

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 417 号	学位申請者	古江 きらら
審査委員	主査	松口 徹也	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	佐藤 友昭	副査 南 弘之
	副査	徳田 雅行	副査 白方 良典
<p>主査および副査の5名は、平成29年2月15日、学位申請者古江きらら君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 刺激に用いた BMP9 の濃度はどのようにして決定したのか？ (回答) 予備実験にて濃度を検討し、100ng/ml とした。</p> <p>質問2) Fig.1 (Western blot 法による Akt のリン酸化の解析) の Δ の意味は何か？ (回答) p-Akt と total-Akt のバンドをそれぞれ定量化し、Δ は刺激前のリン酸化を1とした場合の、比を示している。</p> <p>質問3) Fig.4 で SDF-1 の産生が亢進しているが骨分化には関与しているのか？ (回答) SDF-1 の中和抗体を用いた実験では、アルカリフォスファターゼ活性への影響は認められなかった。今回の <i>in vitro</i> の結果からは、SDF-1 の骨分化への関与はない可能性が考えられる。</p> <p>質問4) インプラント周囲への応用はどのように行うのか。製品化する際の形状はどのようなものが適切と考えるか？ (回答) 骨再生を目的に、骨欠損へ局所的に塗布できるものが簡便だと考える。</p> <p>質問5) リコンビナントタンパク全長が必要なのか。一部でもいいのではないか？ (回答) 今回の研究からは分からない。まずは歯周組織における BMP9 の機能を解析することが必要である。</p> <p>質問6) Smad 経路や PI3K 経路といったシグナリング経路の解析が行われているが各経路は互いに影響し合うのか？ (回答) 今回は PI3K の阻害剤を用いたが、骨分化は完全には抑制されなかった。生体に必須の事象においては一つの経路に依存するのではなく、他の経路によって補償されるようなメカニズムが考えられ、シグナリング経路間のクロストークも起きていると考えられる。</p> <p>質問7) BMP2 と BMP9 の違いは何か？ (回答) 今回 BMP2 と BMP9 の機能の違いについては検討していない。しかしながら、過去の報告より、BMP の1型レセプターの違いやシグナリング経路の違いが報告されている。BMP9 は ALK1 および ALK2 レセプターに結合し、BMP2 は ALK3 と ALK6 に結合する。また、BMP2 は細胞外に存在する Noggin によりその作用を抑制されるが、BMP9 は Noggin の影響を受けない。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 8) 歯根膜線維芽細胞において BMP2 が SDF-1 発現を亢進した報告はあるのか？

(回答) ない。本研究は歯根膜線維芽細胞で BMP9 が SDF-1 の発現を亢進した初めての報告となる。

質問 9) SDF-1 産生の亢進が骨修復・再生にどのように寄与していると考えなのか？

(回答) SDF-1 は炎症部位で発現が亢進される。創傷治癒の初期では、炎症反応が起きることが知られており、局所で発現した SDF-1 が骨修復・再生に必要な、末梢血中の血球あるいは間葉系幹細胞を呼び込んでいると考える。

質問 10) 今後の展望として、歯周組織再生や歯科インプラント周囲の骨造成への応用について述べたが、これらには違いがあるのは理解しているのか？

(回答) 歯周組織は歯槽骨やセメント質といった硬組織と歯肉、歯根膜といった軟組織で構成されるが、インプラント周囲の骨造成は歯槽骨の再生のみを目的としている。BMP9 の強い骨誘導能を考慮すると、インプラント周囲の骨造成では単独使用による効果を期待できる。しかし歯周組織で臨床応用する際には、骨性癒着の有無の検証が必要である。もし骨性癒着が生じるのであれば、単独使用ではなく、他の因子との併用など、それを防止する方法の検討が必要となる。

質問 11) 今回の研究で PI3K を阻害する際、LY294002 を選択した理由は何か。部分的な阻害を行う阻害剤や PI3K のアゴニストを用いたか？

(回答) 過去の報告より、LY294002 を選択した。今回、他の阻害剤やアゴニストを用いた解析は行っていないが、今後検討したい。

質問 12) LY294002 の組織為害性については検討しているか？

(回答) 細胞死、細胞増殖抑制について検討した。細胞死は LY 添加の有無、濃度に関わらず 5%程度認められた。細胞増殖抑制は LY 添加により最大 10%程度生じていた。これは、PI3K が細胞の代謝に必要な経路であることから生じていると考える。本実験において、為害性の影響はないと考えている。

質問 13) SDF-1 により集積した間葉系幹細胞から骨芽細胞や破骨細胞ができるのか？

(回答) 骨芽細胞は間葉系細胞由来であり、破骨細胞は血球系の細胞由来である。しかしながら、破骨細胞分化の過程では、骨芽細胞の関与が必要である。

質問 14) 細胞について、16 歳男性と 26 歳女性から得たとあるが、これらを混ぜて使用したのか。違う場合、結果はどのドナーの歯根膜線維芽細胞を使用したものか？

(回答) 細胞は混ぜず、別々に解析を行った。論文中で示すのは 16 歳男性から得た細胞を用いたもので、26 歳女性から得た細胞を用いた際も同様の結果が得られた。

質問 15) 使用した歯根膜線維芽細胞がヘテロな細胞群であるならば、その中の幹細胞が骨分化し、すでに分化している細胞は脱分化したと考えるのか？

(回答) 今回使用した歯根膜線維芽細胞より、未分化な細胞のマーカーとして STRO-1 で選択を行い BMP9 による骨分化の影響を調べたところ、STRO-1 陽性の細胞は陰性の細胞と同じように反応したことから、幹細胞だけでなく、他の細胞も脱分化した可能性を否定できない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。