

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	梶浦 久仁洋
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 河野 哲 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦
論文題目	Shikonin による歯髄幹細胞の分化誘導
<p><u>論文内容の要旨</u></p> <p>【目的】</p> <p>Vitamin K2 同族体の1つであるメナテトレノン(menatetrenone)は、骨粗鬆症治療薬や止血薬として臨床で用いられ、骨の形成、組織の石灰化や血液凝固に関与することが知られている。しかしながら、その歯科領域における臨床的意義については、十分な検討がされておらず不明な点が多い。Vitamin Kの基本骨格であるナフトキノン誘導体のShikoninは生薬の紫根に含まれる天然赤色色素成分であり、古くより咽頭炎、火傷、切傷などの治療や漢方薬として用いられてきたものの、その基本的分子メカニズムは解明されていない。</p> <p>一方、ヒアルロン酸はCD44を介して歯髄幹細胞を象牙芽細胞様分化に誘導することが知られているが、その細胞内シグナルの詳細は解明されていない。また、ヒアルロン酸以外に歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する物質の有無についても不明である。さらに、分化誘導物質が存在した場合、その歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導には、ヒアルロン酸と同様にCD44を介する細胞内シグナルが必要であるか明らかにされていない。</p> <p>そこで、今回、このShikoninに注目し、歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導能の有無を検証し、さらにその象牙芽細胞様分化誘導する新たな化合物を探索した。そして、その歯髄幹細胞を象牙芽細胞様分化誘導する新たな化合物の細胞内シグナルが、ヒアルロン酸と同じCD44を介するか検証した。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>ヒト歯髄幹細胞はヒト歯髄幹細胞培養液(Lonza)を用いて37℃、5%CO₂条件下で培養した。試薬としてVitamin K1, Vitamin K3, Vitamin K4, 1, 4-Benzoquinone, Emodin, Aloe emodin (東京化成工業), Vitamin K2, Shikonin (富士フィルム和光純薬), Alkannin(長良サイエンス)を用いた。歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に関与する化合物の探索をウエスタンブロット法にて、dentin sialophosphoprotein (象牙質シアロリンタンパク質:以下, DSPP)の発現誘導により検証した。また、その化合物による細胞内シグナルを検証するため、培養液中に様々な抑制剤を加えて検証するシグナルブロック解析を行った。</p>	

【結 果】

歯髄幹細胞を象牙芽細胞様へ分化誘導する化合物の探索の結果、Vitamin Kの基本骨格であるナフトキノン誘導体の Shikonin には、象牙芽細胞のマーカーである DSPP の発現を誘導した。また Shikonin とその光学異性体である Alkannin には DSPP の発現誘導は認めなかった。細胞内シグナル伝達において、Shikonin による歯髄幹細胞の象牙芽細胞様への分化誘導には Akt タンパク質と mTOR タンパク質が関与していた。またその DSPP の発現は PI3K inhibitor, Akt inhibitor, mTOR inhibitor により抑制された。さらに CD44 をノックダウンした場合、Shikonin による DSPP の発現は抑制された。

【考 察】

ヒアルロン酸による歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導には、CD44 の発現自体が重要であることが明らかになった。また Shikonin が歯髄幹細胞を Akt-mTOR シグナル伝達を介して象牙芽細胞様分化誘導することから Shikonin は象牙芽細胞への分化誘導剤として有用であることが考えられ、歯科領域、とりわけ歯内治療においては適切な材料との組合せにより、直接覆髄薬や生活歯髄切断治療薬としての可能性があることが示唆された。

【結 論】

歯髄幹細胞を象牙芽細胞様へ分化誘導する化合物の探索およびその化合物の細胞内シグナルを検証した結果、歯髄幹細胞を Shikonin で処置すると、DSPP の発現が誘導された。また、Shikonin の DSPP 発現には、Akt-mTOR シグナル伝達が関与していた。さらに Shikonin の DSPP 発現には、CD44 の関与が重要であった。