

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)		氏名	Mohammad Zeshaan Rahman
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当			
論 文 題 目				
<p>Combined effects of melatonin and FGF-2 on mouse osteoblast (MC3T3-E1) behavior within IP-CHA constructs – <i>in vitro</i> analysis</p> <p>(多孔性ハイドロキシアパタイトでのマウス骨芽細胞におけるメラトニンと FGF-2 の併用効果に関する基礎的研究)</p>				
論文審査担当者				
主 査	教授	加藤 功一	印	
審査委員	教授	津賀 一弘		
審査委員	教授	杉山 勝		
〔論文審査の要旨〕				
<p>【緒言】頭蓋顎顔面領域手術において生体材料を用いた骨移植は再建や審美の面で重要な役割を担う。このため、連通多孔体ハイドロキシアパタイト (Interconnected porous hydroxyapatite; IP-CHA) を含む様々な生体材料の開発が進んでいる。IP-CHA は生体親和性や骨伝導に優れているだけでなく理想的な形態や大きさに作製することが可能な材料である。IP-CHA の特徴的な連通気孔は細胞の活性や機能を保持し骨伝導能を高める。一方、Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) は 23 ポリペプチド成長因子ファミリーの 1 つで、骨芽細胞の分化より骨芽細胞の増殖を促進することが報告されている。また、睡眠サイクルを制御する松果体ホルモン Melatonin (MEL) は RANKL 誘導の骨吸収を抑制し、骨形成を促進することが報告されている。MEL と FGF-2 は骨形成に重要な役割をもつことが考えられるが、ハイドロキシアパタイト骨補填材におけるこれらペプチドの併用の効果については報告されていない。今回の研究は IP-CHA 内に培養されたマウス骨芽細胞における MEL と FGF-2 の併用効果を検討した。</p> <p>【方法】実験 1 : 細胞播種のために最も有効な方法の決定 : IP-CHA 内への最も有効な細胞播種を検討するために、4 つの異なる方法 (静置、攪拌、遠心分離、真空) で比較した。マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞 (MC3T3) がコンフルエントになるまで培養液で培養した。濃縮された細胞懸濁液を IP-CHA ブロック (径 4 mm, 高さ 7 mm, 気孔率 75%) 上に滴下した。静置法では、IP-CHA ブロックを 1×10^5 個の細胞を含む培養液に浸漬した。攪拌法では IP-CHA ブロックを 1×10^5 個の細胞の培養液が入ったプラスチック管に入れ、$16000 \times g$ で 3 分間遠心した。攪拌法はオービタルシェーカー内で 37°C, 160 g で 2 時間攪拌した。真空法は 1×10^5 個の細胞を含む IP-CHA ブロックを真空条件 100 mmHg、100 秒</p>				

間で封入した。すべての IP-CHA 内で MC3T3 を 3 日間培養し、その後 MTT 解析によって生細胞数を評価した。

実験 2: ペプチドの至適濃度の決定: 各種濃度の FGF-2 (2, 20, 100 $\mu\text{g/ml}$) と MEL (50, 200, 1000 nM) 存在下, IP-CHA 内で MC3T3 を 3 日間培養し, RNA を抽出し, FGF-2 存在下での Alkaline Phosphatase (ALP) と 1 型コラーゲン(COL-1)の遺伝子発現と, MEL 存在下での Osteocalcin (OCN)と Osteopontin (OPN)の遺伝子発現を Real-time RT-PCR 法で評価した。

実験 3: 骨芽細胞活性における FGF-2 と MEL 併用効果の検討: IP-CHA 内 MC3T3 を FGF-2 および MEL 存在下で培養し, 細胞増殖を MTT 解析, OPN と OCN の遺伝子発現や ALP 活性について解析を行った。

実験 4: 石灰化における FGF-2 と MEL 併用効果の検討: IP-CHA 内での MC3T3 の石灰化を検討するためにアリザリンレッドの沈着量を定量化した。IP-CHA 内で MC3T3 は 2 週間, FGF-2 と MEL 処理を行い, IP-CHA 内部の細胞まで浸透させるように真空で行った後, アリザリンレッド液で染色し, 450 nm における吸光度を分光光度計にて測定した。

【結果】 実験 1: IP-CHA 内での細胞播種法として, 真空法が最も高い細胞生存率と ALP 活性を示した。

実験 2: FGF-2 濃度は 2 $\mu\text{g/ml}$ では COL-1 および ALP の mRNA の発現はかなり低下し, 100 $\mu\text{g/ml}$ では有意な高発現を示さなかったことから, 20 $\mu\text{g/ml}$ を最適な濃度とした。MEL 濃度は 20 nM で OCN と OPN の mRNA の発現の低下を認め, 一方 1000 nM では有意な mRNA の高発現を認めなかったことから 200 nM を最適な濃度とした。

実験 3: FGF-2 添加群はコントロールや MEL 添加群と比較し, より高い細胞増殖を示した。興味深いことに MEL は FGF-2 の増殖能には影響を与えなかった。ALP の酵素活性は, FGF-2 とコントロール群と比較し, MEL 添加群においてより高く誘導された。さらに MEL と FGF-2 の同時添加では単独添加と比較してより高い ALP の酵素活性が得られた。OCN, OPN mRNA の発現は FGF-2 群とコントロール群と比較し, MEL 添加群でより高い発現を認めたが, MEL と FGF-2 同時添加で単独添加と比較してより高い発現を示した。

実験 4; 単層培養における MEL と FGF-2 の単独添加群は, 両方で石灰化の誘導が認められた。しかしながら MEL と FGF-2 同時添加群ではより強い染色像を示した。さらに IP-CHA 内の MC3T3 は FGF-2, MEL 同時添加によって著しい石灰化を示した。

【考察及び結語】

本研究の結果, IP-CHA 内において FGF-2 が骨芽細胞の増殖を誘導し, MEL が分化に影響を与えることが示された。また, MEL と FGF-2 の同時添加は IP-CHA 内における骨芽細胞の石灰化を促進した。以上の結果から, 本論文は MEL と FGF-2 の同時処理が IP-CHA 内での骨芽細胞の石灰化を促進することを示唆した。

よって審査委員会委員全員は, 本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。