

論文審査結果報告書

論文提出者氏名 西藤 法子

学位論文題目：**Inhibitory effects of ameloblastin on epithelial cell proliferation.**

審査委員（主査）教授 自見 英治郎 印

（副査）教授 竹内 弘 印

（副査）准教授 白井 通彦 印

論文審査結果の要旨

【目的】 アメロブラスチンはエナメル質形成に関与するエナメルマトリックスタンパクの1つで、エナメル芽細胞のみならず、骨芽細胞、セメント芽細胞、マラッセの残存上皮といった歯周組織の細胞においてもその発現が報告されている。一方、歯周組織再生に頻用されているエムドゲイン®に含まれるアメロブラスチンが、上皮細胞増殖を抑制することが報告されている。しかし、アメロブラスチンが不安定なタンパクであることから、リコンビナントタンパクを用いてアメロブラスチンの細胞増殖や機能におよぼす効果を詳細に検討した報告は少ない。そこで、新規のタグを用いることで効率良くリコンビナントアメロブラスチンを精製する方法を確立し、*in vitro*においてアメロブラスチンが上皮細胞の細胞増殖におよぼす効果を検討した。

【方法】 HaloTag を付加したアメロブラスチン発現ベクターpFNA21A を調製し、COS-7 細胞に NEPA21 Super Electroporator を用いて遺伝子導入を行った。導入後の細胞抽出液から HaloTag® システムおよび HPLC を利用してリコンビナントアメロブラスチンを精製した。クマシー染色および抗アメロブラスチンポリクローナル抗体と、我々の研究グループで新たに作製したモノクローナル抗体を用いた Western blot 法で精製を確認した。精製タンパクをヒト扁平上皮癌細胞株である SCC-25 細胞へ添加し、細胞増殖を WST-1 assay、細胞周期を FACS で検討した。

【結果】 新たな遺伝子導入法を用いることで、実験に利用可能な十分量かつ純度の高いヒトのリコンビナントアメロブラスチンを精製することができた。精製したアメロブラスチンで SCC-25 細胞を刺激すると濃度依存的に細胞増殖を抑制し、FACS 解析により subG1 に含まれる細胞数の増加が認められた。

【結論】 新規タグシステムおよび HPLC を用いて精製することで、これまでリコンビナントタンパク質として得ることが難しかったアメロブラスチンを高純度で精製することができた。アメロブラスチンは濃度依存的に上皮細胞を G1 期に停止させることで、上皮細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

これまでエムドゲイン®に含まれるアメロブラスチンが、上皮細胞増殖を抑制すると報告されていたが、今回精製したアメロブラスチンを用いたことによって、アメロブラスチンが上皮細胞を G1 期に停止させることで細胞増殖を抑制することを明らかにした。本研究は、歯周組織に発現したアメロブラスチンが歯周炎のポケット形成における上皮細胞の深行増殖を抑制する可能性を示唆するものである。本研究内容について申請者の西藤法子氏に対し、主査と2名の副査で実験に用いた細胞の選択基準、市販のアメロブラスチンではなく、敢えて新規タグを用いてアメロブラスチンを精製する目的や利点、さらに抗体作製の意図について質問したが、今後の課題等を含めて概ね適切な回答を得た。総じて、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。