

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )		氏名	間 悠介
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当			
論 文 題 目				
骨髄由来間葉系幹細胞からセメント芽細胞様細胞への分化に及ぼす Wnt3a の影響				
論文審査担当者				
主査	教授	柴 秀樹	印	
審査委員	教授	宿南 知佐		
審査委員	教授	谷本 幸太郎		
〔論文審査の要旨〕				
<p>歯周病に伴う大規模歯周組織破壊の新たな治療法として、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を用いた組織工学に基づく治療法が注目されている。この歯周組織再生では、歯槽骨・歯周靭帯・セメント質の三つの組織を誘導し、正常な組織構造を再構築することが重要である。しかしながら、とりわけセメント質の再生は容易ではない。なぜなら、セメント芽細胞が歯根に乏しく、また、hMSC からセメント芽細胞を効率よく誘導する方法が確立されていないためである。セメント芽細胞の誘導に関して Han らは、歯周靭帯細胞にリチウムイオンを作用させると、セメント質・骨関連遺伝子の発現量が増加することを報告した (P. Han, <i>et al.</i>, 2012)。リチウムイオンは古典的<math>\beta</math>-catenin/Wnt 経路を活性化することが知られていることから、セメント芽細胞の誘導にはこの細胞内シグナル伝達経路が鍵を握ると推測される。そこで本研究では、古典的<math>\beta</math>-catenin/Wnt 経路を活性化する代表的なタンパク質である Wnt3a に着目し、hMSC からセメント芽細胞様細胞への分化誘導因子としての効果およびその作用機序について調べることを目的とした。</p> <p>以下に本実験における材料および方法を示す。</p> <p>細胞は骨髄由来不死化 hMSC (UE6E7T-3 ; JCRB 細胞バンク) を用いた。Wnt3a のセメント芽細胞誘導因子としての効果を調べるため、hMSC を骨誘導培地 (OIM ; <math>\alpha</math>-MEM 培地に牛胎児血清, アスコルビン酸, <math>\beta</math>-グリセロフォスフェート, デキサメタゾンを追加) で 6 日間培養した。その後、培地を無血清 OIM に変更し、種々の濃度の Wnt3a を添加した。経時的に細胞を回収し、Cementum Protein 1 (CEMP-1) mRNA の発現量を real-time PCR 法にて</p>				

調べた。また、CEMP-1 以外のセメント質・骨関連遺伝子 (cementum attached protein ; CAP, alkaline phosphatase ; ALP, osteocalcin ; OCN, dentin sialophosphoprotein ; DSPP),  $\beta$ -catenin/Wnt 経路に関連する遺伝子 ( $\beta$ -catenin, Axin2), 骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein-2 ; BMP-2) , 脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor ; BDNF) の発現量についても調べた。Wnt3a のカルシウム沈着に与える影響についてアリザリンレッド染色によって評価した。セメント芽細胞で発現していると報告がある BMP-2 受容体の BMPR1a, BMPR2 および BDNF の受容体である TrkB, p75 の mRNA 発現に及ぼす Wnt3a の影響を RT-PCR 法を用いて調べた。さらに, Wnt3a 刺激によって活性化される細胞内シグナル伝達経路を解析するために, Wnt3a を含む培地に種々の阻害剤を添加した。これらの培養液中で培養した hMSC 内における CEMP-1 の発現について real-time PCR 法およびウエスタンブロッティング法によって分析した。阻害剤は,  $\beta$ -catenin/Wnt 経路阻害剤である Dickkopf1 (DKK-1) および ICG-001, ERK 阻害剤である PD98059, JNK 阻害剤である SP600125, p38 阻害剤である SB203580 を用いた。

その結果, 以下のことが明らかになった。

1. hMSC 培養系に Wnt3a を加えた結果, 濃度および時間に依存して CEMP-1 の mRNA 発現量が増加した。また, その他の遺伝子 (CAP, ALP, OCN, DSPP,  $\beta$ -catenin, Axin2, BMP-2, BDNF) についても Wnt3a の添加により mRNA 発現量が有意に増大した。
2. hMSC 培養系に Wnt3a を添加した結果, アリザリンレッド染色にて OIM で培養した hMSC に比較してカルシウムの沈着は統計学的に有意な増加を示した。
3. BDNF 受容体である TrkB および BMP-2 受容体である BMPR1a, BMPR2 は, Wnt3a 非添加骨誘導培地群, Wnt3a 添加骨誘導培地群のいずれにおいても発現していた。BDNF 受容体である p75 は, Wnt3a 非添加骨誘導培地 7 日目群では発現が見られなかったが, Wnt3a 非添加骨誘導培地 1 日目群, Wnt3a 添加骨誘導培地群 (1 日目群, 7 日目群) で発現が見られた。
4. 古典的  $\beta$ -catenin/Wnt 経路, ERK, p38 に対するいずれの阻害剤も, Wnt3a 刺激で増加した CEMP-1 の mRNA 発現量およびタンパク質の発現量を減少させた。一方, JNK 阻害剤は, Wnt3a 刺激によって増加した CEMP-1 mRNA 発現量およびタンパク質発現量をさらに増加させた。

以上の結果から, Wnt3a は古典的  $\beta$ -catenin/Wnt 経路や ERK・p38 経路を介して hMSC のセメント芽細胞様細胞への分化を促進する可能性が示唆された。また, Wnt3a 刺激は BMP-2, BDNF の発現を制御しセメント芽細胞様細胞への分化に関与することも推察された。

本研究は hMSC からセメント芽細胞様細胞への分化に及ぼす Wnt3a の影響について明らかにし, 今後の歯周組織再生療法の発展に寄与すると考えられる。よって審査委員会委員全員は, 本論文が著者に 博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。