

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 709 号	学位申請者	池田 菜緒
審査委員	主査	松口 徹也	学位
	副査	佐藤 友昭	副査
	副査	田松 裕一	副査
			博士 (歯学)
			中田 匡宣
			石畑 清秀

主査および副査の5名は、令和5年7月12日、学位申請者 池田 菜緒 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) 本研究で使用した顎骨 MSC (MBMSCs) は上下顎骨の採取部位ごとで区別しているか。まとめたのであれば同一グループとして検証することは妥当か。

(回答) 本研究では採取部位の違いを考慮していない。我々の先行研究により、採取部位と分化能の間に相関が認められないと推測しているが、厳密に比較するのであれば、サンプルサイズを増やして検討する必要がある。

質問2) 腸骨 MSC (IBMSCs) の性質に人種による差はないのか。

(回答) 本研究で使用した IBMSCs の幹細胞性は、細胞表面抗原と多能性マーカー遺伝子の発現量や分化能の結果に鑑みて、人種の差による性質への影響はないと推測する。

質問3) 統計処理で n 数が3や5とあるが、同じ細胞を数回実験に用いたのか、異なる細胞を用いたのか。

(回答) 本研究では、異なる細胞を用いて行っている。

質問4) サンプルサイズ5株は妥当であるか。

(回答) 本研究では、IBMSCs と MBMSCs の分化特性の違いを評価した先行研究を参考にサンプルサイズを決定したので妥当であると考えます。

質問5) 脂肪分化増地の成分はどのような機序で脂肪分化を促進しているか？

(回答) デキサメタゾンはグルココルチコイド受容体経路を刺激し、脂肪細胞制御のための受容体を活性化する。インドメタシンはシクロオキシゲナーゼ阻害作用により骨芽細胞への分化を阻害し、脂肪分化を促進する。インスリンの働きの一つとして、グルコースからの脂肪合成を促進する作用がある。

質問6) Fig. 1での IBMSCs の脂肪分化の個体差は ROS 産生との間に相関はあるか。

(回答) 本研究で用いた細胞では、脂肪分化能と ROS 産生量の間に関連は認められなかった。

質問7) MBMSCs の脂肪分化能が低いという点が骨増生において利点となるか。

(回答) MBMSCs が脂肪に分化しにくいことが顎骨の骨増生をする上で利点になり得ると考えている。脂肪分化初期において、MBMSCs の SOD 発現が IBMSCs と比較して高いことから、MBMSCs の抗酸化活性が高いと推測している。過去の報告では、抗酸化酵素レベルの高い幹細胞集団は *in vitro* で幹細胞性と遊走活性を増加させることから MBMSCs の抗酸化能の高さが臨床応用におけるメリットになると考える。

質問8) ミトコンドリア生合成関連遺伝子の発現と ROS 産生の因果関係はどうか。

(回答) ROS は SOD や Gpx を介して、PGC-1 α を含むミトコンドリア生合成に必要な多くの転写コアクチベーターを調節するとされているが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

質問9) ミトコンドリアの活性は MBMSCs と IBMSCs で差がないという結果だったが、この結果はミトコンドリア由来の ROS 産生量と直接つながらないのか。

(回答) ミトコンドリア由来の ROS の生成は主に酸化リン酸化によるものであるため、脂肪分化に伴う酸化リン酸化の増加によりミトコンドリア由来の ROS 生成量も増加すると推測するが、本研究では検証を行っていない。

質問10) MBMSCs では脂肪分化誘導時の ROS 産生量が下がってから上がっているのはなぜか。

(回答) IBMSCs、MBMSCs とともに脂肪分化誘導の初期に抗酸化酵素の SOD 1、2 の発現を認めたが、MBMSCs では IBMSCs と比較して有意に高いことが分かっており、抗酸化酵素のはたらきによるものではないかと考える。

質問11) ROS 産生についてミトコンドリア等の、発生源別に研究を行ったか。

(回答) 本研究では発生源別の評価を行っていない。NOX4 はミトコンドリア、小胞体、細胞膜などに局在するとされており、Menadiione はミトコンドリア由来の ROS を誘導するとされている。しかし、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

最終試験の結果の要旨

質問 1 2) 脂肪分化時の ROS 産生は酸化的リン酸化が関与しているか。

(回答) MSC では、脂肪分化時に酸化的リン酸化が増加し、その副産物として ROS が産生されるため、関与していると考えられる。酸化的リン酸化の増加は MSC の分化に必要なエネルギーを生じさせるだけでなく、ROS 産生を通じて脂肪分化を促進しているとされている。

質問 1 3) ROS の中でも脂肪分化にはスーパーオキシドが重要であると考えているのか。

(回答) ミトコンドリア複合体由来 ROS はスーパーオキシドを含むことから、スーパーオキシドは脂肪分化に重要であると考え、NOX4 により産生される H₂O₂ も脂肪分化にとって重要であると考え。

質問 1 4) NOX4 発現が IBMSCs の day1 で下がっているが、何が原因であると考察するか。

(回答) 我々の研究において、脂肪分化誘導の初期にスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の発現が IBMSCs と MBMSCs の両細胞で上昇したことから、抗酸化酵素のはたらきが原因の一つであると考え。

質問 1 5) IBMSCs の脂肪分化誘導時の ROS 産生は経時的に増加するが NOX4 発現は day1 で下がっており、発現パターンが解離していることを考えると NOX4 以外の因子についても検討が必要であると思われるが他の因子については調べたか。

(回答) 本研究では、NOX4 以外のアイソフォームについての評価を行っていない。

質問 1 6) ROS 産生は、IBMSC と MBMSC の骨分化にどのような影響を与えると考えるか。

(回答) 過去の報告で、MSCs が骨分化する際には ROS 産生は低下するとされているが、IBMSCs と MBMSCs は同等の骨分化能を持つとされるため、ROS 産生と骨分化能の間には関連がない可能性が高いと考えている。

質問 1 7) HYDROP を用いた過酸化水素の測定は行ったか。

(回答) 本研究では行っていない。

質問 1 8) 実験 4 の“過剰発現”は生理的な状態での顎骨の細胞と比較したものか、または腸骨の細胞と比較しての過剰を意味するものなのか。

(回答) MBMSCs に空ベクターをトランスフェクトした場合と比較して、サイトメガロウイルスプロモーターにより NOX4 遺伝子を発現させるベクターをトランスフェクトした場合を過剰発現とした。IBMSCs との比較は行っていない。

質問 1 9) 実験 4 と 5 での n=3 のサンプルの選択方法はどのようにしたか。

(回答) MBMSCs 5 株のうち、どの株を選択していても結果に影響しないと考えるが、使用した 3 株は同等の脂肪滴形成と増殖能を有していた。

質問 2 0) 実験 4 と 5 では脂肪滴形成にまで至らなかったが、脂肪細胞の成熟には脂肪分化初期転写因子および後期転写因子の発現の両方が必要であるか。

(回答) 脂肪分化は多段階プロセスによって制御されている。脂肪分化初期転写因子のアップレギュレーションが後期転写因子の転写を促進することにより脂肪分化は誘導されるため、脂肪分化初期と後期のそれぞれで特異的な転写因子の発現が重要であると考え。

質問 2 1) ROS を増加させる方法としてなぜ Menadione を用いたか。

(回答) 過去に Menadione が ROS 産生を上昇させることが報告されていたためである。

質問 2 2) 1000nM の Menadione を添加した時の細胞内 ROS 産生量は、非添加時と比較して、統計的に有意に上昇したが、1.5 倍程度の上昇は影響すると考えるのか。

(回答) ROS 量の有意な上昇はあくまでコントロールと比較した時の統計的な有意差であり、本研究では IBMSCs の脂肪分化誘導時の ROS 産生との比較を行っていないが、Menadione の添加は脂肪分化初期転写因子の発現を上昇させたため、1000nM の Menadione 添加による ROS 産生量の増加は MBMSCs の脂肪分化に影響すると考える。

質問 2 3) 脂肪分化を抑制する因子は存在するか。

(回答) 本研究では、Menadione 添加サンプルにおいて、PPAR γ の発現を抑制する GATA3 の遺伝子発現が脂肪分化誘導時に増加したことから、GATA3 により脂肪分化後期への移行が抑制されると考えられる。

質問 2 4) 結論で脂肪分化の初期に ROS が“必要”であるとしているが分化に必要なものなのか、量が多いと分化が促進されるものなのか。

(回答) 過去の報告では、脂肪分化を開始するために必要な PPAR γ の転写を誘導するために ROS が必要であるとされているが、大量の ROS は細胞損傷を引き起こす可能性があるため、過剰な ROS 産生を誘導させないことが重要であると考え。

質問 2 5) 顎外科での骨造成には腸骨を使用するが、操作等で応用できることはないか。

(回答) 過去に、抗酸化剤の使用による ROS 産生の抑制が MSC の脂肪分化を抑制することが報告されてきたが、脂肪分化能が低いことが間葉系幹細胞を用いる骨増生を行ううえでメリットであることを今後さらに検証する必要がある。

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。