

氏名(本籍地) 中島宗隆(福岡県)  
 学位記および番号 博士(歯学), 甲 第341号  
 学位授与の日付 平成27年3月10日  
 学位論文題名 「Ectodinがラット象牙芽細胞様細胞の分化に及ぼす影響について」  
 論文審査委員 (主査) 加藤靖正教授  
 (副査) 伊東博司教授  
 清浦有祐教授  
 菊井徹哉教授

### 論文の内容および審査の要旨

【研究の目的】 EctodinはSOSTドメインを有する分泌型糖タンパク質であり, Wntシグナルを阻害するアンタゴニストとして, 歯の発生における歯冠形態, 咬頭数, 歯数を決定する因子として働いている。Wntシグナルは象牙芽細胞の分化調節にも重要な役割をしていると報告され, dentinogenesisの調節因子として注目されている。EctodinがWntシグナルに作用してdentinogenesisに関与することが考えられるが, 象牙芽細胞の分化と, ectodinおよびWntシグナルとの関係については未だ不明な点が多い。

本研究ではラット切歯歯髓由来の培養細胞を用いて, ectodinとWntシグナルの関係がdentinogenesisにどのように影響しているかを検討した。

【実験方法】 SDラットの下顎切歯から酵素分離法により歯髓細胞を分離し, これらを5, 10, 15, 20日間培養して実験に供した。培養歯髓細胞にLiClを添加してWntシグナルの活性化状態を誘導し, 象牙芽細胞分化に対するWntシグナルの影響を調べた。象牙芽細胞の分化指標としてalkaline phosphatase (ALP), bone gla protiein (BGP), dentin sialophosphoprotein (DSPP) のmRNA発現量をリアルタイムPCR定量にて調べた。ectodinのmRNA発現量も合わせて調べた。さらに, ectodinのshRNA発現ベクターを製作して, ectodin knock downによる象牙芽細胞様細胞の分化, 機能への影響を調べた。形態的にはALP染色とvon Kossa染色の二重染色を行い, ALP発現状況と象牙質様石灰化結節の形成状況を調べた。

#### 【実験結果】

##### 1) 培養歯髓細胞の分化への影響

LiCl非作用群(対照群)ではvon Kossa染色陽性の石灰化結節が多数形成されていた。一方, LiCl作用群では対照群に比べて結節形成が減少し, ALP染色性も減弱していた。象牙芽細胞様細胞への初期分化マーカーであるALPのmRNA

発現量は, 培養5日目で対照群に比べてLiCl作用群で50%に抑制されていた。さらに, 石灰化に関する最終分化マーカーであるDSPPとBGPいずれのmRNA発現も, 培養20日目では対照群に比べ半分となっていた。

対照群におけるectodin mRNAの発現量は, 培養5日~10日目にかけて上昇し, その後経時的に減少した。同様に $\beta$ -cateninのmRNAの発現量も培養10日目にピークとなり, その後経時的に減少した。Ectodinと $\beta$ -cateninの発現量が最大になる培養10日目にLiClを作用させると, ectodin mRNA発現が対照群の約2倍になり,  $\beta$ -cateninのmRNA発現量は対照群に比べて約30%の増大を示した。

##### 2) Ectodinのknock downが象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響

Ectodinをknock downした象牙芽細胞様細胞の培養5日目におけるectodinのmRNA発現量は, knock downしていない細胞と比較して15%に抑制され, knock downの効果が確認できた。このときの $\beta$ -cateninのmRNAは非knock down細胞に比べて有意に増加した。さらにectodinをknock downした細胞の培養20日目のvon kossa染色では, 対照群に比較して石灰化結節の数は減少し, DSPPのmRNA発現量も40%に抑制された。

【考察および結論】 培養10日目において象牙芽細胞様細胞にLiClを作用させると分化が抑制されALP, BGP, DSPPのmRNAの発現が減弱して象牙質様石灰化結節の数も減少した。このときectodinのmRNA発現量は増強し, Wntシグナルに対するネガティブフィードバック機構の存在が示唆された。さらにectodinのsiRNAによるノックダウンの結果では, 象牙芽細胞様細胞のDSPP mRNA発現量の抑制と象牙質様石灰化結節形成の減弱が示されたことより, Wntシグナルは象牙芽細胞様細胞の分化を抑制しており, このシグナルをectodinが阻害することで象牙芽細胞様細胞への分化を促す方向に調整していることが判明した。

本論文に関しての審査委員会は平成27年2月5日に開催され, 審査委員より, 実験方法の再現性, 研究の臨床的な意義について質疑があり, そのいずれについても申請者から適切な回答が得られた。また, 委員会において論文の文章および図について加筆, 修正の指摘なされ, 後日提出された論文において適切に改訂されていたことを各委員が確認した。審査委員会は, 本論文が歯科医学の発展に寄与するものと認め, 申請者は学位授与に値すると判定した。

#### 掲載雑誌

奥羽大学歯学誌 第42巻, 3号 79-88 2015