

最終試験の結果の要旨

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・歯学・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
<p>主査および副査の5名は、令和5年7月18日、学位申請者 瀬戸口史晃 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) LIPUS 照射は毎日行っているとのことだが、サンプル回収は LIPUS 照射後のどのタイミングで行ったか。 (回答) サンプル回収は LIPUS 照射 12 時間後に行った。</p> <p>質問2) ALP 活性のグラフで LIPUS 非照射群と照射群で BMP9 (0.1 ng/ml、1 ng/ml) で有意差はなかったのか。 (回答) 有意差は認めなかった。</p> <p>質問3) アリザリンレッド染色では BMP9 (10 ng/ml) で有意差がないのになぜ考察で濃度を減らせるかもしれないとしたのか。 (回答) ALP 活性の結果では 10 ng/ml で有意差を認め、石灰化結節の結果では 10 ng/ml にて LIPUS 照射により増加傾向を認めたため、<i>in vivo</i> において LIPUS と併用すれば低濃度の BMP9 でも良好な骨形成をもたらすと推察したが、今後 <i>in vivo</i> の実験による確認が必要と考えている。</p> <p>質問4) BMP9 のレセプター遺伝子発現のタイムコースはなぜ2日なのか。 (回答) 実験を計画した際、過去の報告 (Suzuki Y, <i>et al.</i> 2010) を参考に、2日後をタイムポイントと定めて BMP9 レセプター遺伝子の発現を解析した。</p> <p>質問5) LIPUS の分化促進作用よりも BMP9 の分化促進作用に PGE₂ が関与しているのではないのか。 (回答) COX2 を遺伝子抑制/サイレンシングすると BMP9 の骨分化能が阻害されたとの報告 (Yan Deng, <i>et al.</i> 2021) があり、BMP9 の分化促進作用にも PGE₂ が関与している可能性が考えられる。</p> <p>質問6) DFATs はどのくらい継代できるのか。 (回答) 今回、3~7 代目までの細胞を実験に使用し、その間、DFATs の増殖能や分化能に変化はなかったが、さらに継代を続けると細胞の性質が変化する可能性はあると考えられる。</p> <p>質問7) DFATs は成熟脂肪細胞由来であるが、誘導しなければ脂肪細胞にもどるのか。 (回答) 一度成熟脂肪組織より分離し、脱分化した DFATs は再び誘導しない限り、脂肪細胞に戻ることはない。</p> <p>質問8) 天井培養法にて遠心を行ったあとに底の方にも細胞成分は見られるのか。 (回答) 遠心分離後のチューブ底には間質・血液系成分を認め、脂肪由来幹細胞を含んでいる。</p> <p>質問9) LIPUS 照射はどのような環境下にておこなっているか。 (回答) CO₂ インキュベーター内で照射をおこなったため、37℃、5%CO₂ 下で行った。</p> <p>質問10) LIPUS に除痛効果はあるのか (回答) 変形性膝関節症に LIPUS を用いた実験で有意な除痛効果が認められた。(Haoqian Chen, <i>et al.</i> 2022)</p> <p>質問11) Figure3 の <i>osx</i> の結果で LIPUS 非照射群では ODM グループと BMP9 100 ng/ml 間で有意差がないがこれは他の細胞では差が出ている報告があるのか、それとも細胞の分化のスピードの違いが関与しているのか。 (回答) ヒト歯根膜細胞 (Fuchigami S, <i>et al.</i> 2016) やマウス前骨芽細胞 (E Bergeron, <i>et al.</i> 2009) では BMP9 単独でも有意差を認めた報告がある。DFATs の分化のスピードについては他の間葉系幹細胞と大差はないと考えるが、<i>osx</i> は Runx2 よりあとに発現のピークを迎えるため、これより後で解析した場合、差が見られる可能性が考えられる。</p> <p>質問12) 骨芽細胞分化の後期で見られる OCN は見ていないのか。 (回答) 後期の骨分化マーカーである BSP や OCN は 6 日で解析を行った際、発現レベルが低く、有意な差は認めなかった。6 日よりあとに発現のピークを迎えると考えられる。</p>			

最終試験の結果の要旨

(713)

質問 13) 骨芽細胞様細胞の「様」という表現が使われているが、骨芽細胞ではないのか。

(回答) *in vitro* の実験では生体環境を完全には模倣できないため、培養細胞から骨を作ることはできない。それゆえ、骨芽細胞と断定できず、骨芽細胞様細胞と表現している。

質問 14) LIPUS は難治性骨折で使われているとのことだが、難治性骨折とはどういう状態か。

(回答) 3 ヶ月以上手術や固定を行っても骨の癒合が得られない骨折の場合 LIPUS は保険適応となるため、3 ヶ月以上骨癒合が得られなかった場合と認識している。

質問 15) 歯槽骨の再生と骨折時の骨の形成様式は同じと考えられているのか。

(回答) 歯槽骨の再生は軟骨を介さず、膜性骨化により形成され、骨折後の骨形成は内軟骨内骨化が主体となるため、異なると考えられるが、いずれも初期に炎症が起こり、修復、リモデリングの過程を経て進んでいき、共通する部分も認められる。

質問 16) 石灰化結節誘導能においてアリザリンレッドは何を染めるのか、それは骨の成分となるものなのか。

(回答) アリザリンレッドは骨の主成分であるリン酸カルシウムのカルシウムを特異的に染色する染色法である。

質問 17) 実際に臨床で用いる場合 DFATs はどこからとるのか、LIPUS はどこからあてるのか。

(回答) 頬脂肪体や皮下脂肪から DFATs の採取が可能である。また、我々は既にイヌを用いた実験で、口腔外から LIPUS 照射を行い、有意に骨形成の増強を認めており (Shirakata, et al. 2019)、現在のところ LIPUS は頬部の皮膚/口腔外からの照射を考えている。

質問 18) LIPUS の骨折に対する治療効果は国内外でどのような評価を受けているのか。

(回答) LIPUS はアメリカで FDA に承認されており、日本でも保険適用となっている。難治性骨折の治療に有効であると報告されており、LIPUS の効果は国内外で認められていると考える。

質問 19) LIPUS の機序で物理的刺激と述べていたが、それは力学的または熱的な作用のどちらか。

(回答) LIPUS 照射による患部周囲の温度上昇は 1℃以下との報告があり、LIPUS の作用は力学的な刺激による効果が大きいと考えられている。

質問 20) LIPUS は低出力だが、高出力だと効果はどうなるか。また、パルス波でなく連続波の場合はどうか。

(回答) LIPUS を高出力 (1.0 W/cm²) で照射した場合、骨修復が阻害されたとの報告がある。連続波の場合、温熱効果が高くなり、筋肉や関節の疼痛緩和に用いられている。

質問 21) トランスデューサーの振動を細胞に確実に伝えるために何か工夫をしたことはあるか。

(回答) ゲルに気泡が混入すると音響インピーダンスの差によって振動が細胞に届かなくなるため、気泡が入らないように注意した。

質問 22) DFATs における脱分化のメカニズムは

(回答) 現在のところ DFATs の脱分化のメカニズムはわかっていない。成熟脂肪細胞から線維芽細胞様の細胞が分離できるのは肥満の研究を行っていた過程で見出された。

質問 23) 天井培養でエアレーションは難しいと思うが細胞の viability はどのくらいだったか。

(回答) 天井培養時フラスコは完全には密閉せず、空気の通り道を作って実験を行った。7日という限定された期間だったがその期間多数の細胞死などの現象は認められなかった。

質問 24) BMP9 や BMP2 で PGE₂ の産生が増加する報告は過去にもあるのか

(回答) マウス骨芽細胞にて BMP2 (100 ng/ml) 添加により PGE₂ の産生が増加した報告がある (Daichi C, et al. 2009)。BMP9 については PGE₂ 発現の報告はないが、C3H10T1/2 細胞において BMP9 にて COX2 の mRNA 発現レベルが上昇したとの報告がある (Y Deng, et al. 2021)。

質問 25) COX2 の発現はみているのか

(回答) COX2 自体の発現は見えていないが、COX2 の選択的阻害剤である NS398 を使用した実験を行い、インドメタシンと同様の結果が得られた。

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。