

氏 名 (本 籍 地) 黒田栄子(大阪府)
学位記および番号 博士(歯学), 乙 第308号
学位授与の日付 平成24年1月17日
学 位 論 文 題 名 「培養環境pHがおよぼす骨芽細胞のサイトカイン産生についての研究」
論 文 審 査 委 員 (主査) 横瀬敏志教授
(副査) 廣瀬公治教授
福井和徳教授

論文の内容および審査の要旨

矯正歯科治療では装置装着により口腔内の環境が大きく変化し、歯肉炎などの歯周疾患の発症が認められる。Bickelらによると歯周疾患局所においては、その環境pHがアルカリ性に推移することが示されている。炎症反応において変化する歯周局所の環境pHがおよぼす骨芽細胞への影響についての検討は未だ少ない。骨芽細胞は多くのサイトカインを産生し、骨代謝に重要な役割を果たしている。そのうちTransforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)は骨形成に促進的に作用することが示されている。一方、Interleukin-11 (IL-11)は骨吸収を促進するサイトカインとして知られている。しかしながら環境ストレス要因のひとつであるpHが及ぼす骨芽細胞からのTGF- β の産生に与える影響についての検討は未だなされていない。そこで本研究は、ヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞を用い培養環境pHの影響を検討することを目的とした。

ヒト骨肉腫細胞としてSaOS2を用いた。単層を形成した同細胞を、pH7.0から0.8に調整した培地に置換し、所定の時間培養後TGF- β 1とIL-11のmessenger RNA (mRNA)の発現をRT-PCRにて解析した。なお、インターナルコントロールにはG3PDHを用いた。培養上清中のTGF- β 1の産生量はELISAにより求めた。

また、培養環境pHの変化により産生されたTGF- β 1が同細胞からのIL-11の産生に与える影響を抗ヒトTGF- β 1抗体を用いて検討した。さらに、培養環境pHの変化によるシグナル伝達を解析する一端としてNF- κ B阻害剤であるPDTC

を用い検討した。

はじめに、SaOS2の培養環境pHを上昇させた時のALP活性について検討した。その結果、pHの上昇とともに、ALP活性が上昇した。次に、同一条件におけるDNA合成能を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込み能から検討した。その結果、pHが上昇するにつれて、DNA合成能が低下した。培養環境pHの変化によるSaOS2は、pHの上昇に伴いTGF- β 1の産生が促進され、それと同時にIL-11の産生が誘導された。そして、IL-11の産生促進は抗TGF- β 1抗体により阻害された。PDTC添加群では、その濃度依存的にTGF- β 1 mRNAの発現は有意に抑制された。

培養環境pHの上昇はSaOS2からのTGF- β 1産生を一時的に促進し、それと同時にIL-11の産生が認められた。さらに、IL-11の産生促進は抗TGF- β 1抗体により阻害された。

以上の結果は、骨芽細胞に対するpHストレスが骨のリモデリングに影響を与えている可能性を示す。さらには、骨芽細胞に対する弱アルカリの環境ストレスは、骨代謝に重要な役割を果たすTGF- β 1の産生を促進する一方、オートクリンの系を介し骨吸収因子であるIL-11の産生を促進するというネガティブフィードバックが存在することを示唆する。さらに、培養環境pHの変化により活性化されたNF- κ BのシグナルはTGF- β 産生促進に働くもののそのオートクリンの結果産生されたIL-11がNF- κ Bの活性を抑制するというネガティブフィードバックの系が遺伝子レベルにおいても存在することを示唆した。

本論文の審査は平成23年12月27日に行われた。まず、申請者が研究の概要を説明後、質疑応答が行われた。各審査委員からの主な質疑は、1) プライマーの設計、2) 抗体濃度の決定、3) pH変化は細胞の何処で認識をしているのか、についてであり、いずれの質問に対しても申請者は的確に回答した。また、語学試験として英文和訳を実施した結果、十分な読解力を有していると判定した。本研究は歯科医学の発展に寄与するものと考えられ、申請者は学位授与に値すると判定した。

掲載雑誌

奥羽大学歯学誌 第39巻, 4号 219~226