



Title	Expression dynamics of podoplanin in the mineralization of cultured osteoblasts with mechanostress [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	竹縄, 智紘
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第13041号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70458
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Tomohiro_Takenawa_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 竹縄智紘

審査担当者	主査	特任教授	飯田 順一郎
	副査	特任教授	鈴木 邦明
	副査	教授	網塚 憲生

学位論文題名

Expression dynamics of podoplanin in the mineralization of cultured osteoblasts with mechanostress
(機械的ストレスを負荷した培養骨芽細胞の石灰化におけるポドプラニンの発現動態)

主査および鈴木副査は飯田教授室において同席のもと、また網塚副査は硬組織発生生物学教室において個別に審査を行った。申請者から研究の概要説明の後、提出論文の内容および関連分野について口頭試問形式で審査した。申請者からは研究内容について次のように説明された。

骨芽細胞が産生する podoplanin (PDPN)はシアル酸結合型のムチン型タンパクで、骨の強度を維持し、血小板を凝集する。骨組織における研究では、PDPNは分化初期の骨細胞マーカーと考えられているが、骨代謝における役割は十分には解明されていない。骨芽細胞の初代培養では、PDPNの発現はみられないが、石灰化物形成とともに樹状突起上の PDPN 発現量が増加するため、石灰化への関与が考えられている。機械的ストレス環境下において骨芽細胞が PDPN 産生を促進し、骨形成も促進するならば、その特性を利用した PDPN 標品を矯正歯科治療後の歯の後戻りや動揺の予防に適用することが可能であると考えられる。

本研究では、マウス骨髄由来骨芽細胞を用いて、機械的ストレス負荷環境下の PDPN および骨関連タンパクである osteopontin (OPN) と osteocalcin (OC) の産生、また、PDPN の石灰化における役割を明らかにすることを目的とした。まず、FX-3000™ Flexcell Strain Unit を使用し、機械的ストレス非負荷と負荷後の骨芽細胞に免疫組織化学染色を施した。その結果、機械的ストレス負荷とともに各タンパクの染色領域が拡大し、ImageJ を用いて有意に増加したことを確認した。また、Real-time PCR の結果から、骨芽細胞の PDPN mRNA と OC mRNA は、機械的ストレス負荷環境下において負荷3日目まで、OPN mRNA は、負荷2日目まで、それぞれ有意に増加後、減少した。機械的ストレス負荷により骨芽細胞は OPN および OC の産生増加とともに、PDPN の産生も増加したことから、PDPN は OPN および OC と関連して骨形成に働く可能性があるもの

と考えられた。さらに、培地の条件および機械的ストレスの有無を変化させた際の mRNA 発現の変化の結果から、骨芽細胞での PDPN の発現は、OPN や OC と異なり、機械的ストレス負荷が強い発現誘導因子となっていることが示唆された。また、機械的ストレス負荷環境下で培養した骨芽細胞を用い、免疫沈降したタンパク質を Western blot 法で解析した結果、PDPN タンパク質が負荷期間と共に増加した。さらに、ELISA 法の結果より、PDPN タンパク質の産生量は機械的ストレス負荷期間と共に増加した。この結果は、Real-time PCR の結果とほぼ一致した。次に、骨形成培地で培養した骨芽細胞に、抗 PDPN 抗体を培地に添加し、骨芽細胞の石灰化過程に与える影響を検討した。同様に、抗 OPN 抗体、抗 OC 抗体、抗 Actin 抗体、isotype 抗体の各特異抗体を培地に添加した結果、抗 PDPN 特異抗体を添加した骨形成培地で 20 日間培養した骨芽細胞は、細胞死することなく石灰化物産生を抑制することが確認された。抗 OPN・OC 特異抗体を添加した場合も同様であった。以上の結果より、本研究で用いた機械的ストレス負荷は、マウス骨髄由来骨芽細胞の PDPN 産生量を増大させ、また、抗 PDPN 特異抗体は石灰化を抑制することが明らかになった。これらのことより、機械的ストレス負荷は、PDPN 産生の促進因子であり、PDPN は、マウス骨髄由来骨芽細胞による石灰化に寄与することが示唆された。

引き続き以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

- (1) 腎糸球体のポドサイトについて
- (2) 骨形成培地の成分とその役割について
- (3) Osteopontin と Osteocalcin また Podoplanin の石灰化での役割について
- (4) osteopontin と osteocalcin の発現が抗 podoplanin 抗体で制御される原理について
- (5) メカニカルストレスと podoplanin を介したアクチンフィラメントの細胞内構築について

矯正歯科治療においては、歯に機械的な刺激を加えて骨代謝のバランスを崩し、骨の形態を変化させて歯の移動を誘導している。本研究は機械的刺激と骨芽細胞の働きの間で登場した新たな物質であるポドプランニンに着目し、ポドプランニンの石灰化における役割について新たな知見を紹介している。

本研究成果は、歯科医学にとどまらず骨代謝に関連する今後の研究の展開に大きく貢献する重要な基礎的情報を提供したものと高く評価できる。加えて、質疑応答から、申請者は本研究の内容を中心とした専門分野について十分な理解と関連分野の幅広い知識を有していることを認めた。以上から、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認めた。