

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	八島 由佳
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
持続的圧縮刺激がマウス骨細胞における RANKL、OPG および VEGF 発現に及ぼす影響			
論文審査担当者			
主査	教授 加藤 功一	印	
審査委員	教授 二川 浩樹		
審査委員	教授 宿南 知佐		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯に矯正力を負荷すると、歯根膜、および歯槽骨に物理的刺激が加わり、圧迫側では破骨細胞による骨吸収が、牽引側では骨芽細胞による骨添加が生じる。破骨細胞の分化には receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand / osteoprotegerin (RANKL / OPG) 系が重要な役割を果たしており、また vascular endothelial growth factor (VEGF) は骨代謝時における血管新生と骨吸収の両面に関与していることが明らかとなっている。骨芽細胞に対する機械的刺激の影響については多くの報告があり、本川らは機械的伸展刺激が機械受容体である stretch-activated channel (S-A channel) を介して骨芽細胞の VEGF および macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 発現を促進することを明らかとした。一方、骨細胞はメカニカルストレスを感知し、破骨細胞や骨芽細胞を介した骨量調整が行われていると考えられているが、骨細胞への圧縮刺激 (compressive force : CF) がサイトカイン発現に与える影響は未だ報告がない。そこで本研究ではマウス骨細胞 (MLO-Y4 細胞) における RANKL、OPG および VEGF の発現をマウス骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) と比較するとともに、それぞれの細胞に対する CF の負荷が各因子の発現に及ぼす影響について検討した。また、S-A channel は機械刺激によって細胞膜が伸展されることで活性化されるイオンチャンネルであり、S-A channel の阻害が CF 負荷によって RANKL、OPG および VEGF の発現に与える影響を観察した。まず、MLO-Y4 細胞および MC3T3-E1 細胞における各因子の発現を定量リアルタイム PCR 法と ELISA 法を用いて検討した。定量リアルタイム PCR 解析は両細胞ともに 6 well plate に <math>5.0 \times 10^4</math> / well の密度で播種し、4 日後 80%コンフルエントになった時点でトータル RNA を回収し解析を行った。ELISA 分析は 80%コンフルエントになった両細胞を無血清培地にて 24 時間培養し、その培養上清を用いて行った。次に、両細胞に <math>0.5 \text{ g/cm}^2</math> または <math>1.0 \text{ g/cm}^2</math> の CF を 1、3、6、12 時間負荷した。CF 負荷は Tripuwabhrut らの方法に基づき、細胞密度が 80%コンフルエントに達した 6 well plate 培地に直径 30 mm のガラスプレートを置き、その上に分銅を乗せることで行った。また、骨細胞の CF 感受に際するシグナル伝達経路の解明のため S-A channel の阻害剤である <math>\text{Gd}^{3+}</math> を用いて <math>1.0 \text{ g/cm}^2</math> CF 負荷時での RANKL、OPG および VEGF 発現に与える影響を検討した。<math>\text{Gd}^{3+}</math> の濃度は過去の報告をもとに <math>10 \mu\text{M}</math> を用いた。MLO-Y4 細胞が 80%コンフルエントに達した後、<math>10 \mu\text{M}</math> <math>\text{Gd}^{3+}</math> と共に 30 分間培養し、その後 <math>1.0 \text{ g/cm}^2</math> CF を負荷した。3 時間 CF を負荷したものはトータル RNA を回収した後、定量リアルタイム PCR 解析を行い、12 時間 CF を負荷したものは培養上清を回収後、ELISA 分析を行った。</p> <p>その結果、以下のことが明らかとなった。</p> <p>1. MLO-Y4 細胞は MC3T3-E1 細胞と比較して RANKL、VEGF の遺伝子およびタンパク</p>			

発現が有意に高く、OPG 発現は有意に低いことが明らかとなった。

2. MLO-Y4 細胞における RANKL の遺伝子およびタンパク発現は、0.5 g/cm<sup>2</sup>CF 群で有意な増加を認めたが、MC3T3-E1 細胞ではコントロール群と 0.5 g/cm<sup>2</sup>CF 群との間で有意差は認められなかった。
3. MLO-Y4 および MC3T3-E1 細胞ともに 1.0 g/cm<sup>2</sup> CF 負荷により RANKL、VEGF の遺伝子およびタンパク発現の有意な増加を認め、OPG 発現は有意に減少した。MLO-Y4 細胞において 1.0 g/cm<sup>2</sup> の CF 負荷時の RANKL、OPG、VEGF の遺伝子およびタンパク発現は 10 μM の Gd<sup>3+</sup>添加により有意に抑制された。

以上の結果より、本論文は骨細胞がメカニカルストレスを S-A channel を介して感知し、RANKL、OPG および VEGF の発現を調節することを明らかとし、その反応は骨芽細胞と比較して鋭敏であることが示された。したがって、骨細胞は外部からのメカニカルストレスを受けることにより骨代謝と血管新生を促す上で重要な役割を果たすことが示唆された。

よって審査委員会委員全員は、本論文が八島由佳に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	八島 由佳
学位授与の条件	学位規則第4条(第1)・2項該当		
論文題目			
持続的圧縮刺激がマウス骨細胞における RANKL、OPG および VEGF 発現に及ぼす影響			
最終試験担当者			
主査	教授 加藤 功一	印	
審査委員	教授 二川 浩樹		
審査委員	教授 宿南 知佐		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月21日の第4回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月6日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1 分銅による培養細胞への圧迫刺激負荷の妥当性について			
2 生体における圧迫側の細胞に生じる負荷との整合性について			
3 S-A channel 以外のメカノレセプターの影響と阻害剤の特異性について			
4 骨細胞の機械的負荷への感受性が骨芽細胞より高いことの生物学的意義			
5 実験に用いた骨細胞株と骨芽細胞株との違い			
6 今後の研究について			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			