

# 論 文 要 旨

歯原性上皮細胞株と歯髄幹細胞の自発的  $\text{Ca}^{2+}$  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

令和 3 年 度  
北海道医療大学大学院歯学研究科  
石田 成美

## 【目的】

細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  は多くの細胞で重要なセカンドメッセンジャーとして機能している。上皮細胞や間葉系細胞などの非興奮性細胞では、細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出とストア作動性  $\text{Ca}^{2+}$  流入 (SOCE) を介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが調節されている。この SOCE の責任遺伝子である Stim1 と Orai1 は、重症複合型免疫不全症の原因遺伝子であることが明らかにされ、さらにこの疾患の表現系の 1 つがエナメル質形成不全であることから、歯の発生やエナメル質の形成における  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの重要性が注目されている。

歯の発生過程において上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用が重要と考えられており、その *in vivo* モデル実験系として歯原性上皮細胞株である SF2 細胞と歯髄幹細胞 (DPSC) を用いた実験系が用いられている。SF2 細胞がヒト DPSC や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) との共培養によってエナメル芽細胞に分化することや、DPSC が SF2 細胞との共培養によって象牙芽細胞へ分化することが報告されている。また SF2 細胞の SOCE の阻害によってエナメルマトリックスタンパクの発現が低下することから、歯の発生過程における  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの重要性が示唆されている。本研究は SF2 細胞と DPSC における  $\text{Ca}^{2+}$  応答の発生機構を明らかにし、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と遺伝子発現との関係性から、これらの細胞の共培養における遺伝子発現の制御における  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの役割を明らかにすることを目的とする。

## 【方法】

レンチウイルスベクターを用いてカルシウムセンサータンパク質 (G-GECO, R-GECO) 遺伝子を安定発現する SF2 細胞 (G-GECO-SF2) および DPSC (R-GECO-DPSC) を作製して実験に用いた。蛍光顕微鏡を用いて、 $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  の培養条件下での長時間ライブセルイメージングを行い、G-GECO-SF2, R-GECO-DPSC の単独培養とそれらの共培養による  $\text{Ca}^{2+}$  応答や、それらに対する各種阻害剤の作用を解析した。遺伝子発現解析では、SF2 および DPSC の単独培養、共培養、および共培養を行った細胞から total RNA および cDNA を調整し RT-PCR を行った。

## 【結果および考察】

- ① G-GECO-SF2 単独培養では、間欠的な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が認められた。この自発的  $\text{Ca}^{2+}$  応答は、P2Y 受容体阻害剤の Suramin (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ ) と ATP 分解酵素である Apyrase (5 U/mL) によって抑制されたことから、これには P2Y 受容体の関与が示唆された。また

10  $\mu\text{M}$  の Gefitinib が抑制作用を示したが、1  $\mu\text{M}$  の Gefitinib は抑制作用を示さなかった。Gefitinib は、1  $\mu\text{M}$  程度で EGF 受容体を特異的に阻害するが、高濃度では非特異的な抑制作用を示すことから、自発的  $\text{Ca}^{2+}$  応答には EGF 受容体以外のリセプターチロシンキナーゼ (RTK) の関与が示唆された。また FIIN-2 (1  $\mu\text{M}$ ) の抑制作用からその RTK の 1 つとして FGF 受容体の関与が示唆された。

SF2 細胞の単独培養では、pmepal と H19 の遺伝子発現が SOCE 阻害剤である  $\text{LaCl}_3$  によって増加したことから、 $\text{Ca}^{2+}$  はこれらの遺伝子発現に対して抑制的に作用することが示唆された。H19 の発現の 10  $\mu\text{M}$  Gefitinib による抑制と 1  $\mu\text{M}$  Gefitinib による増強から、EGF 受容体を介する抑制系とそれ以外の RTK を介する促進系の存在が示唆された。一方、pmepal の遺伝子発現は、1  $\mu\text{M}$  Gefitinib で抑制され、10  $\mu\text{M}$  Gefitinib を増強されたことから、EGF 受容体を介する促進系とそれ以外の RTK を介する抑制系の存在が示唆された。

- ② R-GECO-DPSC を血清存在下で培養すると、 $\text{Ca}^{2+}$  応答を規則的に繰り返す自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが観察された。網羅的遺伝子発現解析の結果から、ヒト DPSC におけるリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体を強く発現している可能性が示唆された。この  $\text{Ca}^{2+}$  応答は、リゾホスファチジン酸受容体 (LPAR1) の阻害剤である R06842262 (R0) によって抑制された。また B27, EGF, FGF を含む無血清培地に LPA を添加することによって、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション惹起された。さらにこの  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、無血清培地から EGF や FGF を除去すると  $\text{Ca}^{2+}$  応答の幅が減少する傾向にあった。これらの事から DPSC における  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションには FGF や EGF と LPA の相互作用が関与することが明らかになった。
- ③ DPSC における遺伝子発現と LPA の関係を調べると、 $\text{TGF } \beta 3$  や NOTCH3 の遺伝子発現が R0 によって増強したが  $\text{LaCl}_3$  の影響を受けなかった。これらのことから LPA が  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的に  $\text{TGF } \beta 3$  や NOTCH3 の遺伝子発現を抑制している可能性が示唆された。
- ④ SF2 細胞と DPSC の共培養では、単独培養時と同様の  $\text{Ca}^{2+}$  応答が観察された。また共培養によって SF2 細胞における pmepal, DPSC における  $\text{TGF } \beta 3$  と NOTCH3 の発現増強が起こることが RT-PCR で確認されたことから SF2 細胞及び DPSC から放出されて遺伝子発現を調節する何らかの生理活性物質の存在が明らかになった。 $\text{TGF } \beta 3$  と NOTCH3 の発現が  $\text{LaCl}_3$  によって抑制されたことから、SF2 由来の生理活性物質は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性に遺伝子発現制御を制御することが示唆された。また DPSC から放出されて SF2 細胞の

pmepa1 発現を増強する物質の存在が示唆された。

#### 【結論】

本研究において、SF2 細胞および DPSC において自発的  $\text{Ca}^{2+}$  応答が発生し、これらが P2Y 受容体や LPAR1 などの G タンパク質共役型受容体と RTK の相互作用が関与する事が明らかになった。また SF2 細胞および DPSC から放出されて  $\text{Ca}^{2+}$  依存性に遺伝子発現を調節する物質の存在が示唆された。今後、これらの生理活性物質の同定によって上皮・間葉相互作用における遺伝子発現調節の分子機構の解明に寄与すると考えられる。