

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

竹内 祥子

論文題目

骨芽細胞の石灰化に対するアシドーシスの影響

I. 緒言

骨組織はリモデリングと呼ばれる機構により骨改築が繰り返され、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により骨量が恒常的に維持されている。しかし、骨組織の炎症等による局所のアシドーシスは、骨芽細胞における石灰化の抑制と破骨細胞の活性化により骨吸収を引き起こすことも知られている。また、アシドーシス等の pH 変動には、NF- κ B と同様にストレス応答性の転写因子である AP-1(activator protein-1)の発現が関わっている可能性が指摘されている。

AP-1 は骨芽細胞や破骨細胞に発現が認められ、骨芽細胞の増殖と分化を制御し、破骨細胞では RANK(receptor activator NF- κ B ligand)-RANKL (RANK ligand)による破骨細胞の分化を調節するなど、骨組織の生理的機能に重要な役割を担っていることが知られている。近年、骨芽細胞の産生する OPG(osteoprotegerin)や RANKL 発現が破骨細胞に与える影響について明らかにされているが、骨芽細胞自身に対する OPG と RANKL の作用は未だ明らかにされていない。

本研究は、アシドーシスがヒト骨芽細胞の石灰化に与える影響および転写因子の AP-1 やサイトカインの OPG との関連を明らかにすることを目的とし、骨芽細胞の石灰化に対するアシドーシスの影響を、長期間の培養実験に適した呼吸性アシドーシスを用いて、分子生物学的に検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

ヒト正常骨芽細胞 (SaM-1 細胞 ; ヒト尺骨由来) およびマウス骨芽細胞 (C57BL/6J の頭蓋骨由来) を実験に用いた。出生直後の C57BL/6J の取り扱い「愛知学院大学歯学部実験動物指針」に従った。

2. 細胞培養

SaM-1 細胞および新生マウス骨芽細胞の培養液には、10 % FCS 添加した α -MEM を使用した。石灰化を促進させるため、50 μ g/ml アスコルビン酸と 5 mM の β -グリセロリン酸を添加した培養液 (石灰化培養液) を用いた。アシドーシスは、CO₂ 濃度を通常 5 % から 10 % に変更して培養することにより惹起した。このアシドーシス (呼吸性アシドーシス) による pH の実測値は、培養 16 時間後で 7.03 ± 0.03 (n=12) であった。また、短期の実験で、HCl 添加によるアシドーシス (代謝性アシドーシス) も用いたが、添加直後に 6.9 の pH を示した。

3. 石灰化形成の測定

石灰化部を von Kossa 染色後に NIH Image を用いて、石灰化面積 (%) を計測した。

4. RT-PCR による mRNA の分析

SaM-1 細胞を 70 % コンフルエントまで培養した後、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) 法にて total RNA を抽出し、遺伝子発現を RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

法にて解析した。

5. OPG 産生の分析

培養液中に分泌された OPG タンパク質をサンドイッチ ELISA 法を用いて定量した。

6. 遺伝子発現の抑制実験

c-Jun siRNA、OPG siRNA およびそれぞれの negative control の siRNA をトランスフェクション試薬 (Lipofectamine 2000) にて形質導入した。

7. 統計上の分析

得られた実験データは平均値±標準誤差で示した。ANOVA、Student の *t* 検定、または post-hoc Bonferroni 検定を用いて統計的有意差を判定した。

III. 結果

1. ヒト骨芽細胞の石灰化におけるアシドーシスの効果

SaM-1 細胞を石灰化培養液にて培養し、アシドーシスの効果を調べた。アシドーシスはヒト骨芽細胞において石灰化培養液により誘導される石灰化促進作用を著しく抑制した。

2. ヒト骨芽細胞の mRNA 発現におけるアシドーシスの効果

ヒト骨芽細胞におけるアシドーシスの石灰化抑制機構を解析するため、SaM-1 細胞における転写因子 (c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2、c-Jun、JunB、JunD、Egr-1) と骨由来遺伝子 (OPG、RANK、RANKL、COLA1A(α-1 type 1 collagen)、ALP(alkaline phosphatase)) 発現に対するアシドーシスの影

響を検討した。アシドーシスは、ヒト骨芽細胞における c-Jun mRNA 発現を抑制するとともに、OPG mRNA 発現を促進した。さらに、HCl 添加のアシドーシスによる検討においても、c-Jun mRNA 発現は著しく抑制された。また、ヒト骨芽細胞は、OPG、RANK および RANKL の mRNA の恒常的な発現を示した。

3. ヒト骨芽細胞の OPG 産生におけるアシドーシスの効果

アシドーシスにより OPG mRNA の発現増加が見られたため、OPG タンパク質産生への影響も検討したが、遺伝子発現と同様に、アシドーシスは OPG タンパク質の発現を促進した。

4. ヒト骨芽細胞の OPG タンパク質産生における c-Jun siRNA の効果

ヒト骨芽細胞における c-Jun と OPG の関連性を検討する目的で、c-Jun siRNA による OPG タンパク質産生への影響を検討した。ヒト骨芽細胞における c-Jun mRNA の抑制は、OPG タンパク質の産生を増加した。

5. ヒト骨芽細胞の石灰化における c-Jun siRNA の効果

c-Jun mRNA 発現と OPG タンパク質産生に関連性が認められたので、c-Jun と石灰化との関連性を検討する目的で、c-Jun siRNA による石灰化への影響を検討した。c-Jun siRNA による c-Jun mRNA の抑制は石灰化を抑制した。

6. ヒト骨芽細胞の石灰化における OPG siRNA の効果

c-Jun siRNA により、OPG タンパク質が増加し、石灰化の抑制が認め

られたので、OPG と石灰化の関連性を検討した。ヒト骨芽細胞における OPG siRNA による OPG mRNA 発現の抑制は石灰化を促進した。

7. マウス骨芽細胞の石灰化における OPG タンパク質の効果

新生マウス骨芽細胞を石灰化培養液にて培養し、OPG タンパク質の石灰化に及ぼす影響を検討した。OPG タンパク質の添加は石灰化培養液による石灰化の促進作用を著しく抑制した。

IV. 考察

AP-1 は、Jun タンパク質と Fos タンパク質、または ATF タンパク質で構成されるヘテロ二量体であり、骨芽細胞や破骨細胞の生理的機能に重要な役割を担っている。アシドーシスとの関連では、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞における急性の代謝性アシドーシスが、Egr-1 と I 型コラーゲンの mRNA 発現を抑制することが報告されており、骨基質合成と AP-1 分子との関連が示唆されている。またヒト間葉系細胞における慢性の代謝性アシドーシスが、骨芽細胞への分化を抑制することも報告されている。本実験は、アシドーシスによる石灰化の抑制をヒト骨芽細胞において認めたのみならず、石灰化と AP-1(c-Jun)との関連性を強く示唆するものである。

一般に、OPG は骨、血管、骨芽細胞などに強く発現しており、RANKL-RANK システムを介した破骨細胞の分化や機能を抑制することがよく知られている。また、代謝性アシドーシスで骨芽細胞に誘導される RANKL が、成熟破骨細胞による骨の吸収を刺激し破骨細胞のアポトーシスを抑制する

ことも報告されている。本実験では、アシドーシスによるヒト骨芽細胞の OPG タンパク質産生の促進が骨芽細胞の石灰化を抑制し、さらにアシドーシスと同じように OPG タンパク質の添加が骨芽細胞の石灰化を抑制することを示している。また RANK-RANKL システムが *in vitro* で血管の石灰化を引き起こすことが報告されるなど、RANKL の新たな機能についても注目されおり、OPG が石灰化に関わる RANKL 作用の「おとり受容体」として作用している可能性を示唆している。

本研究ではヒト骨芽細胞を用い、石灰化を誘導する条件において、c-Jun mRNA 発現の抑制による OPG 産生促進が石灰化を抑制し、OPG mRNA 発現抑制が石灰化を促進することを見出している。また、新生マウス骨芽細胞における石灰化の過程においても、OPG タンパク質の添加が石灰化を著しく抑制することを認め、骨芽細胞の石灰化に OPG が関与することを明らかにしている。一方、ヒト骨芽細胞が、OPG、RANK および RANKL の mRNA 発現を恒常的に発現していたことから、OPG タンパク質が石灰化に関わる RANK-RANKL システムを抑制することにより、骨芽細胞の石灰化を抑制する可能性を示唆している。

IV. 結論

ヒトおよびマウス骨芽細胞において、アシドーシスが石灰化を抑制することを示し、その機構には c-Jun と OPG タンパク質が関与し、c-Jun の抑制と OPG タンパク質の産生促進を介している事を示した。すなわち、骨芽

(論文内容の要旨)

No. 7

愛知学院大学

細胞の石灰化が細胞外の OPG タンパク質濃度により影響を受けていること、骨芽細胞における OPG 産生には核内の AP-1 分子が強く関与していることを示している。さらに、この実験結果は、骨芽細胞における OPG が、従来から知られている破骨細胞形成の制御作用に加え、骨芽細胞自身の石灰化を制御する作用にも関わっている可能性を示した。

平成 25 年 12 月 18 日