

Title	Tenascin-C promotes differentiation of rat dental pulp cells in vitro
Author(s)	松岡, 海地
Journal	歯科学報, 112(6): 768-769
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/2989">http://hdl.handle.net/10130/2989</a>
Right	

氏名(本籍)	まつおかかいち 松岡海地 (埼玉県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1941号(甲第1187号)
学位授与の日付	平成24年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Tenascin-C promotes differentiation of rat dental pulp cells in vitro
掲載雑誌名	International Endodontic Journal, doi:10.1111/j.1365-2591.2012.02089.x.
論文審査委員	(主査) 東俊文教授 (副査) 井上孝教授 齋藤淳教授 澁川義幸講師

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

Tenascin-C(TN-C)はEGF様反復構造, Fibronectin type III様反復構造, Fibrinogen様領域を有した細胞外マトリックスである。TN-Cが創傷治癒時に発現することが報告されており, 歯髄の断髄面においてもTN-Cが発現することが明らかとなっている。また断髄面に発現する分子にNotchがあり, 歯髄細胞から象牙芽細胞様細胞への分化に重要な働きをしていることが示唆されている。近年の研究からTN-CとNotchに関連性があることが明らかとなった。しかしながら, TN-Cが歯髄細胞のNotch発現に影響しているかを検索した研究はない。本研究の目的は, TN-Cが培養歯髄細胞に作用した場合におけるNotch発現への影響を分子生物学的に検索をすることである。

#### 2. 研究方法

培養歯髄細胞はSD系雄性ラットの切歯より歯髄組織を採取し, 細胞を単離した。TN-Cコート皿を作製するため, Recombinant human TN-Cを培養皿およびプラスチックカバーの全面に塗布後37°Cで2時間置いてTN-Cコート皿を作製し, 6~9継代目の培養歯髄細胞を $5 \times 10^4$ /ml播種した。実験群をTN-Cコートしたもの, 対照群をコートしていないものとした。はじめにコートしたりコンビナントTN-Cが付着しているかを確認するためTN-C抗体を用いて免疫蛍光染色法にて観察した。細胞増殖率は24, 48および72時間後の生細胞をWST-1法にて検索した。細胞分化の評価としてRT-PCR法は, 6, 12, 24および48時間培養後, 速やかに細胞を集め, mRNAの抽出を行い, 通法に従った。プライマーは象牙芽細胞様細胞の分化マーカーとしてNotch 1, Notch 2を, 硬組織形成能のマーカーとしてアルカリ・フォスファターゼ(ALP), オステオポンチン(OPN), およびオステオカルシン(OCN)を定量的RT-PCRにて解析した。また, 24時間後の蛋白レベルの反応をNotch 1, ALPおよびOCN抗体を用いて免疫蛍光染色法にて検索した。さらにALP activity assayを用いて評価した。

#### 3. 研究成績および考察

実験群は免疫蛍光染色法により培養皿上でTN-C抗体の陽性が観察された。このことからTN-Cは培養皿上に付着していることが確認された。細胞増殖率は72時間後に実験群が対照群と比較して有意に増加していた( $P < 0.05$ )。Iyerらにより線維芽細胞においてTN-CのEGF様反復構造がEGF受容体を介して細胞増殖を促

進していることを報告しており、本培養細胞も歯髄線維芽細胞を主体としているため TN-C の EGF 領域が作用したと考えた。RT-PCR の結果では象牙芽細胞様細胞の分化の指標である Notch 1, Notch 2 mRNA の発現において Notch 1 の結果は 6, 12, 24 時間で対照群に比べて実験群は有意に高い値を示し、Notch 2 は 6 時間で有意に高い値が認められた ( $P < 0.05$ )。硬組織形成能の指標である ALP, OPN, OCN mRNA の発現は、ALP は 6, 24 時間で有意な高い値を示し、OPN と OCN 共に 24, 48 時間で有意に高く増加していった ( $P < 0.05$ )。蛍光免疫染色法による 24 時間後の結果では、Notch 1, ALP, OCN とともに実験群が対照群に比べて強い陽性が観察された。ALP activity assay では対照群に対して実験群の方が高く発現し有意差を認めた ( $P < 0.01$ )。これらの Notch 発現の結果から、TN-C が歯髄細胞の Notch 受容体を活性化していることが明らかとなった。過去の *In vivo* 研究から Notch 1 は歯髄線維芽細胞および血管周囲細胞に、Notch 2 は象牙芽細胞下層の細胞に強く発現していることが知られている。本実験の結果から TN-C は培養歯髄細胞の Notch 1 および Notch 2 の両受容体に作用していることが考えられた。一方で Notch には EGF 様反復構造領域が存在し、この領域で Notch の活性を調節していることから、TN-C の EGF 様反復領域が Notch の活性に作用したと考えられた。また Oskarsson らにより、TN-C が Notch のポジティブ因子である MSI 1 を促進することで、Notch シグナルを高めていることを示唆しており、本実験でも同様に TN-C が Notch を高めていた。さらに ALP, OPN, OCN の発現の結果から、Notch の増加により培養歯髄細胞は硬組織形成能をもつ細胞へ分化が促進したと考えられた。

#### 4. 結 論

本実験の結果より TN-C は培養歯髄細胞の Notch を活性化し、硬組織形成能を有した細胞への分化を促進することが示唆された。

### 論 文 審 査 の 要 旨

Tenascin-C (TN-C) は EGF 様反復構造, Fibronectin type III 様反復, Fibrinogen 様領域を有した細胞外マトリックスで歯髄の断髄面に発現することが明らかとなっている。また同様に断髄面に発現する分子に Notch があり、歯髄細胞から象牙芽細胞様細胞への分化に関与する。しかしながら TN-C が歯髄細胞の Notch 発現に影響しているかを検索した研究はない。本論文は、リコンビナント TN-C をコートさせた培養皿を作製し、その上に培養歯髄細胞を播種して作用させた。その結果、TN-C が培養歯髄細胞へ作用した場合に Notch 発現は増加し、さらに歯髄細胞が硬組織形成能を有した細胞へ分化が促進することを明らかとしたものである。

本審査委員会は、平成23年11月24日に行われ、まずは松岡海地大学院から論文内容の説明がなされた。その後、各審査委員より次のような質問がなされた。1) Notch の働き、2) Odontoblast-like cells と mineralized tissue forming cells の違い、3) Notch 1 と Notch 2 について、4) TN-C を産生する細胞と働きに関してなどの質疑が行われたが、概ね妥当な解答が得られた。その他に、題名の明瞭化、材料および方法の記載に対する補足、付図およびその説明の修正、データの表現の妥当性など多くの修正すべき点を指摘され、訂正が行われた。

その結果、本研究で得られた結果は、今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。