

氏 名（本籍）： ^{ふた}二 ^ぎ木 ^{まさ}正 ^{はる}晴

学 位 の 種 類： 博 士 （ 歯 学 ）

学 位 記 番 号： 歯 博 第 7 2 4 号

学位授与年月日： 平成 27 年 3 月 25 日

学位授与の要件： 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科・専攻： 東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学 位 論 文 題 目： 歯冠形態形成における Hippo 伝達経路制御機構の解明

論文審査委員：（主査）教授 山 本 照 子

教授 福 本 敏

教授 若 森

実

論文内容要旨

Mammalian STE20-like kinase1/2 (Mst1/2) は哺乳類における Hippo 伝達経路に属する分子であり、下流にある転写補助因子である YAP をリン酸化することにより細胞増殖に関与し、器官の大きさを制御する。近年、Hippo 伝達経路は細胞増殖以外に多彩な生命現象に関与していることが報告されている。今回、我々は歯の発生過程における Hippo 伝達経路の役割について検討した。まず初めに、マウス歯胚と歯原性細胞について RT-PCR 法にて関連分子群の発現解析を行なった。その結果、いずれも関連分子群の mRNA の発現を認めた。また、歯胚と歯原性上皮細胞株 SF2 における Mst1/2 の発現について免疫組織学的に検討した結果、Mst1/2 は歯胚の分化程度や SF2 細胞の細胞密度に応じて発現部位が変化することが確認された。次に、SF2 細胞における抗 YAP 抗体による免疫組織学的検討と BrdU による増殖実験の結果より、SF2 細胞において YAP が細胞増殖に関与していることが示された。さらに、SF2 細胞における Mst1/2 過剰発現系と発現抑制系において細胞増殖・細胞分化について解析した結果、過剰発現系では細胞増殖抑制と細胞分化促進、発現抑制系では細胞増殖促進と細胞分化抑制が認められた。また過剰発現系では、アポトーシスを起している細胞の存在が確認された。これらの結果より、Mst1/2 は歯原性上皮細胞の細胞増殖と細胞分化に重要な役割を担うことが確認された。また、SF2 細胞における NT-4 刺激により、Mst1/2 の mRNA の発現促進と Mst1/2 のリン酸化が認められたが、この際起こるリン酸化は MEK 阻害剤により、Mst1/2 リン酸化は阻害されることが確認された。このことは、ERK1/2 が Mst1/2 のリン酸化に関与することを示唆している。そこで、ERK1/2 と Mst1/2 の結合解析を行なうため、SF2 細胞における Mst1、Mst2 過剰発現細胞株を NT-4 で刺激後、抽出したタンパクを免疫沈降し、抗 ERK1/2 抗体によりウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、SF2 細胞における NT-4 刺激により、ERK1 は Mst1 と直接結合していることが確認された。また、SF2 細胞へのリコンビナント蛋白発現ベクター導入による解析結果より、

ERK1は Mst1のN末端側に存在する触媒領域に結合することが確認された。以上の結果より、SF2細胞におけるNT-4による刺激はTrkB, ERK1を介し伝達し、ERK1がMst1のN末端側に存在する触媒領域に結合することによりMst1がリン酸化し、またMst1, Mst2, AmbnのmRNAの発現が促進されることが明らかとなった。

審査結果要旨

Mammalian STE20-like kinase1/2 (Mst1/2)は哺乳類におけるHippo伝達経路に属する分子であり、下流にある転写補助因子であるYAPをリン酸化することにより細胞増殖に関与し、器官の大きさを制御する。近年、Hippo伝達経路は細胞増殖以外に多彩な生命現象に関与していることが報告されている。しかし、歯の発生過程におけるHippo伝達経路の役割については明確にされていない。

本研究では、まず初めに、マウス歯胚と歯原性細胞においてRT-PCR法にてHippo伝達経路の関連分子群の発現解析を行なった結果、いずれも関連分子群のmRNAの発現を認めた。また、歯胚と歯原性上皮細胞株SF2におけるMst1/2の発現について免疫組織化学的に検討した結果、Mst1/2は歯胚の分化程度やSF2細胞の細胞密度に応じて発現部位が変化することが確認された。次に、SF2細胞における抗YAP抗体による免疫組織学的検討とBrdUによる増殖実験の結果より、SF2細胞においてYAPが細胞増殖に関与していることが示された。さらに、SF2細胞におけるMst1/2過剰発現系と発現抑制系において細胞増殖・細胞分化について解析した結果、過剰発現系では細胞増殖抑制と細胞分化促進、発現抑制系では細胞増殖促進と細胞分化抑制が認められた。また過剰発現系では、アポトーシスを起している細胞の存在が確認された。これらの結果より、Mst1/2は歯原性上皮細胞の細胞増殖と細胞分化に重要な役割を担うことが示唆された。また、SF2細胞におけるNT-4刺激により、Mst1/2のmRNAの発現促進とMst1/2のリン酸化が認められたが、この際起こるリン酸化はMEK阻害剤により、阻害されることが確認された。これにより、ERK1/2がMst1/2のリン酸化に関与することが示唆された。そこで、ERK1/2とMst1/2の結合解析を行なった結果、SF2細胞におけるNT-4刺激により、ERK1はMst1と直接結合していることが確認された。また、SF2細胞へのリコンビナントタンパク発現ベクター導入による解析結果より、ERK1はMst1のN末端側に存在する触媒領域に結合することが確認された。

本研究において、Hippo伝達経路は、歯胚と歯原性細胞では、細胞増殖を抑制的に制御し、形態形成にも関与することを初めて見いだしたことから、歯の再生技術における基盤的研究として意義が大きいと考えられる。

本研究論文は再生歯学のみならず、臨床歯学に有用な知見を提供することが期待され、博士(歯学)の学位論文として相応しいと判断する。