

氏名	西山 依理子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5933号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Dexamethasone の添加による Intraflagellar transport protein 88 homolog を介した象牙芽前駆細胞の増殖抑制に関する研究
論文審査委員	鳥井 康弘 教授 池亀 美華 准教授 原 哲也 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

現在、再生医療が急速に発展してきており、一般社会でも広く認知されるようになった。歯科領域では、1920年代から歯髄保護療法が応用されるようになり、器官原基法や歯周組織再生療法などの開発が試みられているが、未だ不十分である。象牙質の再生には、まず、象牙芽前駆細胞の接着・増殖が必要と考えられるが、それを制御するための研究は進んでいない。

一方、ほとんどの細胞には、一次繊毛が存在する。この一次繊毛には、Hh (Hedgehog) やWntなどの受容体が多くあり、それらのシグナル伝達により、細胞の増殖・分化や極性を制御しているといわれている。具体的には、一次繊毛は、Hhシグナル経路の抑制や古典的Wntシグナル経路の活性化を通じて、細胞増殖を抑制している。また、Hhシグナルの活性は、ビタミンD₃やその他のステロイドホルモンにより変動するといわれている。さらに、古典的Wntシグナル経路も、dexametasone (DEX) などの糖質コルチコイドによって活性が抑制される。DEXは、象牙芽様細胞においても細胞分化を促進し、細胞増殖を抑制する。そして、それとは別に、 β -Glycerolphosphate (β -gp) も、歯髄細胞の細胞分化を抑制させることが知られている。

本研究では、侵襲刺激を受けやすい象牙質を β -gpやDEXを利用して再生する方法の構築を目指し、そのメカニズムの解明を試みた。象牙質の再生には、まず、象牙芽前駆細胞の接着・増殖が必要である。そこで、 β -gpとDEXを象牙芽前駆細胞株であるKN-3細胞を培養する培地に添加し、接着と増殖への影響を確認した。WST-8 assayを用いて細胞の接着について評価したところ、 β -gpとDEXの両方で影響は認められなかった。次に、WST-8 assayとArray Scan systemを用いて、細胞増殖の評価を行なった。 β -gpでは、添加後48時間でのArray Scan systemを用いた評価でのみ増殖抑制を認めた。DEXでは、添加後48時間でのWST-8 assayとArray Scan systemの両方で増殖抑制を認め、DEXは細胞増殖を促進することで知られているが、興味深い事に、象牙芽様細胞では増殖を抑制するといわれている。今回得た、添加後48時間に

おける結果は過去の報告と一致したため、以降、DEX添加後、48時間におけるKN-3細胞の増殖抑制に注目し、研究を進めた。

現在までに、一次繊毛は静止期の細胞で、Intraflagellar transport (IFT) 88というタンパク質によって形成されることが知られている。このIFT88は、増殖期の細胞では細胞周期を制御するといわれている。そこで、DEX添加による象牙芽前駆細胞の増殖抑制効果への、IFT88の関与を想定した。これを検証するために、レンチウイルスベクターシステムを用い、*Ift88* short hairpin RNAが安定的に発現するKN-3細胞 (Sh-*Ift88* KN-3細胞) とそのコントロールとして、control short hairpin RNAを安定的に発現する (Sh-control KN-3細胞) を作成した。この細胞を使用して、DEX添加による細胞増殖抑制への影響をWST-8 assayとArray Scan systemを用いて評価した。その結果、Sh-control KN-3細胞では細胞増殖抑制を認めたが、Sh-*Ift88* KN-3細胞ではその抑制は認められなくなった。これより、IFT88をノックダウンすると、DEXによる細胞増殖抑制が解除される、すなわちIFT88がDEXによる細胞増殖抑制を媒介していることが示唆される。

次に、DEXによるIFT88を介した細胞増殖抑制機構の解明に取り組んだ。Hhシグナル経路の抑制は、細胞増殖を抑制することが知られている。また、ステロイドによりHhシグナル活性が変動するともいわれている。このことから、DEX添加により細胞増殖抑制をIFT88ノックダウンが解除する機構にHhシグナル経路が関与するかどうかを検討した。まず、Sh-control KN-3細胞とSh-*Ift88* KN-3細胞にDEXを添加し、*Ift88*のmRNAを検討したが、どちらも発現変動は認められなかった。これよりDEXを添加しても、*Ift88*の発現レベルに影響を及ぼさないことが確認できた。同条件下で、Hhシグナル経路の関連遺伝子である*Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Ptch1*, *Smo*, *Shh*の発現変動は認められなかった。このことから、DEXによるIFT88を介した細胞増殖抑制機構が、Hhシグナル経路を介すものではないと考えられる。

また、古典的Wntシグナルが、細胞の増殖を抑制することや、DEXにより古典的Wntシグナル活性は、抑制されることが知られている。このため、*Ift88*のノックダウンが、DEXの添加により細胞増殖抑制を解除する機構に古典的Wntシグナルが関与するかどうかを確認した。その結果、古典的Wntシグナルの標的遺伝子である*Ccn5*のmRNAレベルはSh-control KN-3細胞では発現の抑制を認めたが、Sh-*Ift88* KN-3細胞ではその抑制は認められなくなった。一方、他の古典的Wntシグナルの標的遺伝子である*Ccn4*, *Ccn6*や*Axin2*の遺伝子発現や、古典的Wntシグナルを媒介するβ-cateninの細胞内蓄積量は、DEXを添加してもSh-control KN-3細胞とSh-*Ift88* KN-3細胞の両方で有意な差は認められなかった。以上の結果より、DEX添加による細胞増殖抑制の*Ift88*ノックダウンによる解除は古典的Wntシグナルを介したものではないと推測される。しかしながら、*Ccn5*は血管内皮細胞において、細胞増殖を抑制するという報告もあり、DEXのIFT88を介した作用においても何らかの役割を果たしていると考えられる。

今回の研究成果に基づき、現在、以下の4つの仮説を立てている。

1. DEXの添加により、IFT88を介して*Ccn5*の発現が抑制される。それにより、細胞周期が制御され、細胞増殖が抑制される。
2. DEXの添加により、IFT88を介して細胞周期が制御される。それにより、*Ccn5*の発現が抑制され、細胞増殖が抑制される。

3. DEXの添加により、IFT88を介して細胞周期が制御される。それと同時に*Ccn5*の発現が抑制される。この2つの経路によって細胞増殖を抑制している。
 4. DEXの添加により、*Ccn5*の発現が抑制されるものの、これは細胞増殖を抑制しない。IFT88が細胞周期を制御することのみが、細胞増殖抑制につながる。
- 今後はこれらの仮説を立証することが、象牙質の再生への足がかりとなると考えている。

論文審査結果の要旨

申請者は、象牙質の再生の分子基盤となる、象牙芽細胞の接着と増殖の制御機構に注目している。これを解明するため、今回象牙芽細胞の特性を持つラットの歯髄細胞株であるKN-3細胞を用い、研究を進めた。象牙芽細胞を含む殆どの細胞には一次繊毛が存在し、Hedgehog (Hh) シグナル経路の活性化や古典的Wntシグナル経路の抑制に機能する。さらにHhシグナルの活性はステロイドホルモンによって制御されると言う報告がある。興味深いことに糖質コルチコイドであるDexamethasone (DEX) により象牙芽細胞分化が促進され、増殖は抑制される。また、 β -Glycerophosphate (β -gp) も歯髄細胞の分化を抑制させることがわかっている。そこで本研究ではDEXによる象牙芽前駆細胞の接着・増殖制御作用を、 β -gpと比較しつつまず解析した。KN-3細胞にDEXと β -gpを添加し、細胞の接着を評価したが、DEXと β -gpの両方で影響は認められなかった。次に、細胞増殖の評価を行ったところ、 β -gp添加により添加後48時間でArray Scan systemで増殖抑制を認めたが、WST-8 assayでは確認できなかった。一方DEXの場合添加後、48時間でWST-8 assay とArray Scan systemの両方で増殖抑制を認めた。これより、以降DEX添加後48時間におけるKN-3細胞の増殖抑制のみに着目した。

静止期の細胞で一次繊毛を形成する、Intraflagellar transport protein 88 homolog (IFT88) は、増殖期の細胞で細胞周期を制御するとの報告がある。そこで次に、DEX添加による、象牙芽前駆細胞の増殖抑制効果へのIFT88の関与を想定した。*Ift88* short hairpin RNA (Sh-*Ift88*) が安定的に発現する (Sh-*Ift88* KN-3) 細胞とその対照 (Sh-control KN-3) 細胞を作成しDEXを添加、細胞増殖を評価した。その結果、Sh-*Ift88* KN-3細胞ではDEXを添加しても、細胞増殖抑制は認められなかった。つまりDEXによる増殖抑制がIFT88を介していることが、ここに示された。さらに、一次繊毛がHhシグナルや古典的Wntシグナルを制御することから、IFT88を介したDEXの増殖抑制作用への、これらシグナルの関与について検討した。結果、Sh-*Ift88* KN-3、Sh-control KN-3どちらの細胞に対してDEXを添加しても、Hhシグナル関連遺伝子である、*Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Ptch1*, *Smo*, *Shh* の発現変動は認められなかった。また古典的Wntシグナル経路関連遺伝子である、*Ccn6*や*Axin2*の遺伝子発現量や β -cateninの細胞内蓄積量も変動しなかった。以上の結果より、両シグナル経路はDEXによる増殖抑制には関与しないことが明らかになった。しかしDEXはIFT88依存的に古典的Wntシグナル標的遺伝子の*Ccn4*, *Ccn5*のmRNA発現量は低下させるため、*Ccn4*, *Ccn5*はDEXによる細胞増殖抑制作用において何らかの役割を果たしていると考えられる。

以上のように本申請論文は、臨床で頻用されるDEXによる、象牙芽前駆細胞の増殖抑制機構の解明に寄与する新知見を提供している。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。