

学位論文内容の要旨

| | | | |
|------|----------------------------------|-----|---|
| 受付番号 | 第 359 号 | 氏 名 | 中島 宗隆  |
| 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 | | |
| 指導教員 | 菊井 徹哉 | | |

論文内容の要旨(2,000字程度)

I 研究目的(300字程度)

EctodinはSOSTドメインを有する分泌型タンパク質であり、Wntシグナルを阻害するアンタゴニストとして知られている。歯の発生において歯冠の形態形成や咬頭の数、歯の数を決定する因子として重要な働きをしている。一方、Wntシグナルは象牙芽細胞の分化調節に重要な役割を果たしていることが報告されている。Dentinogenesisの調節因子として注目されている。このWntシグナルのアンタゴニストであるectodinがWntシグナルに作用してdentinogenesisに関与することは十分に考えられるが、これまでに象牙芽細胞の分化や機能に対してectodinとWntシグナルの関係を調べた報告はない。

本研究ではラット切歯から分離した培養歯髄細胞を利用してectodinとWntシグナルの関係がdentinogenesisに対してどのように作用しているかを調べることを目的とした。

II 研究方法(500字程度)

SDラットの下顎切歯から酵素分離法により歯髄培養細胞を分離した。これらの培養細胞を5, 10, 15, 20日間培養し実験に供した。これらの培養細胞にLiClを添加してWntシグナルを活性化状態にして、象牙芽細胞への分化への影響を調べた。また、ectodinのsiRNAを製作しノックダウンを行い分化、機能に対する影響を調べた。象牙芽細胞の分化指標として、ALP, Osteocalcin, DSPPのmRNA発現をリアルタイムPCRにて調べた。また、ectodinのmRNA発現も合わせて調べた。形態的にはALP染色とvon Kossa染色を行い象牙質様石灰化結節の形成を調べた。また、ectodinのmRNAのノックダウンにより象牙芽細胞に対する影響を調べた。

Ⅲ 研究結果(600字程度)

1) 培養歯髄細胞の分化に及ぼすLiClの影響 von Kossa染色陽性の石灰化結節が多く形成されていた。一方、LiClを添加した細胞では対照群に比較して石灰化結節の形成が抑制され、ALP染色性も減弱していた。

対照群の細胞はAKP染色性と von Kossa染色性の石灰化結節が多く形成されていた。一方、LiClを添加した細胞では対照群に比較して石灰化結節の形成が抑制され、ALP染色性も減弱していた。

線維芽細胞の初期の分化マーカーであるALPのmRNAの発現は培養5日目では対照群に比較してLiCl処理では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のmRNAの発現も、培養20日目では対照群に比較してすべて半分の発現量であった。

対照群の培養期間でのectodinのmRNA発現を経時的に調べたところ、培養5日～10日目にかけて発現量が上昇し、その後経時的に減弱した。これと同様に β -cateninのmRNAの経時的な発現量も培養10日目にピークが見られ、その後経時的に減弱した。次にectodinと β -cateninの発現量が最も強くなる培養10日目にLiClを作用させると、ectodin・mRNAの発現が対照群に比較して約2倍になっていた。また、 β -cateninのmRNAの発現量も対照群に比較して約30%の亢進を示した。

2) ectodinのKnock downが象牙芽細胞に及ぼす影響
ectodinに対するsiRNAを用いてknock downした歯髄細胞の培養5日目におけるectodinと β -cateninのmRNA発現は、対照群に比較して発現量が15%に抑制されていて、Knock downの効果が確認できた。このときの β -cateninのmRNAは対照群に比較して有意に増加していた。さらに培養20日目のALP染色、von kossa染色では、ectodinをknock downすると歯髄細胞の象牙芽細胞への分化が抑制され、対照群に比較してvon Kossa陽性石灰化結節の形成が抑制された。また、DSPPのmRNA発現も40%に抑制されていた。

Ⅳ 考察及び結論(600字程度)

培養歯髄細胞にLiClを作用させるとその分化が抑制され、ALP, Osteocalcin, DSPPのmRNAの発現が抑制され、象牙質様石灰化結節の形成も抑制されていた。しかし、ectodinのmRNAの発現が促進されており、Wntシグナルに対するネガティブフィードバック機構があることが示唆された。さらにectodinのsiRNAによるノックダウンの結果から、培養歯髄細胞のDSPPのmRNA発現が抑制され、象牙質様石灰化結節の形成が抑制されたことから、Wntシグナルは象牙芽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の分化を調整していると考えられた。