

Title	Wnt regulatory molecules coordinately regulate osteoblast differentiation
Author(s)	月野和, 隆
Journal	, (): -
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3616">http://hdl.handle.net/10130/3616</a>
Right	

氏名	月野和 隆
学位	博士 (歯学)
学位記番号	第 2 0 8 5 号 (甲 第 1298 号)
学位授与年月日	平成 2 7 年 3 月 3 1 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 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 副査 山本 仁 教授
学位論文名	Wnt regulatory molecules coordinately regulate osteoblast differentiation

## 学位論文内容の要旨

### 1. 研究目的

歯周病の治療やインプラント治療において、顎骨欠損部位の新生骨形成を効果的に促進する治療法の開発は重要な課題である。我々は、BMP と Dexamethasone (以下 Dex) を複合添加して培養すると、間葉系幹細胞を多く含むヒト歯根膜由来 (以下 HPDL) 細胞から骨芽細胞への分化が促進されることを見いだした。Wnt 経路は骨分化調節において大きな役割を果たしていることが明らかとなり、近年特に注目されている。しかし、その機能は多岐に亘るため未解明な点が多い。特に他の骨分化誘導物質との関係については重要性が示唆されているが、詳細なメカニズムは不明である。本研究では、HPDL 細胞 が BMP 2/7 と Dex により骨芽細胞へ分化する際の骨分化誘導、特に Wnt 抑制因子について詳細に検討することにより、BMP と Wnt シグナル間の相互関係を明らかにする。

### 2. 研究方法

HPDL 細胞は Lonza より購入し、SCGM (BulletKit® Stromal cell growth medium, Lonza) を用いて培養した。12well プレートに  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、翌日、培地交換を行った。培地には  $\alpha$ -MEM (Life Technologies) を使用し、添加物として、100ng/ml BMP2/7 (R&D Systems)、100nM Dex (Sigma) をそれぞれ単独添加した群と、BMP2/7 と Dex を複合添加した群に分け、72h 培養した。培養後、BCIP/TCP (Roche Diagnostics) にて ALP 活性染色を行い、骨芽細胞への分化を確認した。各群より抽出した RNA から、Wnt 経路抑制因子及び骨分化マーカーについてリアルタイム PCR (Applied Biosystems 7500 Fast) で確認した。さらに、各群よりタンパクを抽出し、Western blot 法を用い、

Smad 経路の活性を確認した。

### 3. 研究成績および結論

ALP 活性染色では、BMP2/7+Dex 複合添加群は他の群と比較して濃く染色された。定量的 RT-PCR 法による各群の ALP 発現量は、BMP2/7+Dex 複合添加群はコントロールに比較し約 10 倍増加していた。この時、Wnt 経路抑制因子である SOST は、BMP2/7 刺激で発現が増加するが、Dex との複合添加により著明に(約 1/4 倍)発現が低下していた。また、外部より SOST を添加することにより、ALP 活性が抑制された。Wnt 経路阻害因子、SFRP2、DKK2 では、BMP2/7 及び BMP2/7+Dex 複合添加群で段階的に発現が低下していた。また、DKK1、SFRP1 は Dex により発現量が上昇し、BMP と複合添加することにより、特に、DKK1 では他の群と比較して有意に増加した。DKK1, 2 と SFRP1, 2 は互いに拮抗する作用を持つ可能性が示唆された。Western blot 法より、Smad の活性化の指標であるリン酸化 Smad1/5 を検討すると、BMP2/7 単独群では Smad1/5 の活性が認められるが、BMP2/7+Dex 複合添加群では活性が認められず、BMP2/7 による Smad1/5 の活性化を Dex が著明に抑制していた。

以上の結果より、SOST は Wnt 経路を抑制し、骨分化を抑制する重要な物質である。また、多種類の Wnt 抑制因子発現の変化は、Wnt シグナル間のフィードバックメカニズムによる可能性が示唆された。結論として、Wnt 阻害因子間のバランスのとれた相互の拮抗作用が骨再生の調整に重要である。

最終試験の結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第1298号	氏名	月野和隆
最終試験担当者	主査	片倉 朗	教授
	副査	齋藤 淳	教授
		古澤 成博	教授
		東 俊文	教授
		山本 仁	教授
最終試験施行日	平成26年 10月 2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。Wnt 経路は骨分化調節において大きな役割を果たしていることが明らかとなり、近年特に注目されている。特に他の骨分化誘導物質との関係については重要性が示唆されているが、詳細なメカニズムは不明である。本研究では、ヒト歯根膜由来 (HPDL) 細胞が BMP 2/7 と Dex により骨芽細胞へ分化する際の Wnt 抑制因子について詳細に検討することにより、BMP と Wnt シグナル間の相互関係を検討した。これらの内容により、HPDL 細胞における、BMP-Wnt シグナル間の骨分化促進機序には、SOST 遺伝子が重要な役割を担っていることが示唆された。また、Wnt 抑制因子群は、相互に発現を拮抗することにより Wnt シグナルを調節している可能性が示唆された。本審査委員会では、(1) なぜ HPDL 細胞を実験材料として選択したのか、(2) Wnt signal が関与している Human disease には具体的にはどのようなものが含まれるのか、(3) 今回の研究は HPDL 細胞以外の他の細胞においても確認できるのか、(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、生化学講座では、以前より HPDL 細胞を用いた情報伝達経路について研究を進めており、HPDL 細胞は未分化な間葉系幹細胞を多く含むことから、再生医療において利用価値があると考えられており、分化メカニズムの解明を進めているため。(2)については、Wnt signal は生物の初期発生・形態形成の制御や細胞の増殖・分化・アポトーシスを制御している。Wnt signal は骨形成にも関与しており、そのため骨代謝異常症の原因であると考えられている。また細胞の増殖や生存も管理していることから、癌などの腫瘍形成にも関与している。(3)については、MC3T3 にて同じ条件で ALP 活性の確認を行ったところ、HPDL と同じような結果は得られなかった。MC3T3 では BMP や Dex の濃度が足りなかったことと、今回の現象が細胞特異的であった可能性が考えられる。(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癒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、との回答を得た。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回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。