

論文の内容の要旨

氏名：吉本 秀輔

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Effect of Prostaglandin E₂ on Human Dental Follicle Cells during Osteogenic Differentiation
(歯嚢細胞の骨形成分化過程におけるプロスタグランジン E₂ の効果)

歯嚢は、神経堤の外胚葉性間葉由来の結合組織であり、歯科治療の過程で新たな生体侵襲を加えることなく採取することが可能なことから再生医療の細胞源としての可能性を有している。ヒト歯嚢組織には未分化間葉系幹細胞が存在し、歯嚢から分離したヒト歯嚢由来細胞 (human dental follicle cells: hDFCs) は、骨芽細胞誘導培地 (osteogenic induced medium: OIM) で培養すると石灰化すること、また、hDFCs を適切な培地およびスキャホールド上で培養することで、セメント芽細胞、歯根膜線維芽細胞にも分化することが報告されている。hDFCs は、幹細胞マーカーである Notch-1, STRO-1 など幹細胞マーカーや、CD29, CD44 などの間葉系幹細胞マーカーを発現することから、骨髄由来ヒト未分化間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells: hMSCs) と類似した性質を有していると考えられる。また、hDFCs は hMSCs と比較して細胞増殖能が優れているとの報告もある。さらに、hDFCs は口蓋および歯胚の発生に関連する LIM homeobox 8 を高度に発現していることが報告されているとともに、*in vitro* での hMSCs の骨芽細胞分化/石灰化に必要とされる dexamethasone (DEX) を添加しなくても、hDFCs は石灰化することが報告されている。以上より hDFCs は、顎顔面領域での骨再生医療の細胞源として、さらに、石灰化機序の解明のための研究用体性幹細胞としての有用性が示唆されている。

Prostaglandin E₂ (PGE₂) は、細胞膜リン脂質のアラキドン酸から誘導される代表的な脂質代謝産物である。Cyclooxygenase (COX) は、PGE₂ 生成の律速段階を調節する酵素で、COX-1 および COX-2 のアイソザイムが存在する。PGE₂ は多様な作用を有する生理活性物質であり、恒常性の維持や病態形成に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。骨代謝においても、PGE₂ は重要な役割を果たしていると考えられているものの、PGE₂ は骨形成を促進する、または、骨形成を抑制するとの報告や、骨吸収を促進するとの報告が混在している。Prostaglandin E₂ の受容体である E-type prostanoid receptor (EP) には、EP1~EP4 の4つのサブタイプが存在しており、各 EP のシグナル伝達経路や作用機序に関する研究も行われている。

本研究では、hDFCs の骨芽細胞分化/石灰化に関与する因子の検討を目的に、hDFCs を増殖培地 (GM) または骨芽細胞誘導培地 (OIM) で培養を行い、DNA microarray を行い、さらに PGE₂ が hDFCs の骨芽細胞分化/石灰化に与える影響について検討を行った。

本研究により、以下の結果を得た。

- 1) DNA microarray 解析の結果、培養 0 日目および GM での培養 17 日目の hDFCs と比較して、OIM で培養 17 日目の hDFCs では COX-1 および COX-2 の遺伝子発現が上昇した。
- 2) hDFCs の骨芽細胞分化誘導過程における COX-1 および COX-2 の経時的遺伝子発現を調べた結果、培養 17 日目に GM と比較して OIM で培養した hDFCs で COX-1 および COX-2 の遺伝子発現が有意に上昇した。
- 3) DNA microarray 解析の結果、骨芽細胞へ分化誘導を行っていない hDFCs において EP1~EP4 の全てが発現していた。また、EP4 の遺伝子発現は、培養 0 日目と比較して培養 17 日目の hDFCs で遺伝子発現が上昇した。
- 4) hDFCs の骨芽細胞分化誘導過程における EP1~EP4 の経時的遺伝子発現を調べた。hDFCs を OIM で培養したところ、EP2 遺伝子発現は培養 17 日まで経時的上昇が認められた。EP4 遺伝子発現は培養 10 日目まで経時的上昇が認められた。
- 5) 10⁻⁵ ~ 10⁻⁷ M の PGE₂ を OIM に添加して hDFCs の培養を行ったところ、10⁻⁵ および 10⁻⁶ M の PGE₂ 添加群で Alizarin red S 染色の遅延が認められた。
- 6) hDFCs を 10⁻⁵ ~ 10⁻⁷ M の PGE₂ 添加または無添加 OIM で 3 日間培養を行い、骨芽細胞分化関連遺伝子の発現を調べた。PGE₂ 無添加群に比べ PGE₂ 添加群では、Osterix と ALP の遺伝子発現は有意に減少し、Runx-2, BMP-4, TGF-β の遺伝子発現は減少傾向がみられた。

以上の結果から、hDFCs では EP1~EP4 の発現が認められるとともに、hDFCs を OIM で培養することによ

って、EP2 および EP4 遺伝子の発現上昇が認められたことから、hDFCs の骨芽細胞分化/石灰化過程で PGE₂ の影響を受ける可能性が考えられた。そこで、PGE₂ を添加して hDFCs の骨芽細胞分化誘導を行ったところ、石灰化の遅延および骨芽細胞分化関連遺伝子の発現減少が認められた。よって、hDFCs の培養系では、PGE₂ は骨芽細胞分化を抑制することによって、石灰化の遅延を引き起す可能性が示唆された。