

論文審査の結果の要旨

氏名：清水 なつ生

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：高濃度グルコースが成熟骨芽細胞の石灰化に与える影響

審査委員：（主査） 教授 鈴木 直人

（副査） 教授 本吉 満 教授 篠田 雅路

教授 高橋 富久

破骨細胞と骨芽細胞による骨の改造現象は、顎骨以外にも全身の骨の成長や骨の創傷治癒過程で生じており、血中グルコース濃度が様々な影響を与えることが知られている。グルコースは骨芽細胞の主なエネルギー源で、骨組織では活発なグルコースの取り込みが観察されている。また、最近の研究から骨芽細胞の分化過程でグルコース代謝が大きく変化することも知られている。高濃度グルコースによる骨芽細胞分化や基質の石灰化に与える影響については、マウス前骨芽細胞様株化細胞の MC3T3-E1 を使った培養系で研究されている。しかしながら、報告ごとに結果が異なり、一定の見解が得られていないのも事実である。そこで、本研究では成熟骨芽細胞の性質をもつラット骨肉腫由来株化細胞 ROS17/2.8 を使用して、高濃度グルコースが基質の石灰化を抑制するメカニズムについて検討した。

ROS17/2.8 は α MEM に 10%牛胎児血清 (FBS), 600 mg/L glutamine, 100 IU/mL penicillin と 100 mg/mL streptomycin を添加して、湿度 100%, 37°C, 5% CO₂ の条件で培養した。なお、通常の 10% FBS が含まれた α MEM のグルコース濃度は 5.5 mM に設定されているため、この培地で培養した細胞を対照群とし、終濃度が 11 mM と 22 mM になるようにグルコースを加えて培養した細胞を実験群とした。Alkaline phosphatase は 0.19 mg/ml の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate と 0.4 mg/ml の nitro blue tetrazolium chloride を含む溶液を使用した発色法によって評価した。基質の石灰化は alizarin red (AR) 染色と AR 染色後の基質溶解液の吸光度法を測定して評価した。細胞の生存レベルは WST8 試薬を使用して調べた。骨芽細胞関連因子の Runx2, type I collagen (Col1A1), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) の遺伝子発現については quantitative RT-PCR (qPCR) によって検討した。さらに、ピロリン酸 (PPi), モノリン酸 (Pi) および ATP の濃度測定は市販の測定キットを使用した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 11 mM と 22 mM の高濃度グルコースは ROS17/2.8 の石灰化を抑制した。
2. 高濃度グルコースは細胞の生存レベルと骨芽細胞関連因子の RUNX2, COL1A1, OCN および OPN の遺伝子発現を増加させた。
3. 7日間の培養期間中、5日目に高濃度グルコースにすることで、石灰化を強く抑制した。
4. 高濃度グルコースは細胞外 PPi 濃度の上昇と、細胞内・外 Pi の濃度の低下を誘導した。
5. ピロリン酸ナトリウムは、5.5 mM グルコースで培養した細胞の石灰化を抑制した。
6. 高濃度グルコースは細胞内 ATP の濃度を軽度増加させ、細胞外 ATP を減少させた。

以上のことから、高濃度のグルコースを含む培地で培養した ROS17/2.8 に観察された石灰化抑制は、細胞外 PPi 濃度の上昇が原因で生じている可能性を示唆するもので、骨代謝ならびに関連する歯科医学の分野に寄与するところが多いものと考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和5年3月9日