

論文審査の要旨

報告番号	総研第 713 号	学位申請者	瀬戸口 史晃
審査委員	主査	松口 徹也	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	菊地 聖史	副査 犬童 寛子
	副査	南 弘之	副査 中村 利明

Low-Intensity Pulsed Ultrasound Promotes BMP9 Induced Osteoblastic Differentiation in Rat Dedifferentiated Fat Cell

(低出力超音波パルスは BMP9 により誘導されたラット脱分化脂肪細胞の骨芽細胞様分化を促進する)

歯周組織再生療法として様々な材料や生理活性物質が臨床応用されているが、適応症の制限や再生組織量の限界などから新たな再生療法が求められている。脱分化脂肪細胞 (DFATs) は、成熟脂肪細胞から天井培養法によって得られる多分化能をもつ細胞である。DFATs は、他の幹細胞よりも低侵襲で得られ、同じく脂肪組織から得られる脂肪由来幹細胞よりも純度の高い細胞であるため、組織工学における細胞源として有望である。生理活性物質も組織工学において重要であり、BMPs (bone morphogenetic proteins) は生体の発生や細胞の分化に重要な役割を果たしている。BMP9 は、BMPs の中で最も高い骨形成能をもち、BMP の作用を抑制する noggin や BMP3 の影響を受けにくいと言われている。骨形成に影響を与える他の因子としてメカニカルストレスが考えられる。そこで、本研究では、音圧による物理的刺激である低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultrasound; LIPUS) に着目した。LIPUS は、血管新生促進作用、細胞増殖、炎症抑制、細胞外マトリックスの産生等により難治性骨折の治癒を促進する非侵襲的な治療法であり、FDA (アメリカ食品医薬品局) に認可されている。BMP9 や LIPUS による骨形成の促進は *in vitro* 及び *in vivo* の両方で報告されているが、DFATs の骨芽細胞様分化に対する BMP9 と LIPUS の併用効果については不明である。そこで、学位申請者は、従来の歯周組織再生療法が適応できない大きな欠損に対する新たなアプローチ法の検討のため、DFATs に対する LIPUS 照射の影響及び BMP9 と LIPUS 照射併用による骨芽細胞様分化への影響を *in vitro* にて解析した。

ラット成熟脂肪細胞から DFATs を分離した後、DFATs を異なる濃度の BMP9 または LIPUS で刺激した。骨芽細胞様分化への影響を ALP (alkaline phosphatase) 活性、石灰化結節誘導能、骨分化関連遺伝子、BMP9 のレセプター遺伝子発現を Real-time PCR にて解析した。シクロオキシゲナーゼ阻害剤としてインドメタシンを使用し、PGE₂ の産生量を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) にて解析した。その結果、以下の知見が得られた。

1. LIPUS 単独では DFATs の骨芽細胞様分化誘導を認めなかった。
2. 高濃度 (100 ng/ml) の BMP9 で骨芽細胞様分化誘導した DFATs は LIPUS 照射により骨芽細胞様分化が促進された。
3. BMP9 と LIPUS は BMP9 のレセプター遺伝子発現 (ALK-1, ALK-2, BMP receptor II, Endoglin) を増強した。
4. インドメタシンは BMP9 と LIPUS 併用による ALP 活性、骨分化関連遺伝子発現の増強を抑制した。
5. BMP9 及び LIPUS の併用により PGE₂ の産生は増加した。インドメタシンを加えることにより PGE₂ の産生は著しく低下した。

本研究の結果から BMP9 と LIPUS の併用により骨芽細胞様分化が促進されることが明らかになった。また、そのメカニズムとして BMP9 のレセプターの発現や PGE₂ の産生が関与している可能性が示唆された。本研究により、DFATs に対する BMP9 と LIPUS の併用は骨再生治療において効果的なアプローチ法となることが示唆され、今後の臨床応用に発展する可能性のある非常に興味深い知見であった。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。