

論文の内容の要旨

氏名：西川 洋一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：骨細胞は gap junction を介して前骨芽細胞の終末分化を促進する

多細胞生物における細胞間情報伝達機構の一つに、隣接する細胞の細胞質をつなぐ gap junction がある。これまでに、マウス頭蓋骨において、骨細胞間および骨細胞と骨芽細胞の間に gap junction が存在することが報告されている。また、gap junction 構成タンパク質の1つをコードするコネキシン43遺伝子のノックアウトマウスでは、軟骨内骨化および膜内骨化が遅延する。さらに、このマウスから単離した頭蓋骨の骨芽細胞では、その成熟に伴って進行する osteocalcin (OCN), bone sialoprotein (BSP), I型コラーゲンなどの骨芽細胞マーカーの発現量の増加が遅延する。これらの報告から、gap junction を介した細胞間情報伝達が、骨芽細胞分化において重要な役割を果たすことが示唆される。しかし、骨細胞が gap junction を介して骨芽細胞やその前駆細胞（前骨芽細胞）の終末分化や関連遺伝子の発現を制御していることを明確に示す報告はなく、その詳細は不明である。そこで、本研究では、骨細胞と前骨芽細胞の共培養システムを用いて、骨細胞による前骨芽細胞の終末分化誘導機構を解析した。

骨細胞および前骨芽細胞として MLO-Y4 細胞および MC3T3-E1 細胞をそれぞれ用いた。MLO-Y4 細胞は、OCN プロモーターの制御下に T 抗原遺伝子をもつ組み換えマウスの大腿骨から単離された細胞で、骨細胞様の表現型を示す。一方、MC3T3-E1 細胞はマウスの正常骨組織由来の細胞株である。共培養後の MC3T3-E1 細胞の分取を可能にするため、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を恒常的に発現する MC3T3-E1 細胞 (E1-GFP 細胞) を樹立し、この細胞を実験に用いた。E1-GFP 細胞と MLO-Y4 細胞を共培養した後に、フローサイトメーターを用いて GFP の発現を指標に E1-GFP 細胞を分取し、骨芽細胞分化関連因子の発現量および石灰化に対する影響について解析した。さらに、両細胞間における gap junction の有無およびその役割について、パッチクランプ法および gap junction 形成阻害剤を用いて検討した。

共培養後の E1-GFP 細胞は、骨芽細胞マーカーである alkaline phosphatase (ALP) および BSP の mRNA 発現が増加し、アリザリンレッド S によって染色される石灰化 nodule の形成が亢進した。一方、骨芽細胞転写因子である Runx2, Osterix, Dlx5 および Msx2 の mRNA 発現レベルに有意な差は認められなかった。次に、共培養による ALP および BSP の発現誘導に対する MLO-Y4 細胞との直接的な接着の影響を非接触型共培養で検討した。非接触型共培養では、MLO-Y4 細胞と MC3T3-E1 細胞はフィルターによって隔てられているため、骨芽細胞分化誘導因子である bone morphogenetic protein (BMP) 2 や BMP4 などの液性因子によるシグナル伝達は可能である。しかし、MLO-Y4 細胞と非接触型共培養をおこなった E1-GFP 細胞では、ALP および BSP の顕著な発現の増加は認められなかった。さらに、BMP シグナル経路の関与を検討するために、BMP シグナルのセカンドメッセンジャーである Smad1, 5, 8 の活性レベルについて解析した。その結果、活性化 Smad1, 5, 8 の標的因子である Id-1 および Smad6 の mRNA 発現量に変化は認められなかった。また、BMP のアンタゴニストである Noggin を含む増殖培地で共培養をおこなっても、ALP および BSP の mRNA 発現の増加に変化は認められなかった。

非接触型の共培養では、ALP および BSP の mRNA 発現量は増加しなかったことから、これらの発現誘導には、MLO-Y4 細胞との直接的な接触が必要であることが示唆された。そこで、共培養された MLO-Y4 細胞と E1-GFP 細胞が gap junction を介して直接的に結合しているかをパッチクランプ法を用いて解析した。その結果、両細胞間に通電が認められ、細胞質が直接的に結合していることが示された。さらに、gap junction の形成を阻害する carbenoxolone および INI-0602 で MLO-Y4 細胞と E1-GFP 細胞をそれぞれ処理した後に共培養すると、ALP および BSP の mRNA 発現量の増加が顕著に抑制された。

本研究から、MLO-Y4 細胞との共培養によって、E1-GFP 細胞の ALP および BSP の mRNA 発現は増加し、石灰化が亢進することが示された。これらの結果は、E1-GFP 細胞の終末分化が促進されたことを示唆する。さらに、パッチクランプ法による解析と、gap junction の阻害剤を用いた実験から、MLO-Y4 細胞と MC3T3-E1 細胞の間には gap junction が存在し、この gap junction を介した細胞間コミュニケーションが E1-GFP 細胞の終末分化の亢進に必要であることが明らかになった。一方、Smad6 や Id-1、骨芽細胞転写因子の mRNA 発

現レベルに変化は認められず、Noggin を増殖培地に添加しても、ALP や BSP の発現量の増加に変化は見られなかった。さらに、非接触型共培養においても、ALP および BSP の発現量は増加しなかった。これらの結果から、MLO-Y4 細胞による E1-GFP 細胞の ALP および BSP の発現誘導は、BMP シグナル経路を介したのではなく、新規の骨芽細胞分化関連因子の関与が示唆された。