

Title	Wnt3 positively and negatively regulates osteoblast differentiation of human periodontal ligament cells
Author(s)	吉澤, 佑世
Journal	, (): -
URL	http://hdl.handle.net/10130/3408
Right	

氏名	吉澤 佑世
学位	博士 (歯学)
学位記番号	第2024号 (甲 第1258号)
学位授与年月日	平成26年 3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
論文審査委員	主査 阿部 伸一 教授 副査 片倉 朗 教授 副査 齋藤 淳 教授 副査 古澤 成博 教授 副査 東 俊文 教授
学位論文名	Wnt3 positively and negatively regulates osteoblast differentiation of human periodontal ligament cells

学位論文内容の要旨

1. 研究目的

骨のリモデリングは注目すべき代謝機構であり、骨形成と骨吸収はとても複雑なメカニズムで行われていることが示されている。骨の恒常性を司るサイトカインである TGF- β や BMP は、骨形成において促進と抑制の二相性のはたらきを持つ。Wnt signaling も骨形成において重要なシグナルであり、近年、Wnt signaling のアンタゴニストが骨形成において重要な役割を持つことが明らかにされてきている。ヒト歯根膜細胞 (HPDL 細胞) は骨芽細胞に潜在的に分化する能力を備えていることが *in vitro* の実験において示されており、歯槽骨の再生における細胞源として注目されている。しかしながら、HPDL 細胞の骨芽細胞分化と Wnt signaling の関係性については不明な点が多い。本研究では、Wnt signaling のアゴニストである Wnt3A を複数回投与し、Wnt signaling を持続的に活性化した時、HPDL 細胞の骨芽細胞分化能に与える影響を明らかにした。

2. 研究方法

正常 HPDL 細胞を SCGM で 5-8 継代培養、 1×10^5 cells/cm² で播種し、各条件で 72 時間培養後、それぞれの分析に用いた。培地には α -MEM 無血清培地を用い、10 ng/ml の Wnt3A で単回、もしくは複数回 (12 時間、24 時間毎) 処理した。アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は ALP 活性染色で検出した。リン酸化 Smad1/5 とリン酸化 Akt はウエスタンブロット法にて検出し、骨芽細胞分化関連遺伝子 (*ALP*、*BSP*、*IGF-1*、*RUNX2*、*MSX-2*、*CollA1*) の発現は定量的リアルタイム PCR にて測定した (n=5)。また、HPDL 細胞を GSK3B の特異的インヒビターである CHIR99021 を用いて同条件で処理、培養し、評価した。

3. 研究成績および結論

Wnt3A 単回投与は ALP 活性陽性細胞数を増加し、*ALP* の mRNA の発現が複数回投与に比較して有意に増加した($p<0.01$)。Wnt3A 複数回投与は対照的に ALP 活性を減少し、有意に *ALP* 発現を減少した($p<0.01$)。Wnt3A 複数回投与は骨芽細胞分化マーカー (*BSP*、*IGF-1*、*RUNX2*、*MSX-2*) の発現を減少した。Wnt3A 単回投与は Smad1/5 と Akt のリン酸化を引き起こしたが、Wnt3A 複数回投与は Smad1/5 と Akt のリン酸化を強く阻害した。CHIR99021 単回投与では ALP 活性と *ALP* の発現は増加したが、CHIR99021 複数回投与では ALP 活性と *ALP* の発現が単回投与に比較して有意に減少した($p<0.01$)。CHIR99021 複数回投与は CHIR99021 単回投与に比較して、*MSX-2* の発現もまた有意に減少した($p<0.01$)。

我々は以前、TGF- β 1 の骨芽細胞分化の抑制モデルを確立し、この抑制機序には IGF-1 の減少と、それに伴う PI3K/Akt 経路の減弱が深く関わっていることを報告した。本研究の結果から、HPDL 細胞において Wnt signaling の持続的活性化は、HPDL 細胞の骨芽細胞分化を抑制する可能性が示された。また、その抑制には Smad 経路と PI3K/Akt 経路のダウンレギュレーションが大きく関わっており、Wnt3A は HPDL 細胞の骨芽細胞分化に対し、促進と抑制の二相性の働きを持つことが示唆された。

最終試験の結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第1258号	氏名	吉澤 佑世
最終試験担当者	主 査	阿部 伸一	教 授
	副 査	片倉 朗	教 授
		齋藤 淳	教 授
		古澤 成博	教 授
		東 俊文	教 授
最終試験施行日	平成25年11月12日		
試験科目	歯科保存学		
試験方法	口頭試問		
試験問題	主題ならびに関連問題		
<p><u>結果の要旨</u></p> <p>本審査委員会は主題ならびに関連問題について最終試験を行った結果、十分な学識を有することを認め、合格と判定した。</p>			

学位論文審査の要旨

骨の形成と吸収は様々な細胞内シグナルと、そのクロストークによって成り立っている。その中でも近年注目を集めているのが Wnt signaling であり、骨代謝に対してまだまだ不明な点が多い。骨の恒常性を司る TGF- β や BMP は、骨形成において促進と抑制の二相性のはたらきを持つと報告されており、Wnt signaling のアンタゴニストが骨形成において重要な役割を持つことも報告されている。ヒト歯根膜細胞 (HPDL 細胞) は骨芽細胞分化能を潜在的に持っているが、歯槽骨の再生における細胞源としてそのメカニズムが注目されているにもかかわらず、Wnt signaling の影響についてはまだ明らかにされていない。本研究では、Wnt signaling のアゴニストである Wnt3A が、HPDL 細胞の骨芽細胞分化に与える影響を検証した。これらの内容より、Wnt3A は HPDL 細胞の骨芽細胞分化に対し、促進と抑制の二相性の働きを持つことが示された。

本審査委員会では、(1)なぜこれらのシグナルとアゴニストを選んだのか、(2)なぜ HPDL 細胞を実験材料として選択したのか、(3)実験モデルの反復投与の意義は何か、(4)これらの結果の臨床的な意味は何か、について討論を行い、質疑がなされた。

(1)については、Wnt3A は一般的に実験に用いられ、購入可能なリコンビナント Wnt タンパクであり、カノニカル Wnt 経路のアゴニストである。また、骨形成に促進的に働くということが示されており、その HPDL 細胞での働きがいまだ解明されていないため。PI3K/Akt 経路、Smad 経路は骨の恒常性において必須であることが示されているため。(2)については、歯学において HPDL 細胞は歯槽骨形再生の重要な細胞源であり、その分化メカニズムの解明は病態や治療において重要であるため。(3)については、反復投与によってパラクリンやオートクリンなどを排除することでそのシグナル、タンパクの作用のみでどういった分子が動いているのかを細かく検索できるため。(4)については、歯周炎や根尖性歯周炎による歯槽骨の破壊や、難治性の症例の骨形成の治療遅延などにはこれらのシグナルが関わり合い、骨形成にストップが生じることで骨の再生がなされないのではないかと考えられる。その分子レベルでのメカニズムの解明が病態や治療薬の開発の一助になるのではないかと考えられる、との解答を得た。また、英文表記、図表の修正等についての指摘が行われた。

論文内容及びその質疑により概ね妥当な解答が得られたことにより、本研究は今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。