



Title	RNA-sequencing を用いた骨細胞におけるメカニカルストレス応答機構の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	藤田, 尚正
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15026号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85660">https://hdl.handle.net/2115/85660</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Naomasa_Fujita_review.pdf, 審査の要旨



# 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 藤田尚正

審査担当者	主査	教授	田村	正人
	副査	教授	網塚	憲生
	副査	教授	飯村	忠浩
	副査	准教授	佐藤	真理

## 学位論文題名

RNA-sequencing を用いた骨細胞におけるメカニカルストレス応答機構の解析

審査は、審査担当者全員の出席の下、公聴会として行われ、申請者より論文内容の概要の説明が行われた。その後、論文内容および関連した学問分野について審査担当者が質問し、申請者が回答する形で行われた。申請者は論文の概要について以下のよう

に説明した。

生体は、生体内外において常に生化学的および物理的・力学的なさまざまな作用・ストレスを受け、細胞・組織はこれらの作用に対して応答し、生理機能を調節させ恒常性を維持している。これらのストレスの中で、メカニカルストレスは生体の組織・細胞に負荷される物理的・力学的な刺激である。骨組織においてメカニカルストレスは、骨のリモデリングを制御し骨量の維持に寄与することが知られている。しかし、骨細胞におけるメカニカルストレスの詳細な分子応答メカニズムについては明らかではない。超音波刺激はメカニカルストレスの一つであり、LIPUS (Low Intensity Pulsed Ultra Sound : 低出力パルス超音波) は骨折治癒を促進するために臨床的に利用されてきた。骨細胞様細胞 (MLO-Y4細胞)、メダカおよびゼブラフィッシュを用いたこれまでの研究により、LIPUS刺激が骨細胞に作用し転写因子を制御することで骨折治癒を促進することが報告されている。本研究では、LIPUS刺激を加えたマウス骨細胞および運動刺激を加えたマウス大腿骨を用いてRNA-sequencing解析を行い、哺乳類の骨細胞におけるメカニカルストレス応答遺伝子を抽出することを目的とした。

MLO-Y4細胞をLIPUS で刺激し、total RNAを抽出した。6 週齢のマウスを6 週間走行運動させ、大腿骨からtotal RNAを抽出した。これらを用いてRNA-sequencing解析を行い、LIPUS 刺激の発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes; DEGs) および運動刺激のDEGsを検索し、解析ツールR, DAVID を用いて可視化とクラスター解析お

よびパスウェイ解析を行った。

LIPUS刺激および運動刺激で得られたDEGs はそれぞれ179個, 146個であった。両者に共通する機能クラスターとして「proteinaceous extracellular matrix」, 「extracellular region」, 「insulin-like growth factor binding protein」が抽出された。また, 両者のDEGs に共通する遺伝子として*Pim1*, *Ccn1*, *Fmod*, *Fabp4* の4つが抽出され, これらが骨細胞においてメカニカルストレスに応答する際にキーとなる有力な候補遺伝子と考えられた。また, これらのうちLIPUS 刺激および運動刺激で挙動が一致した遺伝子は*Ccn1*のみであった。*CCN1*は細胞外分泌タンパク質であり, 様々な組織で増殖, 分化, 血管新生の促進に関与することが知られ, 骨組織では骨量を調節することが示唆されている。

本研究より, 骨細胞におけるメカニカルストレス応答遺伝子が明らかになった。また, 骨細胞が *CCN1* を産生することで骨のリモデリングや骨量の維持に関与している可能性という新たな知見が得られた。本研究で得られた骨細胞のメカニカルストレス応答遺伝子の解明は, 骨リモデリングの理解を深めるとともに, 運動器医療において重要な基礎的知見となり得ると考えられた。

各審査担当者からの主な質問項目は, 以下である。

- 1) LIPUS 照射による MLO-Y4 細胞と MC3T3-E1 細胞における遺伝子発現変化の違いについて
- 2) 培養細胞の LIPUS 照射とマウスのトレッドミルでの運動で骨にかかる力の違いについて
- 3) マウス大腿骨からの RNA 抽出の方法について
- 4) マウスの運動による体重と骨の太さの変化について
- 5) メカニカルストレス負荷後の *Sost* や *RANKL* の発現量の変動について
- 6) MLO-Y4 細胞と他の骨細胞様細胞について
- 7) RNA シークエンスの解析ソフト, 解析法と抽出される遺伝子について
- 8) 解析技術の進展と得られる情報について

これらの質問に対して, 申請者から明快な説明と回答が得られた。申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより, 関連分野について十分な知識を有しており, 本研究のさらなる発展が期待された。本研究は, 歯科医学の発展に寄与するものであり, 審査担当者全員は申請者が博士(歯学)の学位を授与されるに相応しいと認めた。