

## 論文審査の要旨

報告番号	㊦・乙 第 2971 号	氏名	関 辰明
論文審査担当者	主査 教授 井上 富雄 副査 教授 飯島 毅彦 副査 教授 高見 正道		
(論文審査の要旨)			
<p>学位申請論文「Establishment of mouse gingival junctional epithelial cell line using a bioengineered tooth system」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>歯周組織を構成する接合上皮 (JE) の破壊が歯周病進行のきっかけとなるが、JE の性質には不明な部分が多い。そこで本研究は、申請者の所属講座が開発した再構成歯胚を用いて、JE 細胞の不活化細胞株の樹立を行った。GFP マウス由来歯原性上皮細胞および野生型マウス由来間葉系細胞からなる再構成歯胚を作製したところ、GFP 陽性細胞で天然歯の JE で発現が報告されている Odam、Krt17、Icam1 の遺伝子発現が確認された。この GFP 陽性細胞について SV40 large T を遺伝子導入して細胞の不活化を試みたところ、少なくとも 20 継代まで良好に増殖し、歯原性上皮の特異的マーカーとされている Krt19 や、Icam1 の発現も認められた。以上の結果から、JE の機能を有している細胞株を樹立した可能性が示唆された。</p> <p>本論文の審査において、副査の飯島委員および高見委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p><b>飯島委員の質問とそれらに対する回答：</b></p> <p>1. 歯周炎では白血球の接着などが起こるが、本上皮細胞株を用いて、炎症時の上皮細胞の機能を検討する研究としてはどのようなものが考えられるか。</p> <p>(作製した JE 細胞株と口腔上皮細胞株をそれぞれ LPS 等で刺激することで炎症状態とし、過去に報告がある炎症状態における上皮細胞間接着分子および炎症性細胞接着分子の発現にどのような変化が生じるかを検討する研究が考えられる。また、上皮細胞と血管内皮細胞を、メンブレンを介して共培養した実験モデルを使用することで、炎症反応時における上皮細胞のバリエーションや、上皮組織と下部組織との間の動態を明らかにした研究と同様の手法を用いることで、炎症時の JE 細胞の機能をより詳細に検証しうると考えられる。)</p> <p>2. 接合上皮はエナメル質と接着するが、この株が接着する機能をもっているかを確認する研究はどのようなものが考えられるか。</p> <p>(JE は odontogenic, ameloblast associated や Laminin5 などを通じてエナメル質に接着していることが明らかになっており、作製した細胞株をリン酸カルシウムや Laminin5 等でコーティングした dish と通常の細胞培養 dish でそれぞれ培養を行い、接着タンパク質の発現にどのような変化があるか検討していきたい。エナメル質や骨を構成するハイドロキシアパタイトの主成分であるリン酸カルシウムは、in vitro での骨研究に用いられており、今後の研究においてエナメル質の代用としても応用可能であると考えられる。また、実際にマウスまたはヒト抜去歯からエナメル質部分を採取し、その上で細胞株を培養し、エナメル質と細胞間に接着がなされるかを、過去の電子顕微鏡で報告されている接着様式と比較・検討する研究も考えられる)</p>			

#### 高見委員の質問とそれらに対する回答：

1. 接合上皮の生物学的な特徴について説明しなさい。

(接合上皮は他の口腔上皮といくつか異なる特徴を有している。接合上皮は、エナメル質に直接接している非角化重層扁平上皮であり、細胞間隙が広く細胞間の物質の透過性が高く、そのために血清成分が歯肉溝に向かって歯肉溝浸出液として放出される[1-4]。この歯肉溝浸出液中には補体や抗体、抗菌ペプチドなどが含まれ、さらに、好中球やマクロファージも通過して歯肉溝に移動しており、口腔内細菌の侵入に対しての感染防御機能を有している[5]。口腔内細菌の増加により、歯肉溝内での炎症状態が進行することによって、接合上皮が破壊されることが歯周病の進行のきっかけとなる)

2. 口腔上皮は細胞増殖・代謝が活発であるが、接合上皮の細胞増殖は他の組織と比べてどうか。

(口腔上皮の多くは角化重層扁平上皮であり、基底細胞から分化した細胞が角化細胞として表層から脱離するまでの時間(ターンオーバー)が通常9-12日に対して、接合上皮のターンオーバーは極めて早く、霊長類では5-10日、マウスでは3-5日であるとされている。これを上皮表面に対する基底膜の比率を考慮すると、接合上皮の代謝は口腔上皮の50倍以上となる。これは、BrdUを腹腔内投与したマウスの接合上皮では、24-48時間でBrdU標識した細胞が消失しているにも関わらず、口腔上皮では48時間経過しても有棘細胞層に観察されたとする実験からも明らかになっており、接合上皮は代謝の早い細胞であると考えられる)

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

#### 主査 井上委員の質問とそれらに対する回答：

1. GFP陽性細胞をすべて接合上皮細胞(JE)とする根拠を説明しなさい。

(我々は、再構成歯胚技術を用いた先行研究によってJEが歯原性上皮由来(GFP陽性)であることを明らかにしている。歯原性上皮からはJE以外に、エナメル芽細胞やヘルトヴィッヒの上皮鞘などが形成されるが、エナメル芽細胞はエナメル質形成後に消失し、ヘルトヴィッヒの上皮鞘は歯根形成後にマラッセの上皮残遺として歯根周囲に残存する。本研究ではGFP陽性細胞を歯頸部周囲から採取したため、マラッセの上皮残遺の混入は無く、我々が用いた再構成歯は歯の形成が終了しているため、GFP陽性部位はJEとしての形成も完了していると考えられる。RNAシーケンスを用いて遺伝子発現を解析したところ、天然歯のJE細胞との類似性が確認されている。以上のことから、GFP陽性細胞はJE細胞であるとして本研究を遂行した)

2. 接合上皮を構成する細胞は均質ではないと考えられるが、作製した細胞株ではどうなっているか。

(JEは部位によってある程度タンパク発現に違いがあることが報告されている。例えばJEのマーカー候補と目されていたodontogenic, ameloblast associated (ODAM)は、エナメル質との境界でのみ発現が報告されている。この理由として、JEは1つの細胞集団だが、部位などの影響で遺伝子発現に変化が生じるのか、それとも様々な種類の細胞集団で始めから遺伝子発現に変化があるのかは、現時点では不明である。また、今回作製した細胞株もGFP陽性JEのどの部位に由来するかは明らかに出来ていない。そのため、作製した細胞株は、JEの一部の機能を有した1つの細胞として扱う必要がある。今後、低酸素状態や各種接着因子の併用など培養条件を変化させて、より慎重な機能評価が必要となると考えている)

主査の井上委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判断した。

(主査が記載)