

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 磯 川 桂太郎 ㊞

（副査） 教授 鈴木 直 人 ㊞ 教授 高 橋 富 久 ㊞

教授 前 野 正 夫 ㊞

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 (AT<sub>1</sub>) および Ang II type 2 (AT<sub>2</sub>) 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、骨粗鬆症や歯周炎などの炎症性骨吸収を伴う骨疾患では、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 タンパクの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。一方、骨芽細胞分化は、種々の転写因子 (Runx2, Osterix, Msx2, Dlx5 および AJ18) によって調節されている。

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 タンパクの代謝に及ぼす Ang II の影響は調べられていない。また、骨芽細胞分化に関与する転写因子や 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、本論文の著者は、骨芽細胞による ECM タンパクの代謝調節、骨芽細胞分化および石灰化物形成に及ぼす Ang II の影響を細胞および分子生物学的に明らかにするために本研究を企画した。

本研究の第 1 章では、骨芽細胞による osteoid 層の ECM のタンパクの代謝を想定し、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、AT<sub>1</sub> および AT<sub>2</sub> 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。また、第 2 章では、骨芽細胞分化に関連する転写因子と ECM タンパクの発現、および *in vitro* での石灰化物形成に及ぼす Ang II の影響を調べた。

その結果、以下の結果および結論を得ている。

1. Ang II 刺激で ALPase 活性は有意に低下し、細胞増殖は有意に促進された。AT<sub>1</sub> および AT<sub>2</sub> 受容体の発現には、Ang II 刺激の影響は認められなかった。
2. Ang II 刺激で MMP-3 および MMP-13 の発現は増加した。一方、AT<sub>1</sub> および AT<sub>2</sub> 受容体、MMP-2、MMP-9、MMP-14、urokinase-type PA、tissue-type PA、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、PAI-1 の発現には Ang II 刺激の影響は認められず、MMP-1 と TIMP-4 の発現は検出されなかった。

3. Ang II 刺激で ERK1/2, p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化は有意に増加した。
4. Ang II 誘導性の MMP-3 および MMP-13 の発現増加は, AT<sub>1</sub> 受容体拮抗剤, ERK1/2 および SAPK/JNK のリン酸化阻害剤で有意に抑制されたが, AT<sub>2</sub> 受容体拮抗剤の影響は認められなかった。
5. p38 MAPK のリン酸化阻害剤は細胞増殖を著しく抑制した。
6. Ang II 誘導性の ERK1/2, SAPK/JNK および p38 MAPK のリン酸化の増加は, AT<sub>1</sub> 受容体拮抗剤で有意に抑制された。
7. Ang II 刺激で AJ18 発現は増加したが, Runx2 および Msx2 の発現は減少し, Osterix および Msx2 の発現には Ang II 刺激の影響は認められなかった。
8. Ang II 刺激で OCN 発現は減少した。一方, 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。
9. Ang II 刺激で石灰化物形成および石灰化物中のカルシウム蓄積量は減少した。
10. AT<sub>1</sub> 受容体拮抗剤は, Ang II 誘導性の Runx2, Msx2 および OCN の発現減少と AJ18 の発現増加を有意に抑制した。

以上の結果から, Ang II は, 骨芽細胞の AT<sub>1</sub> 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 タンパクの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 の発現低下および分化を抑制する転写因子 AJ18 発現の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。

以上のように, 本研究は, 歯周炎の罹患者では健常者に比べて収縮期血圧が高いという疫学研究報告を根拠に, 高血圧症の患者における骨代謝を想定して, 骨芽細胞による ECM タンパクの代謝調節, 骨芽細胞分化および石灰化物形成に及ぼす Ang II の影響を細胞および分子生物学的手法を用いて明らかにしたもので, 歯科基礎医学とくに骨代謝領域の研究発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は, 博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 26 年 3 月 5 日