

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 米原 啓之

(副査) 教授 小宮山 一雄 教授 大木 秀郎

教授 鈴木 直人

細胞間の gap junction を介したコミュニケーションは、生体内の様々な組織形成において重要な役割を果たす。骨組織においては、骨細胞と骨細胞、あるいは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 の構成タンパク質の1つであるコネキシン 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。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。

著者は、骨細胞と前骨芽細胞の共培養システムを用いて、両細胞間のコミュニケーションが前骨芽細胞の終末分化に与える影響について解析を行った。実験には、骨細胞として MLO-Y4 細胞を、前骨芽細胞として MC3T3-E1 細胞をそれぞれ用いた。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、この細胞と MLO-Y4 細胞を共培養した。その後、フローサイトメーターを用いて E1-GFP 細胞を分取し、骨芽細胞関連因子の発現量および石灰化に対する影響を解析した。また、パッチクランプ法および gap junction 形成阻害剤を用いて、E1-GFP 細胞と MLO-Y4 細胞の共培養における gap junction の役割を検討した。

その結果、以下の結論を得た。

1. MLO-Y4 細胞と共培養した E1-GFP 細胞では、単独で培養した E1-GFP 細胞と比較して、骨芽細胞マーカーである ALP および BSP の mRNA 発現量が 300-400 倍に増加する。
2. 共培養する MLO-Y4 細胞の細胞比率が 30%~90% のとき E1-GFP 細胞の ALP および BSP の発現は高値である。
3. 共培養した E1-GFP 細胞では、骨芽細胞転写因子である Runx2, Osterix, Dlx5 および Msx2 の mRNA 発現量に変化は認められない。
4. MLO-Y4 細胞と共培養した E1-GFP 細胞では、アリザリンレッド S で染色される石灰化 nodule の形成が亢進する。
5. 細胞増殖および細胞周期の進行に対して、共培養による顕著な影響は認められない。
6. BMP シグナル活性化の指標となる Smad6 および Id-1 の mRNA 発現量の増加は認められない。
7. 共培養による E1-GFP 細胞の ALP および BSP の mRNA 発現量の増加は、BMP のアンタゴニストである Noggin の影響を受けない。
8. 非接触型の共培養では、ALP および BSP の mRNA の発現量は増加しない。
9. 隣接する MLO-Y4 細胞と E1-GFP 細胞間には通電が認められる。
10. Gap junction 形成阻害剤である carbenoxolon あるいは INI-0602 で MLO-Y4 細胞と E1-GFP 細胞をそれぞれ処理することによって、共培養による ALP および BSP の mRNA 発現量の増加は顕著に抑制される。

以上のことから、骨細胞と前骨芽細胞の間には gap junction が存在し、これを介して骨細胞は前骨芽細胞の終末分化を促進させることを示した。さらに、この終末分化誘導機構は、従来から骨芽細胞分化を誘導することが知られている BMP シグナル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。

本論文は、骨芽細胞分化に対する gap junction の役割を初めて明らかにしたものであり、骨芽細胞分化機構の理解に大きく貢献することが期待される。したがって、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27年3月11日