

氏名	米田 紘一
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第 173 号
学位授与の日付	2014 年 3 月 6 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（博士課程修了）
学位論文題目	ヒト破骨細胞の分化に対する W9 ペプチドの抑制作用
指導教員	(主) 教授 宇田川 信之 (副) 教授 高橋 直之 (副) 准教授 小林 泰浩 (副) 准教授 中村 美どり
論文審査委員	主査 教授 佐原 紀行 副査 教授 岡藤 範正 副査 准教授 中野 敬介

学位論文の内容の要旨

【背景と目的】

破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である。そして、骨組織は骨吸収と骨形成のバランスにより調節されている。それらのバランス調節は、互いにあたかも連絡を取り合っているかのように見えるため、この現象は、骨代謝共役と呼ばれている。アミノ酸 9 つから構成される W9 ペプチドは、TNF レセプター (TNFR1) と相同性を有し、TNF の作用 (アポトーシスの誘導や炎症の惹起など) を抑制することが報告されている。また、W9 ペプチドは破骨細胞分化因子である RANKL と結合することにより、破骨細胞の分化を阻害し、卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおける骨量減少を防止することがマウスを用いた実験で明らかにされた。さらに、最近になり、W9 ペプチドは、培養骨芽細胞における石灰化を強力に促進し、W9 ペプチドの投与は正常マウスにおける骨形成を促進し、骨量を増加させることが報告された。今回、ヒトの細胞培養系における W9 ペプチドの作用を検討することを目的に、ヒト破骨細胞分化誘導系とヒト樹状細胞分化誘導系における W9 ペプチドの効果を解析した。

【方法及び結果】

健常人ボランティアから採取した末梢血から調製した単球を含む細胞画分を、破骨細胞分化因子である RANKL とマクロファージ刺激因子である M-CSF の存在下で 14 日間培養することにより TRAP 陽性ヒト多核細胞が形成された。この培養系に W9 ペプチドを添加することにより、RANKL と M-CSF により誘導される TRAP 陽性ヒト多核破骨細胞形成は濃度依存的に阻害された。一方、GM-CSF と IL-4 の存在下で 10 日間培養することにより誘導される TRAP 陰性のヒト多核樹状細胞の分化に対しては、W9 ペプチドは影響を与えなかった。

【考察】

ヒト破骨細胞の分化に対して、W9 ペプチドは阻害作用が認められ、同じ単球を起源とする免疫担当細胞として重要な役割を果たす樹状細胞の分化には W9 ペプチドは効果を示さなかったことから、W9 の効果は骨吸収を担当する破骨細胞の分化に特異的であることが示された。

学位論文審査の結果の要旨

9個のアミノ酸から構成される W9 ペプチドは TNF レセプターと相同性を有し、TNF の作用（アポトーシスの誘導、炎症の惹起など）を抑制する。また、RANKL と結合すると破骨細胞の分化を阻害することも知られている。さらに、最近の動物実験から W9 ペプチドは破骨細胞分化を阻害するだけでなく、骨芽細胞による骨形成も促進させ、骨量を増加させることも報告されている。

本研究では、W9 ペプチドの臨床応用を見据え、ヒト破骨細胞と起源を同一とする樹状細胞の分化に対する W9 ペプチドの効果をヒトの細胞培養系を用いて比較解析している。

実験結果より W9 ペプチドはヒト破骨細胞分化に阻害作用を持つことが明らかになった。しかし、樹状細胞の分化には全く効果が認められなかったことから、W9 ペプチドの効果はヒト破骨細胞の分化に特異的な阻害作用である事が明らかになった。

本研究で用いられたヒト末梢血由来の細胞培養系の研究は、W9 ペプチドだけでなくその他の骨代謝疾患治療薬の臨床応用に向けての優れた基礎的研究方法としても期待できるものである。

ヒト由来細胞を用いた実験系は松本歯科大学倫理委員会の承諾を得て行われている（承認番号：0089）

本論文は本学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学専攻の学位論文として、基礎歯科医学のみならず、将来的に臨床分野への応用につながる可能性を含んだ意義のある研究であると評価した。以上のことより、本論文に学位論文としての価値を認めた。

最終試験の結果の要旨

学位申請論文を中心に口頭による試験を行った。主要な質問事項（順不同）は次のとおりである。

1. 今回の実験で用いたヒト末梢血の単球から分化した多核細胞は骨吸収能を持っているか。
2. W9 ペプチドと OPG の骨芽細胞に対する作用の差はどのように理解するか。
3. W9 ペプチドから予想される 2 つのシグナル（リバースシグナルとフォワードシグナル）について簡単に説明してください。また、W9 ペプチドが骨芽細胞の Unknown な Receptor などについて作用した可能性は考えられないか。
4. 破骨細胞が骨を吸収するメカニズムは、異物巨細胞が異物を認識するメカニズムと共通点があるのではないか。
5. ラットの歯の移動実験で出現する異物巨細胞と今回の実験で観察している多核巨細胞の違いは何か。
6. GM-CSF と IL-4 により多核化した樹状細胞は抗原認識機構を有しているのか。また、樹状細胞の多核化の意義は何か。
7. 破骨細胞分化と樹状細胞分化の培養系で用いているリコンビナント試薬が、それぞれ種が異なる（ヒトとマウス）理由は何か。それぞれの培養期間が異なる（10日と14日）理由は何か。

以上の質問に対して、申請者は適切に回答した。また、申請者は、実験より得られた結果に対して適切な考察が行える専門的知識があり、博士課程修了者として十分な知識と学力を有しているものと判断された。

本審査委員会は、申請者を博士（歯学）として十分な学識を有するものと認定、最終試験合格との結論に至った。