

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 521 号	学位申請者	榮樂 菜保子
審査委員	主査	後藤 哲哉	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	中村 典史	副査 佐藤 友昭
	副査	南 弘之	副査 白方 良典
<p>主査および副査の5名は、令和元年8月19日、学位申請者 榮樂 菜保子君に面接し、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) Figure1 で BMP4 を比較対象として選択した理由は何か？ (回答) 本研究では、BMP2 および BMP9 の比較を主な目的としており、Figure1 では様々な BMPs の遺伝子発現の違いを検証するために BMP4 を比較対象として加えた。</p> <p>質問2) MC3T3-E1 と primary osteoblast の分化の段階としてはどう考えているのか？ (回答) 二つの細胞の分化段階は両者ともに未熟な骨芽細胞の段階であると考えている。</p> <p>質問3) BMP9 は BMP2、-4 と比較し石灰化誘導が早く起きるとの報告だが、実際に骨がより多く形成されるのは石灰化の立ち上がりと維持どちらが大切か？ (回答) 骨形成能に関しては石灰化の立ち上がりおよび維持の両方が大切と思われる。In vitroでのリン酸カルシウム沈着は累積的に起こるものであるため、立ち上がりが早いという結果により BMP9 の骨形成のスピードも BMP2、-4 に比べ早いと推察される。骨形成が早いことより、臨床応用した場合にはインプラント治療における初期固定が早期に行われることが期待できる。</p> <p>質問4) Alizarin Red 染色において面積が大きければ骨形成能が高いと考えていいか？ (回答) Alizarin Red 染色の解析は面積と濃度の両方で比較するべきと考えられる。同じ面積でも染色の濃度が濃いほうが石灰化度は高いと考えられる。</p> <p>質問5) 臨床応用する場合はどのような形で考えているか？ (回答) エムドゲインゲルのようなゲルとしてもしくはコラーゲン等の担体とを組み合わせ、骨欠損部位へ局所投与することを想定している。</p> <p>質問6) その臨床応用のためには今後何を明らかにするべきか？ (回答) 臨床利用するにあたって担体との組み合わせを想定し、様々な担体との組み合わせにおける骨誘導能の分析や、副作用の防止のためにさらなるメカニズムの解明が必要と考える。</p> <p>質問7) 生体内で BMP9 は 2~12ng/ml の濃度で存在するとあるが、生体内と同じ 10ng/ml 濃度で刺激した場合も同じ結果が得られるか？ (回答) 前実験において様々な濃度で遺伝子発現やシグナル伝達分子のリン酸化を評価したところ、50ng/ml 以上の濃度で反応が起きたため、10ng/ml 程度の濃度では十分な効果は得られないと考えている。局所投与での濃度として考えれば、血清内の濃度より高い濃度でも安全性は保てるのではと考えている。</p> <p>質問8) BMP2 はすでに臨床応用されている中、生体内で十分な活性が起きず高濃度でなければ十分な成果が得られないことや副作用が問題となっているが、BMP9 での生体内での活性や副作用についての報告はあるのか？ (回答) 現段階では臨床応用されておらず、生体での活性反応についてはまだ不明である。</p> <p>質問9) 本研究で MC3T3-E1 細胞と primary osteoblast 二つの細胞を並行して使用しているが、なぜか？ (一般的か) (回答) MC3T3-E1 細胞はすでに骨芽細胞様細胞株として確立されたものであるが、生理的な性質を失っている可能性がある。そのため生理的な状態での反応を確認するためマウスの頭蓋骨より分離した細胞を並行して確認実験を行った。このように細胞株と primary のものを使用するのは一般的である。</p> <p>質問10) Figure1 について Wnt 経路をみているのに最初の実験で ALP、Runx2 に加え Hey1、Smad7 の遺伝子発現をみたのはなぜか？</p>			

最終試験の結果の要旨

(回答) Hey1 は Notch 経路で誘導される遺伝子であり、SMAD7 は SMAD 経路で抑制系 SMAD として働く因子だが、いずれも BMP によって誘導されることで知られる遺伝子である。骨芽細胞分化に伴い発現する ALP、Runx2 に加えそれぞれの BMPs が異なる遺伝子発現誘導パターンを持つことを確認するために行った。

質問 1 1) GSK3 β の抗体はリン酸化されたものも含むのか？

(回答) トータルの GSK3 β の抗体はリン酸化されたものも含む。

質問 1 2) Figure4 では何を証明しているのか？

(回答) Figure4 では BMP9 刺激と BMP2 刺激による Wnt の遺伝子発現誘導を見ているが、BMP9 と比較し BMP2 刺激により Wnt の発現が強く誘導され両者ともに 60 分以降をピークとして誘導が起きていることで BMP9 による早期の GSK3 β のリン酸化は Wnt 非依存性であるといえる。

質問 1 3) Figure4 の阻害薬は Wnt タンパクのみをタンパク分泌や合成阻害しているのか？

(回答) Wnt に限らずすべてのタンパクを阻害している。Hes1 のデータによりタンパク合成阻害剤および転写阻害が働いていることがわかる。

質問 1 4) BMP9 が他の BMP と比べ早く石灰化を誘導することは分かったが、最終的な骨形成はどうか？

(回答) *In vivo* において BMP9 の骨誘導能について BMP2 との比較実験も数多く行われており、当教室ではラットの頭蓋骨欠損モデルにおける実験で BMP2 と BMP9 の骨形成量はほぼ同等であったが、BMP2 の誘導する骨は脂肪髄に富むが、BMP9 群では既存骨に近い骨を誘導することがわかっている。(Nakamura T et al. 2017)

質問 1 5) BMP2 の浮腫やアンキローシスなどの副作用の報告があるが、BMP9 でも同じような副作用が起きる可能性があるのではないか？

(回答) BMP9 でも石灰化物形成や血管新生の促進が見られることから、アンキローシスや浮腫が起きる可能性は否定できない。しかしながら、BMP2 と BMP9 では noggin の影響をはじめとしてレセプターやシグナルについても異なることがわかっているため、必ずしも同じ副作用が生じるとは言えないと考えている。また、*in vivo* の実験で異所性骨誘導モデルおよび DBBM (脱タンパク牛骨ミネラル) を担体として用いた頭蓋骨欠損モデルの双方において、rhBMP9 は rhBMP2 の 1/4 程度の投量で同等かそれ以上の骨誘導能を示したため (Fujioka-Kobayashi M et al. 2018)、低濃度での使用により副作用の軽減も期待できると考える。

質問 1 6) 阻害剤はそれぞれ 1 種類しか使用していないのか？FASEBJ (投稿誌) から指摘はなかったか？

(回答) 今回、阻害剤は基本的に各シグナル分子について典型的で特異的なもの一つしか使用していない。FASEBJ からの指摘は特になかった。

質問 1 7) すでに臨床応用されているリグロス® (線維芽細胞増殖因子: FGF-2) 比べ BMP9 を使用するメリットは？

(回答) FGF-2 は間葉系幹細胞の増殖を促進することで作用を発揮するのに比べ、BMP9 は間葉系幹細胞の分化を促進する。そのため骨誘導能においては FGF-2 よりも高いと考えられる。しかしながら、BMP9 の生体内でのメリットについてはさらなる検討が必要である。

質問 1 8) BMP9 の他の歯周組織に存在する細胞への影響は分かっているのか？

(回答) 当教室での報告で歯根膜細胞においても、BMP9 が BMP2 に比べ強い骨分化誘導能を持つことがわかっている。(Fuchigami S et al. 2016)

質問 1 9) Endoglin の骨芽細胞での発現は起こるのか？

(回答) 今回の研究では MC3T3-E1 細胞では Endoglin の発現を確認している。正常骨芽細胞でも同様に発現していると考えられる。

質問 2 0) 臨床応用する場合、アンタゴニストが必要と思われるが、BMP9 は noggin の影響を受けないならば、特有のアンタゴニストは存在するか？

(回答) BMP9 については Activin A が知られており、今後検討したい。

質問 2 1) 同じ骨芽細胞でも体内で部位によって骨形成能が違うが、歯槽骨に存在する骨芽細胞で Endoglin がどれくらい発現しているか調べる実験は行ったか？

(回答) 今回の研究では歯槽骨における Endoglin の存在については確認を行っていないが、今後検討したい。

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。