

(様式第 13 号)

2015 年 4 月 23 日

## 学位論文審査の結果及び最終試験の結果の要旨

学位申請者氏名	张 以鸣	
学位論文名	Comparing immune-competent and immune-deficient mice as animal models for bone tissue engineering 骨再生研究モデルとしての免疫正常および免疫不全動物の比較について	
論文審査委員	主査：	松本歯科大学 教授 佐原 紀行 (印)
	副査：	松本歯科大学 教授 小林 泰浩 (印)
	副査：	松本歯科大学 准教授 田所 治 (印)
	副査：	(印)
	副査：	(印)
	副査：	(印)
最終試験	実施年月日	2015 年 4 月 23 日
	試験方法	口答 ・ 筆答
学位論文の要旨		
<p><b>目的：</b>免疫不全動物と免疫正常動物における骨再生動物モデルを作製し、それぞれにおける骨再生過程の類似点と違いについて理解する。</p> <p><b>材料と方法：</b>BALB/cAJcl マウスの下腿長管骨を摘出し、酵素処理および explant culture にて接着性の細胞を得た。2 継代目の細胞を担体として <math>\beta</math>-TCP 顆粒上に播種し、2 週間骨分化誘導培地にて培養を行い、培養骨を作製した。得られた培養骨を、全身麻酔下でそれぞれオス BALB/cAJcl および BALB/cAJcl-nu/nu の背部皮下に埋入した。埋入後 1, 2, 4, 8 週後に摘出し、解析を行った。摘出組織は 2 分割し、一方は直ちに液体窒素中で凍結し、total RNA を抽出した。定量的 PCR にて遺伝子発現を解析した。もう一方は中性ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋、薄切の後、ヘマトキシリン-エオシン (H-E) 染色、TRAP 染色および免疫組織化学的染色を行った。</p> <p><b>結果：</b>細胞移植 1 週後のヘマトキシリン-エオシン染色において、BALB/cAJcl 群では炎症性細胞浸潤が著明であった。また、BALB/cAJcl-nu/nu 群と比較して、TNF-<math>\alpha</math> と IL-4 は高発現であった。細胞移植 4 週後において、BALB/cAJcl-nu/nu 群 では BALB/cAJcl 群と比較して有意に再生骨の面積は広く、TRAP 陽性細胞数も多かった。その後 4 週から 8 週にかけて新生骨の面積は徐々に減少した。</p> <p><b>考察：</b>本研究から、免疫不全動物のみでなく、免疫正常動物においても培養骨による骨形成が認められた。しかしながら、早期の骨形成過程には差が認められ、サイトカインの発現の違いが影響した可能性が示唆された。本研究の結果は、骨再生の in vivo モデルを使用する上で考慮すべき結果と考えられた。</p>		

学位論文審査結果の要旨

免疫系細胞が骨形成や骨吸収と密接な関連を持っている事は良く知られている。しかし、T 細胞などによる免疫応答が培養骨の骨再生過程にどのような影響を与えているか不明な点が多い。本研究は、ティッシュエンジニアリングによる培養骨を免疫不全動物と免疫正常動物にそれぞれに移植し骨再生過程における局所の炎症や免疫応答を比較検討し、骨再生メカニズムに免疫系細胞がどのような関与をしているのか解明しようとしたものである。

免疫正常動物では術後 1 週間から移植部周辺で炎症細胞の浸潤が認められ、TNF- $\alpha$  と IL-4 の高い発現が認められた。一方、免疫不全動物では術後 4 週に新生骨量と TRAP-positive cells の増大が認められたが、術後 8 週には共に減少し免疫正常動物のそれと同様になった。

以上の結果より、免疫不全動物と免疫正常動物両者において培養骨による骨再生が可能である事を示したが、両者の骨再生過程ではサイトカイン(特に IL-4 と TNF- $\alpha$ )の発現に差異が認められ、T 細胞あるいはマクロファージなどの免疫系細胞が培養骨の骨再生過程に重要な役割りを果たしている事を示唆した。

本研究は骨再生過程の免疫系細胞の関与を明らかにしただけでなく、臨床応用における骨再生治療効果の改善にも期待される優れた論文であり、学位論文に値するものである。

なお、本論文は「Comparing immuno-competent and immuno-deficient mice as animal models for bone tissue engineering」と言うタイトルで 2015 年発行の Oral Diseases に掲載予定のものである。Oral Dis. 2015 Feb 4. doi: 10.1111/odi.12319. [Epub ahead of print].

最終試験結果の要旨

申請者の学位論文「Comparing immuno-competent and immuno-deficient mice as animal models for bone tissue engineering」を中心に、本研究に関する基礎知識、論文内容、研究成果さらに、今後の展開などについて口頭による試験を行った。

質問内容は以下のようなものである。

(佐原教授)

1. 骨芽細胞の apoptosis について実験で確認したか。
2. IL-4 陽性細胞およびマクロファージの分布と数について。
3. 皮質骨由来の細胞ではなく骨髄間質細胞 (MSC) を用いた場合には結果に違いがあるか。

(小林教授)

1. IL-4 および TNF- $\alpha$  陽性細胞はどのような細胞と考えられるか。
2. 移植された骨芽細胞の移植後の生存率に違いはあったか。
3. IL-4 は骨芽細胞に直接作用したと考えられるか。
4. IL-4 が破骨細胞数に影響を与えるメカニズムについて。

(田所准教授)

1. 移植実験において感染の影響があったかどうか。
2. 本研究では S P F マウスを用いて清潔な環境で行われているが、清潔ではない通常的环境下で行ったとしたらどのような影響があると考えられるか。
3. 本研究の結果を将来の骨再生の治療にどのように応用できると考えるか。
4. 免疫不全マウスで 1 週から 2 週にかけて急激に TRAP 陽性細胞数が増加するメカニズムについて。

上記の全ての質問に対し、申請者は最新の文献的知見も踏まえ適切に回答した。また申請者は、実験により得られた結果に対して適切な考察が行える専門知識を有しており、博士課程修了者としての十分な学力及び見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

判定結果

合格

不合格

備考

- 1 学位論文名が外国語で表示されている場合には、日本語訳を ( ) を付して記入すること。
- 2 学位論文名が日本語で表示されている場合には、英語訳を ( ) を付して記入すること。
- 3 論文審査委員名の前に、所属機関・職名を記入すること。