

Title	The comparison between Single vs Repeated Administration of Wnt 3 A of HPDL Cells
Author(s)	吉澤, 佑世
Journal	歯科学報, 117(1): 64-65
URL	http://hdl.handle.net/10130/4195
Right	
Description	

氏名(本籍)	よし ざわ ゆう せい (栃木県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第2024号(甲第1258号)
学位授与の日付	平成26年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	The comparison between Single vs Repeated Administration of Wnt 3 A of HPDL Cells
掲載雑誌名	Journal of Hard Tissue Biology 第24巻 4号 331-339頁 2015年
論文審査委員	(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

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 Wnt 3 A 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、10ng/ml の Wnt 3 A 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 Smad 1/5 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*, *Col1A1*)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 GSK 3 β 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

Wnt 3 A 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)。Wnt 3 A 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)。Wnt 3 A 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。Wnt 3 A 単回投与は Smad1/5 と Akt のリン酸化を引き起こしたが、Wnt 3 A 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。

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、購入可能なりコンビナント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。