

論文の要約

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

多細胞生物では、各細胞系譜への分化において、隣接する細胞間、あるいは近傍に存在する細胞間のコミュニケーションが重要な役割を果たす。一方、細胞間の情報伝達には、電気的シグナル伝達、ホルモン・サイトカインなどの液性因子による伝達、隣接する細胞間の細胞質が直接つながる gap junction を介した伝達がある。骨芽細胞分化においては、これまでに、ホルモン・サイトカインなどの液性因子による制御機構について多くの研究が行われてきた。しかし、近年、マウス頭蓋骨において、骨細胞間、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た。さらに、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 を介した細胞間コミュニケーションが骨芽細胞分化において重要な役割を果たしていることが予想される。gap junction はコネキシンで構成されるヘミチャンネルが二つ並列する形で、隣接細胞との接触面（細胞膜）に形成される。イオン、代謝産物、cAMP や cADP リボースなどのセカンドメッセンジャー、あるいはイノシトール誘導体などの小分子は、gap junction を介して素早く隣接細胞に拡散し、これによって様々な情報が細胞間に伝達される。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）の終末分化や骨芽細胞分化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、これを解明する目的で、骨細胞と前骨芽細胞の共培養システムを用いて解析を行った。

本研究では、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。MC3T3-E1 細胞はマウスの正常骨組織由来の細胞株である。一方、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組織から単離された細胞株である。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 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、MLO-Y4 細胞と E1-GFP 細胞の共培養における gap junction を介した細胞間コミュニケーションの役割を検討した。

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 alkaline phosphatase (ALP) および BSP の mRNA 発現量が共培養時間に依存して増加した。しかし、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。また、MLO-Y4 細胞と共培養した E1-GFP 細胞を石灰化誘導培地で培養した結果、Alizarin Red S 染色陽性の石灰化 nodule の形成が、単独で培養した E1-GFP 細胞と比較して顕著に増加した。次に、この ALP および BSP の発現誘導に、MLO-Y4 細胞との直接的な接着が必要かどうかを検討するために、MLO-Y4 細胞と E1-GFP 細胞を非接触条件で共培養した。非接触型共培養では、両者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、この培養方法では、E1-GFP 細胞における ALP および BSP の顕著な発現の増加は認められなかった。また、MLO-Y4 細胞が BMP シグナル経路を介して E1-GFP の ALP および BSP の発現を誘導しているかを検討するために、BMP シグナルのセカンドメッセンジャーである Smads1, 5, 8 の活性レベルについて解析した。その結果、単独で培養した E1-GFP 細胞と同様に、MLO-Y4 細胞と共培養した E1-GFP 細胞において、活性化 Smads1, 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。さらに、BMP のアンタゴニストである Noggin を含む増殖培地で MLO-Y4 細胞と E1-GFP 細胞を共培養しても、E1-GFP 細胞の 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、次に、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。実験の結果、共培養中の E1-GFP 細胞と MLO-Y4 細胞の間に通電が認められた。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両者を共培養すると、E1-GFP 細胞の 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、MC3T3-E1 細胞の ALP および BSP の mRNA 発現が増加し、石灰化が亢進することが示された。これらの結果は、MC3T3-E1 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 形成阻害剤を用いた実験から、共培養した 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。また、MLO-Y4 細胞と共培養した E1-GFP 細胞においては、活性化 Smad1, 5, 8 の標的因子である Smad6 や Id-1, 骨芽細胞転写因子である Runx2 や Osterix などの mRNA 発現レベルに変化は認められなかった。さらに、BMP2 のアンタゴニストである Noggin を増殖培地に添加しても、ALP や BSP の発現量の増加には変化は見られず、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、BMP2 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る。