

論文審査の結果の要旨

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）

審査委員：（主査） 教授 小方 頼 昌
（副査） 教授 近 藤 壽 郎
教授 吉 垣 純 子

ヒト歯嚢由来細胞 (human dental follicle cells: hDFCs) は、未分化間葉系幹細胞が存在し、歯嚢から分離した骨芽細胞誘導培地 (osteogenic induced medium: OIM) で培養すると石灰化することが報告されてきた。hDFCs は、骨芽細胞や脂肪細胞、神経系細胞へと分化すること、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ている。歯嚢は、歯科治療の過程で破棄される組織であり、新たな生体侵襲を加えることなく採取可能なことから、再生医療の細胞源としての可能性を有している。そのため、hDFCs は、顎顔面領域での骨再生医療の細胞源として、さらに、石灰化機序解明等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、多様な作用を有する生理活性物質であり、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。PGE₂ は骨代謝においても重要な役割を果たしていると考えられているが、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が混在している。PGE₂ 産生の律速段階を調節する酵素である Cyclooxygenase (COX) は、COX-1 および COX-2 のアイソザイムが存在する。また、PGE₂ 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。

著者は、hDFCs の骨芽細胞分化/石灰化に關与する因子の検討を目的に、hDFCs を growth medium (GM) または OIM で培養を行い、DNA microarray 解析を行った。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し、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。

本論文は、hDFCs の石灰化過程で COX-1 および COX-2 遺伝子が発現上昇すること、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の骨芽細胞分化および石灰化過程にPGE₂が影響を与える可能性を示した。また、PGE₂を添加した骨芽細胞分化誘導培地でhDFCsの培養を行ったところ、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。これらの結果は、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するものである。

よって、本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成30年2月22日