 倍、TWIK-2 では約 4 倍の mRNA 発現量であった。時間経過に関しては、TASK-1、TWIK-2 ともに 6 時間で最も mRNA の発現量増加を認め、コントロールと比較し、TASK-1 では約 20 倍、TWIK-2 では約 3 倍の mRNA 発現量であった。Dex 以外の他のステロイドホルモンに関しては、1,25-(OH) $_2$ D $_3$  において TWIK-2 の mRNA 発現量が増加したのみで、estradiol、aldosterone、retinoic acid においては変化を認めなかった。

**【考察】** イオン・チャンネルがさまざまな細胞の増殖などに影響を与え、また Dex がそのイオンチャンネルの表現に影響を与えることについてこれまで多くの報告がなされてきたが、今回の実験により、PDL fibroblasts において Dex による two-pore domain  $K^+$  チャンネルである TASK-1 と TWIK-2 の生理学的機能に対する役割への関与が示唆されることとなった。その機能の中で、ハロタンやイソフルランといった全身麻酔薬や、リドカイン、メピバカイン、ブピバカインといった局所麻酔薬の働きに対しての関与や、細胞膜の静止膜電位の安定をはかり、細胞の維持安定を担う役割がこれまでも報告されてきた。今回の実験により、このような麻酔薬奏功のメカニズムの一端が明らかにされ、さらには静止膜電位の安定に関連して、疼痛抑制のメカニズムに関しても Dex および TASK-1、TWIK-2 の関与が示唆されることとなった。また、PDL fibroblasts におけるイオンチャンネルと Dex についての報告は、これまで見当たらなかったことから、その機能解明に関して有意義なものであったのではないかと考えられた。

**【結論】** PDL fibroblasts において、Dex により 15 種類の two-pore domain  $K^+$  チャンネルのうち、TASK-1 と TWIK-2 の mRNA 発現量増加を認めた。これは、様々な外的刺激にさらされる PDL fibroblasts において、細胞膜の電位安定などの生理学的役割に関係するのではないかと考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

|  |     |    |       |
|--|-----|----|-------|
| 整理番号   | 389 | 氏名 | 山元 貴弘 |
| 論文審査委員   |     |    |       |
| <p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>歯根膜線維芽細胞は、歯周組織の維持に重要なはたらきをなす歯根膜組織の主要な構成細胞であり、膜2回貫通型の K<sup>+</sup>チャンネルがタンデムに連結した two-pore domain K<sup>+</sup>チャンネルの発現が明らかにされている。本研究では、ヒト歯根膜線維芽細胞における two-pore domain K<sup>+</sup>チャンネルの mRNA 発現量におよぼすデキサメタゾンの作用を RT-PCR 法を用いて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ヒト組織に発現が確認されている 15 種類の two-pore domain K<sup>+</sup> チャンネルのうち、歯根膜線維芽細胞には 11 種類の発現が確認された。そのうち、TASK-1 と TWIK-2 がデキサメタゾンによりその mRNA 発現量の増加が認められた。これらの増加はデキサメタゾンの拮抗剤である RU38486 により有意に抑制された。</li> <li>2. mRNA 発現量の増加は、TASK-1 では 10~25 nM のデキサメタゾンで、TWIK-2 では 50 nM のデキサメタゾンで最大となった。</li> <li>3. デキサメタゾン (100 nM) による TASK-1 および TWIK-2 の mRNA 発現量はともに作用後 3~6 時間で最大となった。</li> </ol> <p>本論文は、デキサメタゾンによるヒト歯根膜線維芽細胞の two-pore domain K<sup>+</sup> チャンネルの発現調節について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 599 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 9 月 8 日)</p> |     |    |       |