

博士學位論文

論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

第1号 (2006年3月授与)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科

は し が き

学位規則第 8 条の規定による公表を目的として、2006 年 3 月に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を集録したものである。

目 次

◇大学院博士課程修了によるもの

学位記番号	氏名	論文題目	頁
甲 第 1 号	武 郁子	Prostaglandin E ₂ strongly inhibits human osteoclast formation (Prostaglandin E ₂ はヒト破骨細胞分化を強力に抑制する)	1
甲 第 2 号	中村 雅明	Colocalization of serotonin and substance P in the postnatal rat trigeminal motor nucleus and its surroundings (三叉神経運動核におけるサブスタンス P ・セロトニン共存終末の分布様相と生後変化)	4

氏名	武 郁子
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	甲第1号
学位授与の日付	2006年3月9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	Prostaglandin E ₂ strongly inhibits human osteoclast formation (Prostaglandin E ₂ はヒト破骨細胞分化を強力に抑制する)
指導教員	(主) 教授 高橋 直之 (副) 教授 宇田川 信之 (副) 助教授 小林泰浩
論文審査委員	主査 教授 王 宝禮 副査 教授 長谷川 博雅 副査 教授 中村 浩彰 副査 助教授 上松 隆司

学位論文の内容の要旨

【目的・背景】

Prostaglandin E₂ (PGE₂) は、マウスの骨髄マクロファージ（破骨細胞前駆細胞）の培養系において、RANKL (receptor activator of NF-κB ligand) が誘導する破骨細胞分化を促進する。本研究では、このマウスで認められる現象がヒトにも当てはまるか否か、ヒト末梢血単核細胞から単離したCD14 陽性細胞の培養系を用いて解析した。

【材料と方法】

ヒト末梢血より、CD14 抗体ビーズを使い、CD14 陽性細胞を分取した。CD14 陽性細胞をM-CSF(macrophage colony-stimulating factor)とRANKLの存在下で培養し、破骨細胞の形成を促した。この実験系にPGE₂を添加し、ヒト破骨細胞分化に及ぼすPGE₂の効果を解析した。更に、CD14 陽性細胞とSaOS4/3 細胞を共存培養し、SaOS4/3 細胞が支持する破骨細胞形成に対するPGE₂の作用を解析した。破骨細胞の形成は、TRAP染色及びビトロネクチンレセプター (CD61) 抗体を用いた免疫染色により評価した。cAMPの産生量はcAMP enzyme immunoassay kit を用いて測定した。

【結果と考察】

(1) CD14 陽性細胞はPGE₂受容体EP2 とEP4 を発現しており、PGE₂およびPGE₁ alcohol (EP2/4 アゴニスト) はCD14 陽性細胞のcAMP産生を促進した。(2)ヒトCD14 陽性細胞は、RANKLおよびM-CSFの存在下で破骨細胞に分化した。マウスマクロファージ培養系とは異なり、PGE₂およびPGE₁ alcoholは、RANKL誘導性のヒト破骨細胞分化を抑制した。H89 (PKA阻害剤) はヒト破骨細胞分化に対するPGE₂の阻害作用を解除した。(3) CD14 陽性細胞とSaOS4/3 細胞の共存培養において、副甲状腺ホルモン (PTH) は破骨細胞分化を誘導した。このPTHが誘導する破骨細胞分化を、PGE₂は抑制した。一方、COX-2 (cyclooxygenase-2) 阻害剤NS398 は、PTHが誘導する破骨細胞分化を更に促進した。(4)PGE₂で処理したCD14 陽性細胞の培養上清は、ヒト破骨細胞分化のみならずマウスの破骨細胞分化も抑制した。

【結論】

PGE₂は、ヒト破骨細胞分化を強力に抑制した。PGE₂はヒト破骨細胞前駆細胞に直接作用し、ヒトおよびマウスの破骨細胞分化を抑制する液性因子の産生を促すことが示された。PGE₂は骨吸収を促進する因子として考えられてきたが、ヒトの場合は骨吸収を抑制する可能性が示された。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト破骨細胞分化に対するPGE₂の効果について検討することを目的としている。従来PGE₂は骨吸収因子として作用すると考えられてきたが、この考え方が、ヒトの場合も妥当であるか否か解析しようとしたものであり、この目的は大変に興味深いものであると評価した。

申請者は、ヒト末梢血単核細胞から得られたCD14陽性細胞（破骨細胞前駆細胞）の培養系を用いて、RANKLとM-CSFの存在下でヒト破骨細胞分化に対するPGE₂の効果について解析した。更に、CD14陽性細胞とSaOS4/3細胞の共存培養系を用いて、SaOS4/3細胞が支持する破骨細胞形成に対するPGE₂の作用を解析した。破骨細胞の形成は、TRAP染色及びビトロネクチンレセプター（CD61）抗体を用いた免疫染色により行った。末梢血の提供者に対するインフォームドコンセントは丁寧にとられていると確認できること、また本研究で用いられた実験方法は合理的であると判断できることより、本論文の研究方法は妥当であると評価した。

一連の実験より、(1)ヒト末梢血単核細胞から得られたCD14陽性細胞はPGE₂受容体のうちEP2とEP4を発現していること、(2)PGE₂は受容体EP2とEP4を介してヒト破骨細胞分化を抑制すること、(3)PGE₂による破骨細胞分化抑制効果は、CD14陽性細胞とSaOS4/3細胞の共存培養におけるPTH誘導性の破骨細胞分化に対しても確認できること、(4)PGE₂処理を行ったCD14陽性細胞の培養上清は、ヒト破骨細胞分化のみならずマウスの破骨細胞分化も抑制することが示された。各種の培養実験系を駆使して得られた結果は、興味あるものと評価できる。

以上の結果から、導き出された「PGE₂はヒト破骨細胞前駆細胞に直接作用して、ヒト破骨細胞の分化を強力に抑制する」という結論は妥当であると評価した。

本論文は、PGE₂が骨吸収促進因子として作用するという既成概念に反する現象を基点に、PGE₂の機能解析を目指したもので、その結果は興味深い。さらに、PGE₂に対して骨吸収を促進する作用と抑制する作用を解明した点に、研究の独創性が認められる。マウスとヒトの破骨細胞培養実験を用いて、ヒトとマウスの破骨細胞形成に対してPGE₂は逆の作用を有することが明確に示されたことも評価できる。また、どのようなサイトカインがCD14陽性細胞から産生され、破骨細胞形成過程にどのように影響を与えるかという新たな研究課題を提示した研究であることも評価できる。従来、PGE₂は歯の移動を促進する主要な骨吸収因子と考えられてきた。本論文は、矯正力を加えることによって局所でPGE₂が産生された場合、そのPGE₂は骨吸収を抑制し歯の移動を逆に妨げる可能性を示しており、臨床的にも注目される知見を提供している。また申請者は、破骨細胞の基本的な培養方法を習得しているとともに、RT-PCR法、enzyme immunoassay、免疫染色などを駆使する能力を有しており、博士課程において十分な知識と技能を習得していると判断された。

なお、本論文は「Prostaglandin E₂ strongly inhibits human osteoclast formation」というタ

イトルでEndocrinology誌[146(12):5204-5214, 2005]に掲載されたものである。

以上のことより、本論文に学位論文としての価値を認める。

最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「Prostaglandin E₂ strongly inhibits human osteoclast formation」を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄、研究成果の今後の展開などについて、口頭試問及び筆頭試験を行い明確な回答が得られた。

質問事項は、次のとおり。

1. CD14 陽性細胞とはどのような形質を有した細胞か。
2. CD14 陽性細胞を抗体ビーズで集めたが、その抗体の影響は出ないのか。
3. 臨床上PGE₂が骨吸収を抑制するような経験や報告はあるのか。
4. ロイコトリエンの骨吸収に対する作用はどのようなものがあるのか。
5. なぜヒトの場合、破骨細胞の同定にビトロネクチン染色を用いたか。
6. NS398 はどのような機序で COX-2 を抑制するのか。
7. ヒトマクロファージが産生する破骨細胞形成抑制因子をどのように同定しようとしているのか。
8. PGE₂処理で破骨細胞への分化が抑制された前駆細胞の形質はどのようなものか。
9. 破骨細胞分化が抑制された破骨細胞前駆細胞は、RANKL と M-CSF で再処理すると再び破骨細胞に分化するのか。
10. 歯牙移動のときに（矯正治療時）にPGE₂は増加するのか。
11. 本研究を行って、矯正歯科（歯科臨床）のどのように役立つか。

以上より、本審査会は、学位請求者が博士（歯学）として十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	中村 雅明
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	甲第2号
学位授与の日付	2006年3月9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	Colocalization of serotonin and substance P in the postnatal rat trigeminal motor nucleus and its surroundings (三叉神経運動核におけるサブスタンス P・セロトニン共存終末の分布様相と生後変化)
指導教員	(主) 助教授 安田 浩一 (副) 教授 古澤 清文 (副) 教授 金銅 英二
論文審査委員	主査 教授 森本 俊文 副査 教授 金銅 英二 副査 教授 増田 裕次 副査 助教授 澁谷 徹

学位論文の内容の要旨

背景及び目的

三叉神経運動核 (Vmo) は細胞構築によって背外側亜核 (Vmo.dl) と腹内側亜核 (Vmo.vm) に区別され、咬筋や側頭筋などの閉口筋運動ニューロン群は前者に、顎二腹筋前腹や顎舌骨筋などの開口筋運動ニューロン群は後者に局在する。また、三叉神経運動核の周囲 300 μ m (SVmo) には咀嚼リズム形成に関連する前運動ニューロンが存在するとされている。これらの運動ニューロンの活動は、延髄の縫線核細胞によって修飾され、その神経回路の伝達物質としてサブスタンス P とセロトニンが知られている。近年、成ラットの三叉神経運動核では、多くのサブスタンス P とセロトニンは同一の軸索終末内に共存し、咀嚼、嚥下、呼吸などの機能に関わる顎運動を制御していることが知られるようになった。しかしながら、それらの生後変化については不明な点が多く、サブスタンス P とセロトニンの共存の生理的意義については見解の一致をみていない。そこで Vmo の各領域における、サブスタンス P とセロトニン陽性終末の分布様相および生後変化について検討した。

実験方法

- 1)免疫組織化学染色法：胎生 19 日、生後 0、4、7、14、21、70 日齢の Wistar 系ラットを用い、灌流固定後に脳幹を摘出しクライオスタットにて Vmo を含むレベルの凍結横断連続切片を作製した後、1 次抗体として rabbit anti-substance P polyclonal antibody あるいは rabbit anti-serotonin polyclonal antibody を用いた一連の免疫組織化学染色を行った。光学顕微鏡下で Vmo.dl、Vmo.vm および SVmo の 3 領域におけるサブスタンス P とセロトニン陽性終末について、それぞれの分布密度の生後変化を検討した。
- 2)二重蛍光免疫染色法：実験 1 と同様に凍結横断連続切片を作製し、1 次抗体として goat anti- substance P polyclonal antibody と rabbit anti-serotonin polyclonal antibody、2 次抗体として donkey anti- goat IgG (H+L)- FITC と donkey anti- rabbit IgG (H+L)-

Rhodamine を用いた一連の蛍光免疫組織化学染色を行った。蛍光顕微鏡下で FITC に発色したサブスタンス P 陽性終末と、Rhodamine に発色したセロトニン陽性終末の分布や共存（二重染色された軸索終末）について観察し、Vmo.dl、Vmo.vm および SVmo の 3 領域におけるサブスタンス P・セロトニン共存終末の生後変化について検討した。

結果及び考察

サブスタンス P とセロトニン陽性終末はそれぞれ 3 領域ともに、出生後から増加し、生後 7 日に最高値を示した後、徐々に減少していた。また、3 領域間の分布密度は、胎生 19 日と生後 0 日では Vmo.vm の密度が最も高く、以下 SVmo、Vmo.dl の順であったのに対し、生後 4 日以降ではすべての日齢で SVmo、Vmo.vm、Vmo.dl の順に高密度を示した。これらの結果は、下顎運動に関わる中枢神経系には、咀嚼機能の獲得や、胎盤呼吸から肺呼吸への変化などの出生直後の環境に対応した生後変化がみられることを示していると考えられた。

サブスタンス P・セロトニン共存終末については、3 領域ともすべての日齢でセロトニンを含有する終末の 89%以上がサブスタンス P と共存していたことから、出生前後を通じて一定の生理的役割を担っていることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

顎運動を支配する三叉神経運動ニューロンは、末梢からの感覚情報や上位中枢からの入力によって綿密にコントロールされ、その情報伝達には種々の神経伝達物質が関与する。神経伝達物質の中でグルタミン酸などは主入力に関与しているのに対して、サブスタンス P やセロトニンなどは調節性入力に関わっている。また、サブスタンス P とセロトニンは同一の軸索終末内に共存することがあり、両者の相互作用によって運動ニューロンに対する調節がなされている。申請者は顎運動に関わる中枢神経系の生後変化を明らかにする試みとして、サブスタンス P とセロトニンに着目した解析を行っている。

本研究は閉口筋運動ニューロンの局在する三叉神経運動核背外側亜核 (Vmo.dl)、開口筋運動ニューロンが局在する三叉神経運動核腹内側亜核 (Vmo.vm)、咀嚼リズム形成に関連する前運動ニューロンが存在するとされる三叉神経運動核の周囲 300 μ m (SVmo) の 3 領域について、サブスタンス P とセロトニン陽性終末の分布密度の生後変化を検索するとともに、サブスタンス P・セロトニン共存終末の共存率について検討している。これらには免疫組織化学染色法や二重蛍光免疫染色法が用いられており、申請者は博士課程において十分な形態学的実験手法を修得していると考えられる。

本研究から①サブスタンス P とセロトニン陽性終末は、出生後から増加し生後 7 日に最高値を示す、②3 領域間の分布密度は、胎生 19 日と生後 0 日では Vmo.vm の密度が最も高く、生後 4 日以降ではすべての日齢で SVmo が高密度である、③サブスタンス P・セロトニン共存については、3 領域ともすべての日齢でセロトニン終末の 89%以上がサブスタンス P と共存している、以上の結果を得ている。これらより、三叉神経系には咀嚼能力の獲得や、胎盤呼吸から肺呼吸への変化に対応した神経終末の生後変化が生じることが示唆されており、結論は納得できるものである。

本論文は、顎運動の生後発達の背後にある中枢神経系の変化を、神経伝達物質のサブスタンス P とセロトニン陽性終末の分布様式とその生後発達について検討することにより、明解な結論を導いた独創的な研究である。したがって、本論文に学位論文としての価値を認める。

なお、本論文は、「Colocalization of serotonin and substance P in the postnatal rat trigeminal motor nucleus and its surroundings」というタイトルで、International Journal of Developmental Neuroscience [24(1):61-64, 2006]に掲載されたものである。

以上のことより、本論文に学位論文としての価値を認める。

最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「Colocalization of serotonin and substance P in the postnatal rat trigeminal motor nucleus and its surroundings」について、以下の質問を行い明確な回答が得られた。

質問事項

1. 三叉神経運動核周囲(SVmo)300 μ mに見られたサブスタンスPとセロトニン終末は、核周辺細胞に付いているのではなく、三叉神経運動ニューロンの樹状突起に直接付いているのではないか。
2. 三叉神経運動核の範囲を組織学的にどのように同定したか。
3. サブスタンス P とセロトニン終末の分布密度がいずれも生後7日齢で最高値を示していることの生理的意義は何か
4. ラットの咀嚼運動は、生後のいつごろから始まるのか。
5. サブスタンス P とセロトニン終末の分布密度は、生後0日齢までは三叉神経運動核腹内側亜核(Vmo.vm)が最も高い値を示すが、生後4日齢以降では三叉神経運動核周囲(SVmo)で高くなることの機能的意義はなにか。
6. サブスタンス P とセロトニンの共存する意義は何か
7. 論文中では、セロトニン陽性終末のサブスタンス P 共存率を算出しているが、逆にサブスタンス P 陽性終末のセロトニン共存率は、どのようになっているか。

以上より、本審査会は、学位請求者が博士(歯学)としての十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。