

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 617 号	学位申請者	駒走 尚大
審査委員	主査	松口 徹也	学位 博士 (歯学)
	副査	中村 典史	副査 笹平 智則
	副査	田松 裕一	副査 嶺崎 良人

主査および副査の5名は、令和3年6月7日、学位申請者 駒走 尚大 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。

質問 1) *in vivo* の移植に骨補填材を使った理由は何か。

(回答) 骨増生のためのスペースを確保するためである。

質問 2) 新生骨の骨質は母床骨と同じなのか。

(回答) 本研究期間中での新生骨の骨質は母床骨と異なると考えられるが、より長期間経過することで母床骨と同等の骨にリモデリングすることが期待される。

質問 3) 骨形成は早くたくさんできたほうが良いのか。

(回答) 理想的には早期に母床骨と類似した性質の骨が多くできた方が良い。

質問 4) CHI3L1 を使って骨形成の量をコントロールできるのか。

(回答) CHI3L1 を多く分泌する MBMSC の CHI3L1 をノックダウンすることで骨形成量を増加させることができる可能性がある。ただし増生骨の量を任意にコントロールすることは困難と考えられる。

質問 5) CHI3L1 が骨形成を阻害するメカニズムをどのように解明するのか。

(回答) CHI3L1 をノックダウンあるいは過剰発現させた MBMSC を移植し、骨形成量への影響を検討する。この結果にて骨形成量に影響があれば、実際にどのようなシグナル伝達経路に影響しているのかを検証していくこととなる。

質問 6) 血管新生について CHI3L1 の tube formation への影響は検証したか。

(回答) 血管内皮細胞については、増殖能、遊走能のみ検証しており、tube formation は検証していない。

質問 7) 血管内皮細胞の遊走能は CHI3L1 が 0.1ng/ml でピークに達して、その後促進しなくなっているが、濃度によっては骨形成を促進する可能性はないのか。

(回答) 低濃度では血管内皮細胞の遊走を促進し、線維芽細胞の増殖、遊走は促進されないため、組織の線維化よりも骨形成が促進される可能性はあると思われる。

質問 8) 口腔癌患者に CHI3L1 を分泌する MBMSC を用いると再発につながる可能性はあるか。

(回答) 癌の再発の可能性は不明だが、本実験より骨増生治療においては CHI3L1 の分泌量の少ない MBMSC を利用することが判明したため影響は小さいと考える。

質問 9) MBMSC には個体差があるということだが、条件の良い MBMSC を培養するために、1人の患者から複数回採取する必要があると思うが、その場合は患者負担が大きいのではないか。

(回答) 最終的には骨形成能の高い MBMSC をストックし、必要な患者に移植する他家移植モデルを考えており、できる限り患者に負担を与えない方法を考えている。

質問 10) 7株の MBMSC の性能の差が生まれるのはなぜか。

(回答) MBMSC は様々な性質を持つ細胞が複数集まったヘテロな細胞集団であり、異なるフェノタイプを持つ細胞の採取時の割合によって、性能の差が表れたと考えられる。

質問 11) 骨再生が起こるところで、破骨細胞と線維芽細胞の勢力争いが起こっているのか。

(回答) 破骨細胞の存在について検討を行っておらず細胞の勢力争いについては明らかでないが、CHI3L1 の分泌量が多いと、移植部位の線維芽細胞の増殖、遊走が有意に促進され線維化が進んだと考えられる。

質問 12) 今回の結果では血管内皮細胞の遊走能が高い方が骨再生を抑制させるということが言えるのか。

## 最終試験の結果の要旨

(回答) 今回の実験では CHI3L1 の濃度が高いと骨形成が抑制されるのではなく、骨形成以上に線維化が促進され、相対的に骨形成量が少ないという結果になったと考えられる。

質問 13) 抗体アレイでいろいろなタンパク質を見ているが、セットになっているのか。今回含まれていないタンパク質の中にポジティブマーカーがある可能性はあるのか。

(回答) 抗体アレイはセットになって市販されているものを使用した。今回解析を行わなかったタンパク質中に骨形成能のポジティブマーカーが存在する可能性はある。

質問 14) そもそも歯槽骨の吸収を防ぐ方法はないのか。

(回答) 抜歯直後に、抜歯窩に様々な骨補填材を挿入することで吸収を防ぐ方法が報告されている。

質問 15) MBMSC は個体差が大きいですが、他の MSC でも個体差はあるのか。

(回答) 腸骨骨髓由来 MSC などの他の MSC でも個体差があるとの報告がある。

質問 16) パイオプシーニードルは骨髓腔まで挿入して採取したのか。

(回答) インプラント埋入のためにドリリングした窩に挿入して、廃棄予定の血液を採取した。

質問 17) 骨形成能に患者の年齢、性別、採取部位、全身疾患などの患者背景が影響しているのか。

(回答) 今回使用した MBMSC の骨形成能と患者の年齢・性別・採取部位に関連性はなかった。また、本研究では全身疾患の影響について検証していないが、糖尿病患者の MSC は機能が損なわれているという報告がある一方で、機能に影響はないとする報告もあり、詳細は不明である。

質問 18)  $\beta$ -TCP 単独でも骨ができると思われるが、MBMSC がある場合とない場合で差はあるのか。

(回答) 予備実験にて細胞の有無で骨形成量に影響を与えるかを検証したが、MBMSC を用いたほうが  $\beta$ -TCP 単独よりも骨は多くできる結果が得られている。

質問 19) ELISA の結果とリアルタイム PCR の結果が一致していないタンパク質があるがなぜか。

(回答) 培養時の培地の種類の違いによって、同じ MSC でも代謝が異なるという報告がある。今回の実験で ELISA には無血清で 24 時間培養した培養上清を用い、mRNA は有血清で培養した MBMSC から採取しているため、その培養環境の違いがこのような結果をもたらしたと考えられる。

質問 20) 骨が増生する方向に応用するにはどのようにすればよいか。

(回答) CHI3L1 は MBMSC の骨形成能判定のためのマーカーとしての利用を考えているが、siRNA 等で CHI3L1 をノックダウンさせた MBMSC を移植すると、骨形成が促進される可能性があると考えられる。

質問 21) MBMSC はフリーズしたものを解冻して、実験に使用したのか。

(回答) 細胞増殖能、ALP 活性試験、アリザリンレッド染色はフリーズせずに使用し、移植実験は移植のタイミングを揃えるため、フリーズした細胞を解冻して使用した。

質問 22) MBMSC の他に細胞が混ざっていないか。CD14 が 3% 陽性の細胞もあるが検討したか。

(回答) 今回使用した MBMSC は患者から採取した血液をディッシュに播種して、増殖してきたものを使用したため、他細胞が混在している可能性はある。CD14 陽性細胞が 3% あるが、他細胞混在の検討はしていない。

質問 23) CHI3L1 の濃度が高くなると、血管内皮細胞の遊走能が低下するのはなぜか。

(回答) トランズウェルを用いた遊走能試験では、検体の濃度が一定以上になると、遊走効果がみられなくなると言われている。今回も高濃度の CHI3L1 が遊走能を低下させたというわけではないと考えている。

質問 24) 血管新生の促進が骨形成を増強すると思われるが、今回の実験では線維化が進むのはなぜか。

(回答) 血管新生が骨形成を抑制するのではなく、CHI3L1 の濃度が高いと、骨形成よりも線維芽細胞の増殖・遊走が優位になったため、組織の線維化が促進されたのではないかと考えている。

質問 25) CHI3L1 を抑制すると血管新生されるかの実験を今後行うか。

(回答) CHI3L1 をノックダウンさせた MBMSC の移植や、CHI3L1 中和抗体の同時移植を行い、血管新生への影響を評価する予定である。

質問 26) MBMSC は他の MSC と比べるとどのような性能なのか。

(回答) MBMSC は腸骨と比較し、骨分化能は同程度以上であるが、軟骨分化能と脂肪分化能は劣るとの報告がある。また、多くの遺伝子の発現にも差異があることが報告されている。

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。