

論文審査要旨

ヒト歯嚢由来細胞の mRNA および miRNA 発現解析と
骨芽細胞分化過程での LIF 発現

日本大学松戸歯学部 顎顔面外科学講座

藤本 陽子

(指導：近藤 壽郎 教授)

近年、生体侵襲が少なく、十分な細胞数が確保できる、再生医療応用の細胞供給源が求められている。歯嚢は、歯科治療の過程で破棄される組織であり、未分化間葉系幹細胞が存在し、ヒト歯嚢組織から分離した細胞 (hDFC: human dental follicle cells) は、骨芽細胞誘導培地で培養すると石灰化することが報告されている。また、hDFC は代表的な体性幹細胞であるヒト骨髄由来未分化間葉系幹細胞 (hMSC: human mesenchymal stem cells from bone marrow) に比べて細胞増殖能が優れているとも報告されており、歯嚢は再生医療の細胞源として注目されている。

著者は hDFC の骨再生医療応用を目的とし、hDFC について、細胞学および分子生物学的性質や、DNA マイクロアレイおよび microRNA (miRNA) マイクロアレイ解析を行い、骨芽細胞分化過程で発現変動する遺伝子を検討し、以下の結果を得た。

1. hDFC を OIM で培養すると、Alizarin red S 染色、von Kossa 染色陽性を認めた。
2. hDFC の ALP 活性は、培養 7 日目から、GM に比べ OIM で培養した細胞で ALP 活性が有意に高かった。
3. hDFC は間葉系細胞の表層マーカーである CD13 等が発現しており、Notch1, Sca-1, SSEA-1 などの幹細胞マーカーの発現は認められたが、CD14 などの造血幹細胞マーカーの発現は認められなかった。
4. DNA マイクロアレイ解析から、hDFC では LHX8 が、hMSC では HOXA5, HOXA9, HOXA10 の発現が高いことが認められた。
5. miRNA マイクロアレイ解析を行ったところ、hDFC で発現が高いのは 32 miRNA、hMSC で発現が高いのは 37 miRNA であった。
6. hDFC で発現が高い 32 miRNA の標的候補遺伝子のうち、実験的に標的遺伝子として実証されているのは 256 遺伝子であり、hMSC で発現が高い 37 miRNA で実験的に実証されたのは 457 遺伝子であった。
7. hDFC と hMSC 間で発現に差が認められた miRNA の標的候補遺伝子で hDFC では FOXO1 が、hMSC では HOXA の発現が高いことを認めた。

8. hDFC の DNA マイクロアレイ解析で、骨芽細胞分化過程で発現が減少する遺伝子群に LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を認めた.
9. hDFC を OIM で培養し、0, 1, 2, 4, 7, 11 日目における LIF 遺伝子発現量を測定したところ、経時的に減少していた.
10. hDFC を OIM で培養し、LIF タンパク質量を測定したところ、培養 1 日目までは減少し、その後上昇した.
11. LIF を標的候補遺伝子とする miR-29b は hDFC 細胞分化過程で発現が減少していた.
12. miR-29b を hDFC に遺伝子導入すると LIF タンパク質量は減少した.

本論文は、hDFC の mRNA-miRNA 比較発現解析を行うとともに、hDFC の骨芽細胞分化過程での LIF 発現および LIF を標的とする miRNA の検討を行ったものである。この研究は、歯嚢が骨再生医療における細胞供給源の一つの候補としての可能性を明らかにした。また、hDFC を用いた基礎研究は、骨芽細胞分化機序研究に貢献するものと考えられる。

よって本論文の著者は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認める。

平成 年 月 日

主査 日本大学教授 歯学博士 小方 頼昌 印

副査 日本大学教授 博士(理学) 吉垣 純子 印

副査 日本大学教授 歯学博士 近藤 壽郎 印

最終試験の結果の要旨

日本大学大学院松戸歯学部 助手（専任扱） 藤本 陽子 に対する最終試験は、主査 小方 頼昌教授、副査 吉垣 純子教授、副査 近藤 壽郎教授により主論文ならびに関連する事項について口頭試問をもって実施した。その結果、合格と認めた。

平成 年 月 日

主査 日本大学教授 歯学博士 小方 頼昌 印

副査 日本大学教授 博士(理学) 吉垣 純子 印

副査 日本大学教授 歯学博士 近藤 壽郎 印