

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	号	学位申請者	江部 由佳梨
審査委員	主査	松口 徹也	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	佐藤 友昭	副査	南 弘之
	副査	白方 良典	副査	犬童 寛子
<p>主査および副査の5名は、令和3年5月19日、学位申請者 江部 由佳梨 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) アリザリンレッドS染色の定量評価について、どの様にして行っているのか？ (回答) 染色濃度と面積を評価しており、スタンダードサンプルを用いて検量線を作成し、吸光度測定を行った。</p> <p>質問2) IL-1βは1ng/ml、BMP-9は10ng/mlで設定しているが、生体内濃度は実際どのくらいか？ (回答) IL-1βの歯肉溝滲出液中濃度としては22.8~882.2ng/mlという報告がある。BMP-9の血清中濃度は2~12ng/mlといわれている。</p> <p>質問3) BMP-9の濃度を上昇させた場合に、BMP-9の骨分化作用も亢進するのか、それとも抑制するのか？ (回答) hPDLFsにおいて、BMP-9濃度100ng/mlまでは濃度依存的に骨分化能が促進されたことが報告されているが(Fuchigami <i>et al.</i>2016)、それ以上の濃度での骨分化能は解析していないため不明である。</p> <p>質問4) Fig3のActAおよびFSTタンパク量解析について、ActAを刺激3日目、FSTを6日目で解析した理由は？ (回答) 培養3日目、6日目の上清でActAおよびFSTのタンパク量解析を行ったが、ActAは刺激3日で十分な反応性が見られたのに対し、FSTは3日目では変化が見られなかったが、6日目において有意な反応性が見られたため。</p> <p>質問5) 石灰化やアリザリンレッドS染色の解析で、IL-1β添加のタイミングは？ (回答) IL-1β刺激は、BMP-9などほかの添加因子の刺激時と同時に添加している。</p> <p>質問6) 今回の研究は、BMP-9とActAとの関係をhPDLFsにおいて解析したということにおいて新規性があるのか。 (回答) hPDLFsにおいてBMP-9の作用がIL-1βで抑制され、その機構にActAおよびFSTが関与していたということについて新規性があると考えている。</p> <p>質問7) FSTはActAと直接結合するのか。 (回答) FSTはActAと直接結合し、その結合力は強力で不可逆的である。</p> <p>質問8) 各インヒビター濃度はどの様にして決定したのか？ (回答) 各インヒビターを段階希釈して細胞に添加してMITアッセイによる細胞毒性実験を行い、細胞毒性が認められなかった最高濃度を至適条件として設定した。</p> <p>質問9) 実際の臨床応用では、炎症が生じている組織内にBMP-9を投与することを想定しているのか。 (回答) 基本的には歯周基本治療を行い、炎症をコントロールした上で、BMP-9をコラーゲンなどの担体やゲルと共に歯周組織欠損部に補填し、組織再生を促すことを想定している。</p> <p>質問10) 様々な炎症性サイトカインが存在する中で、本研究においてIL-1βを使用した理由は？ (回答) IL-1βは歯周炎の局所において、TNF-αやIL-6などのほかの炎症性サイトカインと比較した場合に最も高い濃度で検出されたことが報告されており、歯周炎の病態と深く関与しているため用いた。</p> <p>質問11) 今回使用した細胞は何本の歯から採取されたものなのか？また、細胞の反応性は細胞ごとに異なるのか？</p>				

最終試験の結果の要旨

(回答) 今回、3人のドナーから得られた3本から採取した細胞を使用した。刺激に対する細胞の反応性についてばらつきはあるが、得られたデータは全て同じ傾向を示している。

質問 12) FST は、局所投与としての応用は可能なのか？

(回答) 少なくとも歯科領域において局所投与の報告はないが、hPDL において ActA の発現は認められるため、BMP-9 と共に応用して作用させることは可能と考えられる。

質問 13) 使用している細胞は歯根膜幹細胞と同様のものとして捉えて良いのか？

(回答) 採取方法は同様であるが、今回採取した細胞においては、幹細胞特異的マーカーの発現および多分化能については確認していない。ただ、その細胞挙動は同様であると考えられる。

質問 14) N=3 と論文に表記されているが、同じ株で3回分析を行ったのか、それとも異なる3株なのか？異なる株で行なった場合、提示データはそれぞれ異なる株の結果を出しているのか？

(回答) 同じ株で3回実施している。提示データは3つの平均ではなく、3つの中での代表的なものである。

質問 15) BMP-9 および IL-1 β 刺激下にて外因性に FST を添加した際に FST 濃度依存的に ALP 活性の回復が見られたが、FST500ng/ml と 1000ng/ml 間で有意差はなかったのか？また、その後の実験において FST 濃度を 500ng/ml に設定しているが、その根拠は何か？

(回答) FST500ng/ml および 1000ng/ml 間での有意差はあるが、その平均値の差はごくわずかだったため、FST 濃度を 500ng/ml に設定した。

質問 16) 今回は、BMP-9 の骨芽細胞様分化の抑制に着目しているが、歯周組織再生を考える上では骨分化を促進するだけでは成り立たない。炎症状態下での BMP-9 の骨分化抑制作用についてどのように考えるか？

(回答) 例えば BMP-2 は歯周組織においてはアンキローシスを引き起こすことが知られているが、hPDLFs において IL-1 β は BMP-2 誘導性骨芽細胞様分化を促進するという報告から、BMP-9 は BMP-2 とは対照的に骨形成能が IL-1 β により抑制されることにより、正常な歯周組織の再生に適した条件で作用しうる可能性があると考えられる。

質問 17) BMP-6 も BMP-2 より高い骨形成能を有するが、BMP-6 の歯周組織応用については研究されていないのか？

(回答) イヌ上顎歯槽骨欠損部位に BMP-6/ACS を添加したところ、歯根吸収が認められたことが報告されている。(Chu H-C *et al.* 2013)。

質問 18) 培養上清中の FST 濃度は、Medium Change をせずに6日間培養した後の培養上清で測定を行なったのか？

(回答) 本実験では、刺激後3日目で一度 Medium Change を行い、刺激3日後から6日後までの培養上清を回収して解析している。

質問 19) IL-1 β が及ぼす BMP への影響について BMP-9 で行なっているが、ほかの BMP との比較実験は行ったか？

(回答) 今回は BMP-9 に関してのみ解析を行っており、ほかの BMP との比較は行っていない。しかし、先行研究では hPDLFs において、IL-1 β が BMP-2 誘導性骨芽細胞様分化を促進するという報告もあり (Kobayashi *et al.* 1999)、IL-1 β の BMP に対する調節機構は今回報告した機構以外の存在が考えられるため、BMP-9 以外の BMP との比較も検討する必要がある。

質問 20) hPDLFs において、ActA はどんなメカニズムで BMP-9 による骨芽細胞様分化を抑制していると考えられるか？

(回答) ActA は ACVR2A および ACVR2B に結合することで BMP-9 のレセプターへの結合を阻害し、BMP-9 の骨芽細胞様分化促進作用を阻害していると考えられる。

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。