

2022年 1月 24日

学位論文審査並びに最終試験結果報告書

大学院歯学研究科長 殿

主査 齊藤 正人



副査 志茂 剛



副査 植原 治



今般 石田 成美 にかかわる学位論文審査並びに最終試験を行い下記の結果を得たので報告する。

記

1 学位論文題目

歯原性上皮細胞株と歯髄幹細胞の自発的Ca<sup>2+</sup>応答と細胞間相互作用による遺伝子発現調節機構の解明

2 論文要旨 別添

3 学位論文審査の要旨 別添（様式第12号）

4 最終試験の要旨 別添（様式第13号）

以上の結果 石田 成美 は博士（歯学）の学位を授与する資格の~~ある~~<sup>ない</sup>ものと判定する。

様式第12号（第5条・第13条関係）

学位論文審査の要旨

主査 齊藤 正人  
副査 志茂 剛  
副査 植原 治



氏 名：石田 成美

学位論文題目：歯原性上皮細胞株と歯髄幹細胞の自発的Ca<sup>2+</sup>応答と細胞間相互作用による  
遺伝子発現調節機構の解明

以下本文（15行目から1000字以内）

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度（[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>）は、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）や受容体型チロシンキナーゼ（RTK）を介して上昇することが知られている。この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は、Ca<sup>2+</sup>シグナルと呼ばれており、遺伝子発現を含む様々な細胞機能を調節することが明らかにされつつある。非興奮性細胞におけるCa<sup>2+</sup>流入機構であるストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入（SOCE）は、その調節分子であるStim1やOrai1の機能不全によって骨やエナメル質形成の不全が起こることが知られており、歯の発生におけるCa<sup>2+</sup>シグナルの重要性が注目されている。

歯の発生においては、上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用が重要な働きを担っていると考えられている。歯原性上皮細胞株であるSF2細胞と歯髄幹細胞（DPSC）を使ったin vitroモデル実験系では、これらの細胞を共培養するとSF2細胞はエナメル芽細胞に、DPSCは歯髄細胞や象牙芽細胞に分化することが報告されている。本研究では、SF2細胞とDPSCを使って、培養条件で発生するCa<sup>2+</sup>応答の発生機構を明らかにするために、蛍光タンパク質型Ca<sup>2+</sup>センサー（G-GECOあるいはR-GECO）を安定発現する細胞を作成して実験に用いた。それらを共培養した上皮間葉相互作用のin vitroモデル実験系にて細胞間相互作用や歯の発生におけるCa<sup>2+</sup>シグナルの発生機構とそれらの役割を解析した。

SF2細胞では自発的なCa<sup>2+</sup>応答が観察され、このCa<sup>2+</sup>応答は P2Y受容体阻害剤やATP分解酵素、RTK阻害剤によって抑制された。SF2細胞における遺伝子発現を調べると pmepa1 と H19の遺伝子発現がSOCEの阻害によって増加した。これらの結果から、このCa<sup>2+</sup>応答にはSF2細胞から放出されるATPと成長因子の相互作用が関与することが明らかとなり、Ca<sup>2+</sup>応答は遺伝子発現に対して抑制的に作用している可能性が示された。また高濃度のGefitinibの作用からRTKを介するCa<sup>2+</sup>非依存性の遺伝子発現調節機構の存在が示唆された。

DPSCではCa<sup>2+</sup>応答を規則的に繰り返す自発的Ca<sup>2+</sup>オシレーションが観察された。Gene ontology解析の結果よりDPSCにはリゾフォスファチジン酸 (LPA) 受容体の発現が示唆され、その阻害剤であるRO6842262 (RO) の添加によってCa<sup>2+</sup>応答が抑制された。また無血清培地へのLPA添加でもCa<sup>2+</sup>オシレーションが観察されたことから、DPSCのCa<sup>2+</sup>オシレーションがLPAによって起こることが明らかとなった。さらにTGF β 3やNOTCH3の遺伝子発現がROによって増強したがLaCl<sub>3</sub>の影響を受けなかったことから、LPAがCa<sup>2+</sup>非依存的にこれらの遺伝子発現を抑制している可能性が考えられた。

SF2細胞とDPSCの共培養においては、SF2細胞のpmepa1、DPSCのTGF β 3とNOTCH3遺伝子の発現が増強したことから、これらの細胞から放出されて遺伝子発現を調節する生理活性物質の存在が推察された。

様式第13号（第5条・第13条関係）

最終試験（学力の確認）の要旨

主査	齊藤 正人
副査	志茂 剛
副査	植原 治



氏 名：石田 成美

以下本文（10行目から200字以内）

本論文は、前エナメル芽細胞株と歯髄幹細胞それぞれのカルシウムシグナル応答を蛍光タンパク質センサーにて解析し、その応答機構を明らかにした。またカルシウムシグナルによる細胞の相互作用を解析し、相互作用に関わる遺伝子発現についても報告した。

最終審査において主査および副査から結果の分析に関していくつかの不明確な点が指摘されたが、その訂正も期日内に的確に対応した。本論文は歯の発生研究の新たなアプローチを予見するものであり、総合的に学位取得に適すと考える。