

論文の内容の要旨

氏名：中 井 久美子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：アンジオテンシン II が骨芽細胞の細胞外マトリックスタンパク代謝調節および石灰化物形成に及ぼす影響

高血圧は、高血糖および血中脂質異常とともにメタボリックシンドロームの判定要因の一つとして捉えられ、血管疾患のリスク因子となることが知られている。最近、高血圧症が骨粗鬆症のリスク因子となることや、炎症性骨吸収を主症状とする成人性歯周炎の罹患者では健常者に比べて収縮期血圧が高いことが疫学研究で明らかにされ、高血圧症と骨代謝の関連性は重視されている。

アンジオテンシン (angiotensin; Ang) II は、Ang II type 1 (AT₁) および Ang II type 2 (AT₂) 受容体を介して、細胞外液量と血圧の調節に関与する生理活性物質である。Ang II を標的にした薬剤は、血圧降下だけでなく骨量の増加にも有効であることが報告されており、骨代謝における Ang II の役割が注目されている。

正常な骨組織では、骨リモデリングにおける骨形成と骨吸収の均衡が厳密に調節され、恒常性が維持されている。しかし、骨粗鬆症や炎症性骨吸収などの骨疾患では、この均衡が崩れて骨吸収系に傾くことで骨組織の破壊が進行する。骨芽細胞は高い alkaline phosphatase (ALPase) 活性を有し、I 型コラーゲン、bone sialoprotein (BSP)、osteopontin (OPN) および osteocalcin (OCN) などの細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) タンパクを多く産生し、骨形成において中心的な役割を担っている。また、骨芽細胞は、matrix metalloproteinases (MMPs) および plasminogen activators (PAs) などの ECM タンパク分解酵素と、これらの内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) および plasminogen activator inhibitor (PAI) を産生し、骨組織の osteoid 層における ECM タンパク代謝を調節している。さらに、骨芽細胞は、破骨細胞分化促進因子である receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) とその decoy 受容体を産生して、破骨細胞の分化を調節している。

Ang II が骨代謝に影響するメカニズムとしては、Ang II が破骨細胞に直接作用して、あるいは骨芽細胞の RANKL 産生増加を介して破骨細胞による骨吸収を促進することが報告されている。しかし、骨芽細胞による ECM タンパク代謝に及ぼす Ang II の影響は調べられていない。著者は、Ang II は、骨芽細胞の RANKL 産生を増加させるだけでなく、ECM タンパク分解酵素とそれらの内因性阻害剤の発現にも影響することで、骨代謝とくに ECM タンパク代謝を分解系に傾けるのではないかと考えた。

そこで本研究の第 1 章では、骨芽細胞による osteoid 層の ECM タンパク代謝を想定し、骨芽細胞のモデルとしてラット骨肉腫由来株化骨芽細胞である ROS17/2.8 細胞を用いて、Ang II が ROS17/2.8 細胞の増殖、ALPase 活性、AT₁ および AT₂ 受容体、MMPs および PAs とそれらの阻害剤である TIMPs および PAI-1 の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、Ang II 刺激で、ROS17/2.8 細胞の増殖、MMP-3 および MMP-13 の発現は増加し、ALPase 活性は低下した。一方、MMP-2、MMP-9、MMP-14、tissue-type PA (tPA)、urokinase-type PA (uPA)、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 および PAI-1 の発現は Ang II 刺激の影響を受けず、MMP-1 と TIMP-4 の発現は Ang II 刺激の有無に関わらず検出されなかった。さらに、Ang II 刺激で誘導される MMP-3 および MMP-13 の発現増加は AT₁ 受容体拮抗剤 losartan で抑制されたが、AT₂ 受容体拮抗剤 PD123319 はこれらの発現増加に影響しなかった。次に、Ang II 誘導性の MMP-3 および MMP-13 発現増加に関与する細胞内シグナル伝達経路を調べるために、ROS17/2.8 細胞内の mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路に及ぼす Ang II の影響を調べた。その結果、Ang II 刺激で extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2、p38 MAPK および stress-activated protein kinases/c-jun N-terminal kinases (SAPK/JNK) のリン酸化が増加した。また、Ang II 刺激で誘導されるこれらのリン酸化の増加は losartan で、Ang II 刺激で誘導される MMP-3 および MMP-13 の発現増加は

ERK1/2 および SAPK/JNK の特異的リン酸化阻害剤である PD98059 および SP600125 で、それぞれ完全に抑制された。なお、p38 MAPK 特異的リン酸化阻害剤 SB20358 は、ROS17/2.8 細胞の増殖を著しく抑制した。

以上の結果から、Ang II は、骨芽細胞の AT₁ 受容体に結合して MAPK シグナル伝達経路を活性化させ、MMP-3 および MMP-13 の産生増加を誘導することが明らかになった。

骨芽細胞の分化は、そのプロセスにおけるさまざまな段階において、複数の転写因子によって調節されている。Runx2 と Osterix は、膜性骨化と軟骨内骨化のいずれにおいても不可欠な転写因子である。また、Msx2 や Dlx5 などの骨に非特異的な転写因子も骨芽細胞の分化を促進する。一方、Aj18 は骨芽細胞の分化を抑制する転写因子である。Ang II は、ラット胎児頭蓋冠由来骨芽細胞の ALPase 活性と OCN 発現を低下させたと報告されており、著者も第 1 章において、Ang II が ROS17/2.8 細胞の ALPase 活性を低下させることを確認した。しかし、骨芽細胞の分化に関与する転写因子や、OCN 以外の ECM タンパクの発現に及ぼす Ang II の影響については調べられていない。

そこで第 2 章では、Ang II が ROS17/2.8 細胞の転写因子とコラーゲン性および非コラーゲン性の ECM タンパク発現に及ぼす影響を検討した。また、ROS17/2.8 細胞による石灰化物形成と、それに含まれるカルシウム蓄積量に及ぼす Ang II の影響についても併せて検討した。その結果、Ang II 刺激で Runx2, Msx2 および OCN の発現は低下し、Aj18 の発現は増加した。なお、Osterix, Dlx5, I 型コラーゲン, BSP および OPN の発現には Ang II 刺激の影響は認められなかった。また、石灰化物形成とそれに含まれるカルシウム量は Ang II 刺激で減少した。さらに、losartan は、Ang II 刺激による Runx2, Msx2 および OCN の発現低下と Aj18 の発現増加を完全に抑制した。

以上の結果から、Ang II は、ROS17/2.8 細胞の AT₁ 受容体に結合し、Runx2 および Msx2 発現を減少させる一方で Aj18 発現を増加させ、骨芽細胞分化を抑制すると考えられた。さらに、Ang II は ALPase 活性と OCN 発現を低下させて、ROS17/2.8 細胞の石灰化物形成を抑制することが示唆された。

第 1 章および第 2 章で得られた結果から、Ang II は、骨芽細胞の AT₁ 受容体と MAPK シグナル伝達経路を介して MMP-3 と MMP-13 の産生を増加させ、ECM タンパク代謝を分解系に傾けることが明らかになった。また、Ang II は、骨芽細胞の分化を促進する転写因子 Runx2 と Msx2 の発現低下と分化を抑制する転写因子 Aj18 の発現増加を介して骨芽細胞分化を抑制し、ALPase 活性と OCN 発現を低下させて石灰化物形成を抑制することが明らかとなった。