

学位審査結果報告書

学位申請者氏名 天本 晋輔

学位論文題目 Zoledronate and lipopolysaccharide suppress osteoblast differentiation through downregulating phosphorylation of Smad in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells

審査委員 (主査氏名) 有吉 渉 (署名) 有吉 渉

(副査氏名) 矢田 直美 (署名) 矢田 直美

(副査氏名) 竹内 弘 (署名) 竹内 弘

学位審査結果の要旨

ビスホスホネート関連顎骨壊死 (BRONJ) には難治性症例が存在し、有効な治療法がないことが深刻な問題点であり、その病因も明らかとされていない。申請者の所属する研究グループはこれまでに、ラットに対する細菌感染やグラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) の投与により、BRONJ を誘発し、骨壊死を増悪させることを *in vivo* の実験系で報告している。そこで本申請研究では、BRONJ 発症メカニズムの詳細を明らかにすることを目的に *in vitro* の培養系を用いて、LPS と zoledronate (ZOL) の共刺激が前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の分化における影響について検討した。

MC3T3-E1 細胞に対して、ZOL 単独、LPS 単独、LPS と ZOL の併用添加群を設定し、それぞれの至適濃度で細胞を処理した。細胞増殖への影響については、WST-8 アッセイを用いて、生細胞数を計測し、評価した。骨芽細胞分化については、各実験群の細胞を骨誘導因子存在下に培養し、alkaline phosphatase (ALP) 染色および ALP 活性、アリザリンレッド S 染色を用いて評価した。加えて、骨芽細胞の分化マーカーである *runx-related transcription factor 2 (Runx2)*、*type 1 collagen (Col1)*、ALP、*bone sialoprotein (BSP)* の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。さらに、ウェスタンブロッティング法を用いて、Smad1/5/8 タンパクのリン酸化と bone morphogenetic protein 2 (BMP2) のタンパク発現を検討した。

その結果、LPS と ZOL の併用添加群では、骨芽細胞分化の初期段階から LPS および ZOL 単独添加群と比較して、ALP 活性や ALP の染色強度が抑制され、アリザリンレッド染色においても、石灰化の抑制が観察された。同様に、LPS と ZOL の併用添加群では、LPS および ZOL の単独刺激群と比較して、*Runx2*、*Col1*、ALP、*BSP* の遺伝子発現量も低下していた。さらに LPS と ZOL の併用添加は、MC3T3-E1 細胞における BMP2 の遺伝子およびタンパク発現量を有意に低下させ、BMP2 により誘導される細胞内シグナルである Smad1/5/8 のリン酸化も負に調節することが示された。

本研究結果より、ZOL と LPS は、BMP2/Smad シグナルの抑制を介して、骨芽細胞の分化を負に制御することが示された。このことから、ZOL の投薬治療を受けている患者の口腔内では、口腔内細菌由来の LPS と露出した骨周囲から溶出した ZOL の両者によって、骨芽細胞の分化抑制が生じている可能性が示唆された。

本研究内容について申請者の天本氏に対し、実験の手技や結果の解釈、臨床における BRONJ の病態解明における本申請研究の意義や今後に残された研究課題などについて主査と 2 名の副査による諮問を行い、概ね適切な回答を得た。本研究成果は、難治性の口腔内疾患である BRONJ の病態解明について、骨芽細胞にフォーカスした新たな治験を提供するものであり、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。