

骨芽細胞の細胞外マトリックスタンパク代謝と破骨
細胞分化の調節に及ぼす伸展力の影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

柄澤 瑤子

(指導：清水 典佳 教授，川戸 貴行 准教授，田中 秀樹 助教)

目 次

概 要	2
緒 言	4
材料および方法	6
成 績	9
考 察	19
結 論	23
謝 辞	24
引用文献	25
基幹論文	29

Karasawa et al. (2015) Int J Med Sci 12, 905-13.

概 要

歯科矯正治療において、歯に加える矯正力が歯槽骨のリモデリングを引き起こすことが知られている。すなわち、圧迫側では骨吸収が、牽引側では骨形成がそれぞれ優位となり、歯の移動が引き起こされる。骨芽細胞は高いアルカリフォスファターゼ活性を有し、コラーゲン性および非コラーゲン性の細胞外マトリックス (ECM) タンパクを産生して、骨形成の中心的な役割を担っている。また、骨芽細胞は、破骨細胞性骨吸収にも関与することが知られている。骨芽細胞は、破骨細胞の分化を促進する receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) や macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および RANKL の decoy 受容体である osteoprotegerin (OPG) を産生して、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化と成熟を調節する。さらに、骨芽細胞はタンパク分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) とその内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) を産生して、破骨細胞が骨表層に吸着するプロセスで重要となる osteoid 層の ECM タンパク分解にも関与する。

矯正力を想定して、伸展力 (TF) を骨芽細胞に負荷したこれまでの *in vitro* 研究においては、適度な TF 負荷がアルカリフォスファターゼ活性と ECM タンパク発現を増加させる一方で、過度な TF 負荷は、骨芽細胞による石灰化物形成を抑制することが報告されている。しかし、TF 負荷が骨芽細胞によって産生される ECM タンパク分解酵素とその内因性阻害剤、および破骨細胞分化調節因子の発現に及ぼす影響を調べた研究は少なく、その詳細は不明である。著者は、骨芽細胞の骨形成能を促進する適度な TF 負荷は、骨芽細胞による ECM タンパク分解や、骨芽細胞を介した破骨細胞分化誘導を抑制し、総じて骨吸収よりも骨形成が優位となるのではないかと考えた。

そこで、本研究では、骨芽細胞様細胞として MC3T3-E1 を用いて、骨形成機能を促進することが報告されている強度の TF 負荷が、MMPs および TIMPs 発現に及ぼす影響を調べた。その結果、TF 負荷によって、MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現が減少し、TIMP-2 および TIMP-3 発現は増加した。また、MMP-2 および MMP-14 発現、ならびに TIMP-1 および TIMP-4 発現には TF 負荷の影響

が認められなかった。

次に、TF 誘導性の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 の発現減少, ならびに TF 誘導性の TIMP-2 および TIMP-3 の発現増加に關与する細胞内シグナル伝達経路を明らかにするために, MC3T3-E1 内の mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達因子のリン酸化に及ぼす TF 負荷の影響を調べた。その結果, TF 負荷によって extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化が減少した一方で, stress-activated protein kinases/c-jun N-terminal kinases (SAPK/JNK) のリン酸化は増加したが, p38 MAPK のリン酸化には変化が認められなかった。また, ERK1/2 の特異的なリン酸化阻害剤である PD98059 は, MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現を抑制したが, TIMP-2 および TIMP-3 発現には影響しなかった。一方, SAPK/JNK の特異的なリン酸化阻害剤である SP600125 は, TF 誘導性の TIMP-2 および TIMP-3 の発現増加を完全にブロックしたが, TF 誘導性の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 の発現減少には影響しなかった。さらに, TF 負荷が MC3T3-E1 の破骨細胞分化調節因子の発現に及ぼす影響を検討するために, RANKL, M-CSF および OPG 発現を調べた。その結果, TF 負荷によって RANKL 発現は減少し, OPG 発現は増加したが, M-CSF 発現に変化は認められなかった。

以上の結果から, TF 負荷は, 骨芽細胞内の MAPK シグナル伝達経路を介して MMP-1, MMP-3 および MMP-13 の発現減少ならびに TIMP-2 および TIMP-3 の発現増加を誘導し, osteoid 層における ECM タンパク分解を抑制することが明らかとなった。また, TF 負荷は, 骨芽細胞による RANKL 発現減少ならびに OPG 発現増加を誘導し, 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を抑制する可能性が示唆された。

本論文は, International Journal of Medical Sciences に掲載された論文 (Karasawa et al. (2015) Tension force downregulates matrix metalloproteinase expression and upregulates the expression of their inhibitors through MAPK signaling pathways in MC3T3-E1 cells. Int J Med Sci 12, 905-13.) を基幹論文とし, これに TF 負荷が骨芽細胞の破骨細胞分化調節因子 (RANKL, M-CSF および OPG) の発現に及ぼす影響を調べた結果を加えて総括したものである。

緒 言

歯科矯正治療において、歯に加えた矯正力が歯槽骨に伝達され、骨リモデリングのバランスが変化することによって歯の移動が生じる (Roberts et al., 1981; Krishnan et al., 2006)。骨芽細胞は高いアルカリフォスファターゼ活性を有し、コラーゲン性および非コラーゲン性の ECM タンパクを産生して、骨形成の中心的な役割を担っている (Anderson, 1989; Robey et al., 1993; Mundlos et al., 1997)。また、骨芽細胞は、破骨細胞分化促進因子である RANKL および M-CSF と、破骨細胞分化抑制因子である OPG を産生して、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化と成熟を調整している (Maeno et al., 2013)。さらに骨芽細胞は、タンパク分解酵素とその内因性阻害剤を産生して、破骨細胞が骨表層に吸着するプロセスで重要となる osteoid 層の ECM タンパク分解にも関与する (Holliday et al., 1997; Zhao et al., 1999)。すなわち、骨芽細胞は、骨リモデリングにおける骨形成と骨吸収の両方において重要な役割を担っている。矯正力を想定して、メカニカルストレスを骨芽細胞に与えた *in vitro* 研究では、適度な圧迫力や TF 負荷は、骨芽細胞の骨形成因子の発現を誘導し (Mitsui et al., 2005; Shionome et al., 2012; Kariya et al., 2015)、一方、過度な圧迫力の負荷は、破骨細胞分化促進因子の発現を誘導したと報告されている (Koyama et al., 2008; Sanuki et al., 2010; Zhang et al., 2010)。しかし、TF 負荷が骨芽細胞の ECM タンパク分解酵素とその内因性阻害剤、ならびに破骨細胞分化調節因子の発現に及ぼす影響を調べた研究は少なく、その詳細は不明である。

骨芽細胞が産生する MMPs は中性の pH 領域で活性化され、osteoid 層のコラーゲン、プロテオグリカンおよび非コラーゲン性タンパクなどの ECM 分子を分解する (Malemud, 2006; Paiva et al., 2014)。MMP ファミリーは、その基質特異性、配列の相同性および領域構成に基づいて、コラゲナーゼ (MMP-1, MMP-8 および MMP-13)、ゼラチナーゼ (MMP-2 および MMP-9)、ストロムライシン (MMP-3, MMP-10 および MMP-11)、マトリライシン (MMP-7 および MMP-26)、膜型 MMP (MMP-14 および MMP-17) およびその他の MMP の 6 種のサブグル

ープに分類される (Egeblad et al., 2002; Nagase et al., 2006)。MMPs の酵素活性は, MMPs と TIMPs との相互作用によって調節される (Visse et al., 2003; Nagase et al., 2006)。哺乳類では 4 種類の TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 および TIMP-4) がクローン化されており, その一次構造と機能が解析されている (Olson et al., 1997; Yu et al., 2000; Huang et al., 2002)。また, 骨芽細胞, 軟骨細胞および滑膜細胞における MMPs と TIMPs の発現には, 細胞内の MAPK シグナル伝達経路が関与していることが知られている (Wang et al., 2009; Sondergaard et al., 2010; Nakai et al., 2013)。

そこで, 本研究では, 骨芽細胞による osteoid 層中の ECM タンパク分解ならびに破骨細胞分化調節における TF 負荷の影響を調べることを目的とし, 骨芽細胞様細胞として MC3T3-E1 に TF を負荷し, MMPs, TIMPs, RANKL, M-CSF および OPG 発現に及ぼす TF 負荷の影響を調べた。さらに TF 負荷が, MC3T3-E1 における ERK 1/2, p38 MAPK, SAPK/JNK のリン酸化に与える影響についても併せて検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

本研究には、骨芽細胞としてマウス頭蓋骨由来の細胞株 MC3T3-E1 を用いた。MC3T3-E1 の培養には、10% ウシ胎児血清 (FBS) と 1% ペニシリンーストレプトマイシン溶液を含む α -MEM を培養液として用いて、37°C、5% 炭酸ガス存在下で行った。

2. TF の負荷

Flexercell Strain Unit を用いて MC3T3-E1 に周期的な TF を負荷した。すなわち、MC3T3-E1 を表面が親水性の flexible-bottomed 6-well plates に播種し、Flexercell Strain Unit に設置後、コンピューター制御下で plate 底面を吸引し、底面の面積が 0, 4, 8 または 12% 増加する強度の TF を、6 cycles/min (5 sec strain, 5 sec relaxation) で 24 時間負荷した。なお、TF は、放射状および円周方向に均一であり (Vande et al., 2004)、その強度は、Flexercell Strain Unit を使用した先行研究 (Shimizu et al., 1995; Jacobs et al., 2013; Fushiki et al., 2015; Kariya et al., 2015) を基に決定した。コントロールは同一条件で flexible-bottomed plates に播種し TF 負荷を加えないものとした。

3. Real-time PCR

細胞から全 RNA を抽出し DNase 処理を施した後、逆転写酵素で mRNA から cDNA を作成し、SYBR Green I を用いて real-time PCR を行った。Table 1 に使用したプライマーの塩基配列を示す。遺伝子の増幅は Smart Cycler を用いて行い、結果の解析は Smart Cycler Software を用いて行った。すなわち、あらかじめ作成した検量線をもとに遺伝子の増幅量を求め、グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の増幅量で補正した値を mRNA 発現量とした。

4. SDS-PAGE および Western blotting

4~20% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、ゲル内のタンパ

クを PVDF 膜に転写した。Western blotting は、1 次抗体として抗 MMP-1, 抗 MMP-2, 抗 MMP-3, 抗 MMP-13, 抗 MMP-14, 抗 TIMP-1, 抗 TIMP-2, 抗 TIMP-3, 抗 TIMP-4, 抗 ERK1/2, 抗リン酸化 ERK1/2, 抗 p38 MAPK, 抗リン酸化 p38 MAPK, 抗 SAPK/JNK, 抗リン酸化 SAPK/JNK または抗 β -tubulin 抗体を用いた。また、2 次抗体としてはビオチン標識の各免疫動物に対する抗体を用いて行った。さらに、ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン溶液を加えた後、ECL を用いて化学発光反応を行い X 線フィルムに感光させた。タンパク発現の強さは、バンドの濃度を scanner と digital image analysis software を用いて測定し、 β -tubulin 発現量で補正して求めた。

5. MAPK リン酸化阻害剤処理

MC3T3-E1 の MMPs および TIMPs 発現に関与する MAPK シグナル伝達経路を検索するために、MC3T3-E1 を ERK 1/2 リン酸化阻害剤 PD98059 (10 μ M) あるいは JNK リン酸化阻害剤 SP600125 (1 μ M) で処理した。なお、TF を負荷する場合、リン酸化阻害剤による処理は TF 負荷の 1 時間前に行った。リン酸化阻害剤の濃度は、Nakai ら (Nakai et al., 2013) の報告を基に決定した。なお、real-time PCR による分析の前に、上記の阻害剤が細胞の形態と増殖に影響を及ぼさないことを確認した。

6. 統計学的分析

すべての実験は 3 回繰り返し、結果は平均値と標準偏差で表した。統計処理は、2 群の比較では Student *t* 検定を、3 群以上の比較では一元配置分散分析 (ANOVA) 後に Tukey の多重比較検定を用いて行い、危険率 5% 未満を統計的な有意差とした。

Table 1

PCR primer used in the experiments

Target	Forward primer	Reverse primer	Genbank acc no.
MMP-1	5'-CACATTGATGCTGCTGTTGTGA-3'	5'-TCTGCTGTTAATCTGGGATAACCTG-3'	NM_032006.3
MMP-2	5'-GATAACCTGGATGCCGTCGTG-3'	5'-GGTGTGCAGCGATGAAGATGATA-3'	NM_008610.2
MMP-3	5'-CTCATGCCTATGCACCTGGAC-3'	5'-TCATGAGCAGCAACCAGGAA-3'	NM_010809.1
MMP-13	5'-TCCCTGGAATTGGCAACAAAG-3'	5'-GCATGACTCTACAATGCGATTAC-3'	NM_008607.2
MMP-14	5'-GCAGTGGACAGCGAGTACCCTA-3'	5'-AGTCCCAGAGCTGACTTG-3'	NM_008608.3
TIMP-1	5'-CTATAGTCTGGCTGTGGGGTGTG-3'	5'-TTCCGTGGCAGGCAAGCAAAGT-3'	NM_001044384.1
TIMP-2	5'-GGCCTCCCTCCCTTACTCC-3'	5'-GACTTCATATTCCAGCACGCACAT-3'	NM_011594.3
TIMP-3	5'-CTAAGTCGGCTGTTTGGGTTGA-3'	5'-CAGCACAGCTGGCTTGCTAGA-3'	NM_011595.2
TIMP-4	5'-GCCTGAATCATCACTACCACCAGA-3'	5'-TGAGATGGTACATGGCACTGCATA-3'	NM_080639.3
RANKL	5'-CATGTGCCACTGAGAACCTTGAA-3'	5'-CAGGTCCCAGCGCAATGTAAC-3'	NM_011613.3
OPG	5'-CTGAACCAGACATGACAGC-3'	5'-CAATGGCTGGCTTGGTTTC-3'	NM_008764.3
M-CSF	5'-GAACAGCGTGTCCCATCCA-3'	5'-TGAGGCCAGCTCAGTGCAA-3'	NM_007778.4
GAPDH	5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'	5'-TGAAGGGTTCGTTGATGG-3'	NM_001289726.1

成 績

1. TF が MMPs と TIMPs の遺伝子発現に及ぼす影響

MC3T3-E1 に, 0 (コントロール), 4, 8 および 12% TF を 24 時間負荷し, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13 および MMP-14, ならびに TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 および TIMP-4 の遺伝子発現を調べた。MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現は, 4, 8 あるいは 12% TF 負荷でコントロールに比べて有意に減少した (Fig. 1A, C and D)。TF の強度間で MMP-1 および MMP-3 の発現減少の程度の違いは認められなかったが, MMP-13 発現は TF の強度に依存して減少した。なお, MMP-2 および MMP-14 発現に TF 負荷の影響は認められなかった (Fig. 1B and E)。

TIMPs 発現に及ぼす TF の影響は, MMPs とは相反していた。すなわち, TIMP-3 発現は 8% TF 負荷でコントロールと比較して有意に増加し, 12% TF 負荷でさらに増加した (Fig. 2C)。また, TIMP-2 発現は 12% TF 負荷でコントロールと比較して有意に増加した (Fig. 2B)。なお, TF 負荷は TIMP-1 および TIMP-4 発現に影響しなかった (Fig. 2A and D)。

2. TF が MMPs と TIMPs のタンパク発現に及ぼす影響

MC3T3-E1 に, 0 (コントロール) および 12% TF を 24 時間負荷し, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13 および MMP-14, ならびに TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 および TIMP-4 のタンパク発現を調べた。MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現は, 12% TF 負荷でコントロールに比べて有意に減少した (Fig. 3A, C and D) 一方で, TIMP-2 および TIMP-3 発現は有意に増加した (Fig. 4B and C)。なお, 12% TF 負荷は, MMP-2 および MMP-14 発現 (Fig. 3B and E), ならびに TIMP-1 および TIMP-4 発現 (Fig. 4A and D) に影響しなかった。すなわち, 成績 1 で示した MMPs および TIMPs の遺伝子発現に及ぼす TF 負荷の影響は, タンパク発現に及ぼす影響と一致した。

3. ERK1/2, p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化に及ぼす TF の影響

MC3T3-E1 に 12% TF を 12 および 24 時間負荷し, ERK1/2, p38 MAPK およ

び SAPK/JNK のリン酸化を調べた。TF 負荷前に比べて負荷 12 時間および 24 時間後で ERK1/2 のリン酸化は有意に減少し (Fig. 5A), SAPK/JNK のリン酸化は有意に増加した (Fig. 5C)。一方, TF 負荷は p38 MAPK のリン酸化に影響しなかった (Fig. 5B)。

4. ERK1/2 及び SAPK/JNK のリン酸化阻害剤が MMPs および TIMPs 発現に及ぼす影響

TF 負荷による ERK1/2 のリン酸化の抑制を再現するために ERK1/2 のリン酸化阻害剤 PD98059 で TF を負荷していない MC3T3-E1 を処理した。また, TF 負荷による SAPK/JNK のリン酸化の増加を抑制するために SAPK/JNK のリン酸化阻害剤 SP600125 で MC3T3-E1 を処理した後に TF を負荷して, MMP-1, MMP-3 および MMP-13, ならびに TIMP-2 および TIMP-3 の遺伝子発現を調べた。PD98059 処理は未処理 (コントロール) に比べて, MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現が有意に低下したが (Fig. 6A, B and C), TIMP-2 および TIMP-3 発現に PD98059 処理の影響は認められなかった (Fig. 6D and E)。また, SP600125 処理は, TF 誘導性の TIMP-2 および TIMP-3 の発現増加を抑制した (Fig. 7D and E)。一方, TF 誘導性の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 の発現減少は, SP600125 処理で抑制されなかった (Fig. 7A, B and C)。

5. TF が RANKL, OPG および M-CSF の遺伝子発現に及ぼす影響

MC3T3-E1 に, 0, 4, 8 および 12% TF を 24 時間負荷し, RANKL, OPG および M-CSF の遺伝子発現を調べた。RANKL 発現は, 8 および 12% TF 負荷でコントロールに比べて有意に減少し, OPG 発現は有意に増加した (Fig. 8A and B)。一方, M-CSF 発現に TF 負荷の影響は認められなかった (Fig. 8C)。

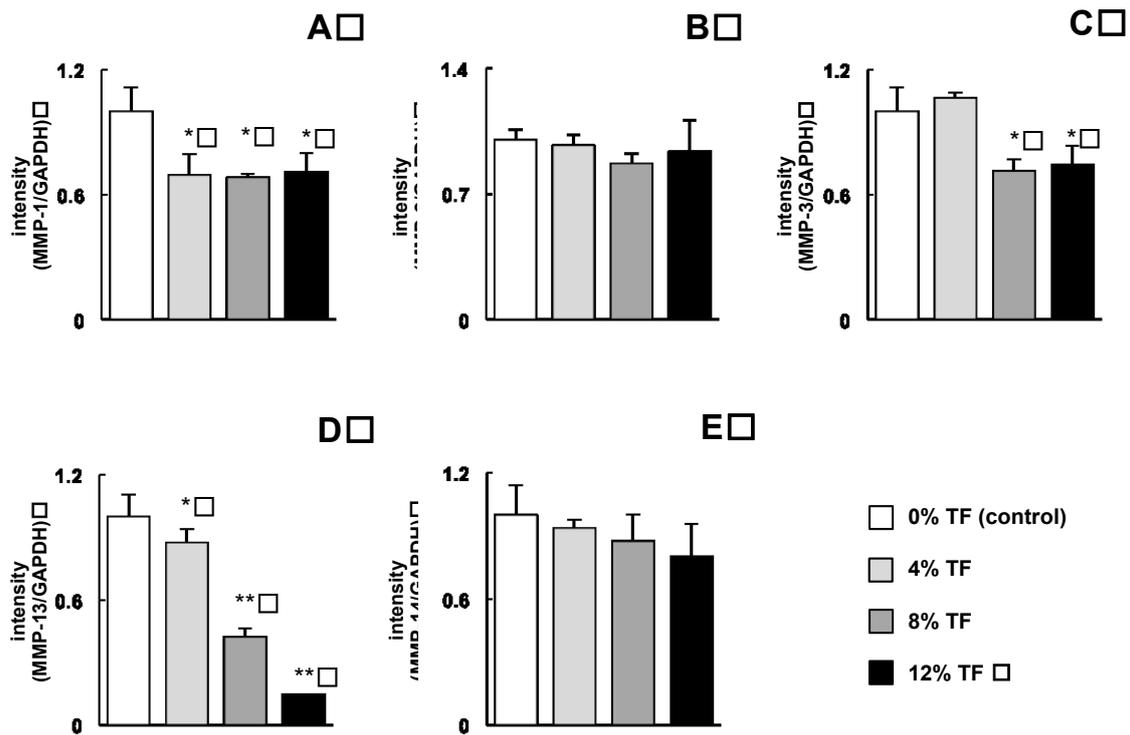


Fig. 1. Effect of TF on MMP mRNA expression.

MC3T3-E1 cells were subjected to 0 (control), 4, 8, or 12% TF for 24 hours, and the expression of MMP-1 (A), -2 (B), -3 (C), -13 (D) and -14 (E) was determined using real-time RT-PCR. Gene expression is described as the fold change relative to the control group. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (vs. control).

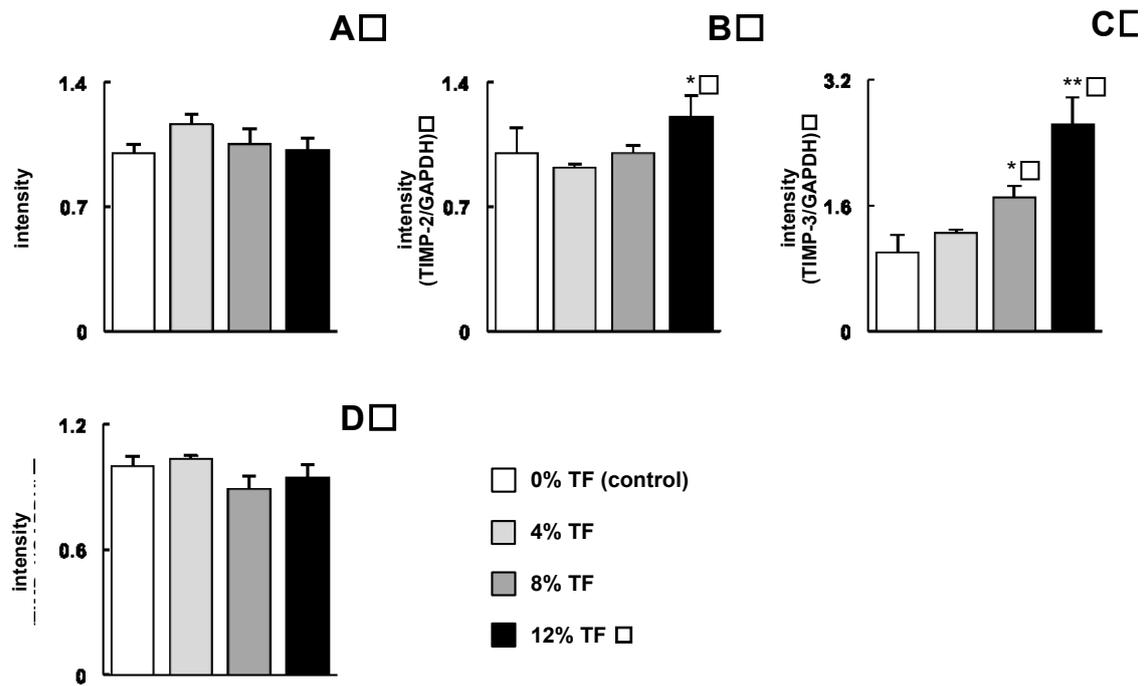


Fig. 2. Effect of TF on TIMP mRNA expression.

MC3T3-E1 cells were subjected to 0% (control), 4, 8, or 12% TF for 24 hours, and the expression of TIMP-1 (A), -2 (B), -3 (C) and -4 (D) was determined using real-time RT-PCR. Gene expression is described as the fold change relative to the control group. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (vs. control).

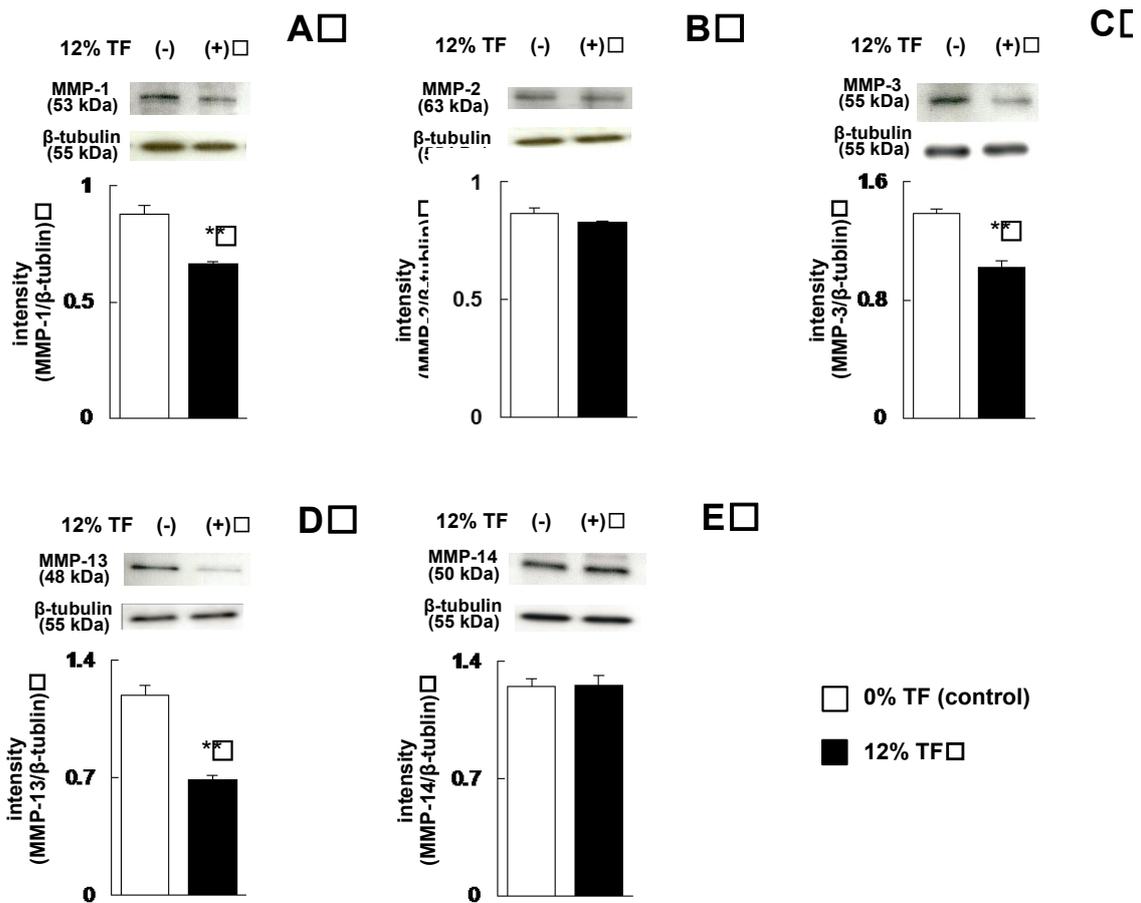


Fig. 3. Effect of TF on MMP protein expression.

MC3T3-E1 cells were subjected to 0% (control) or 12% TF for 24 hours, and the expression of MMP-1 (A), -2 (B), -3 (C), -13 (D) and -14 (E) was examined by Western blot analysis. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$ (vs. control).

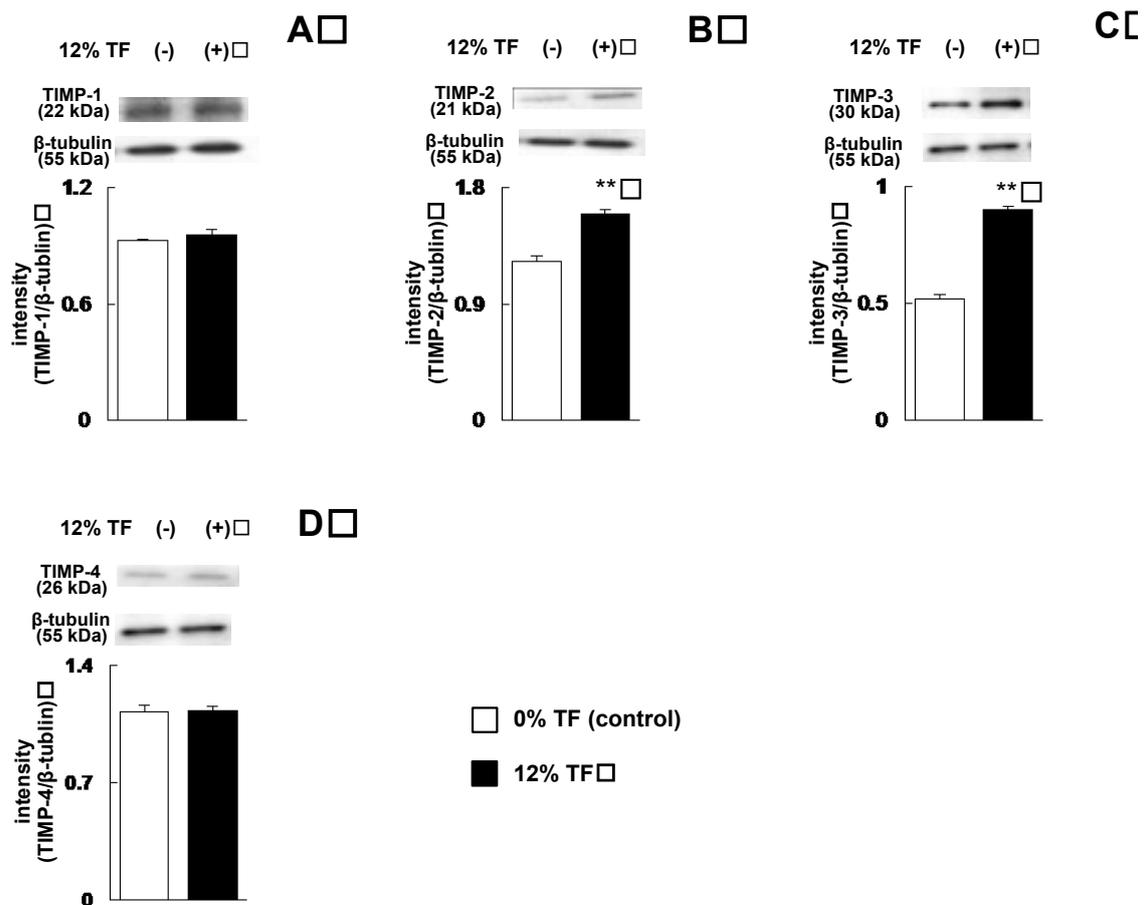


Fig. 4. Effect of TF on TIMP protein expression.

MC3T3-E1 cells were subjected to 0% (control) or 12% TF for 24 hours, and the expression of TIMP-1 (A), -2 (B), -3 (C), and -4 (D) was examined by Western blot analysis. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$ (vs. control).

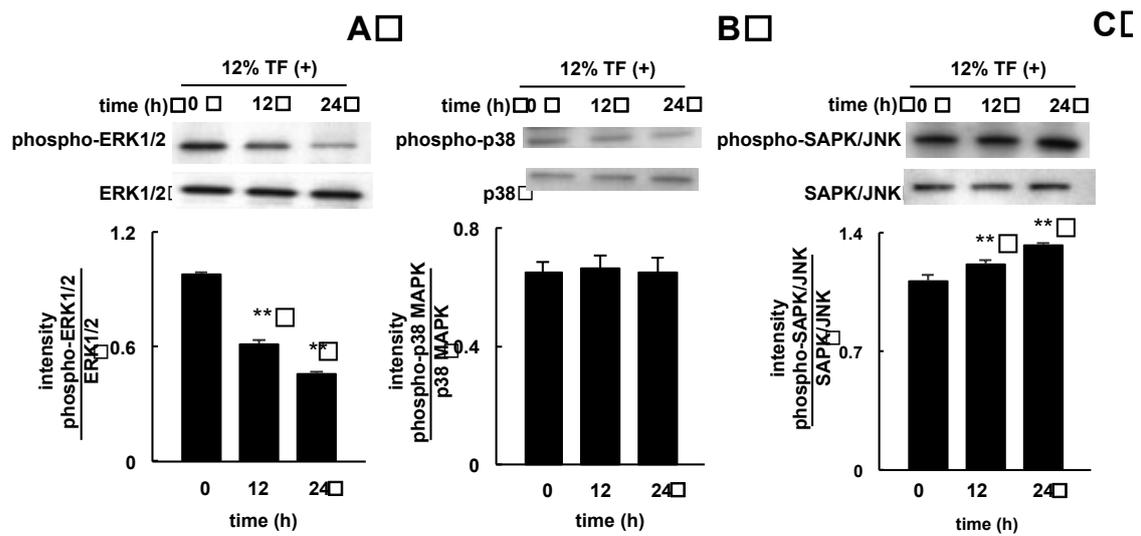


Fig. 5. Effect of TF on the phosphorylation of ERK1/2, p38 MAPK, and SAPK/JNK.

MC3T3-E1 cells were subjected to 12% TF for up to 24 hours, and the phosphorylation of ERK1/2 (A), p38 MAPK (B), and SAPK/JNK (C) was examined by Western blot at 0 (prior to TF application), 12, and 24 hours of culture. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$ (vs. control).

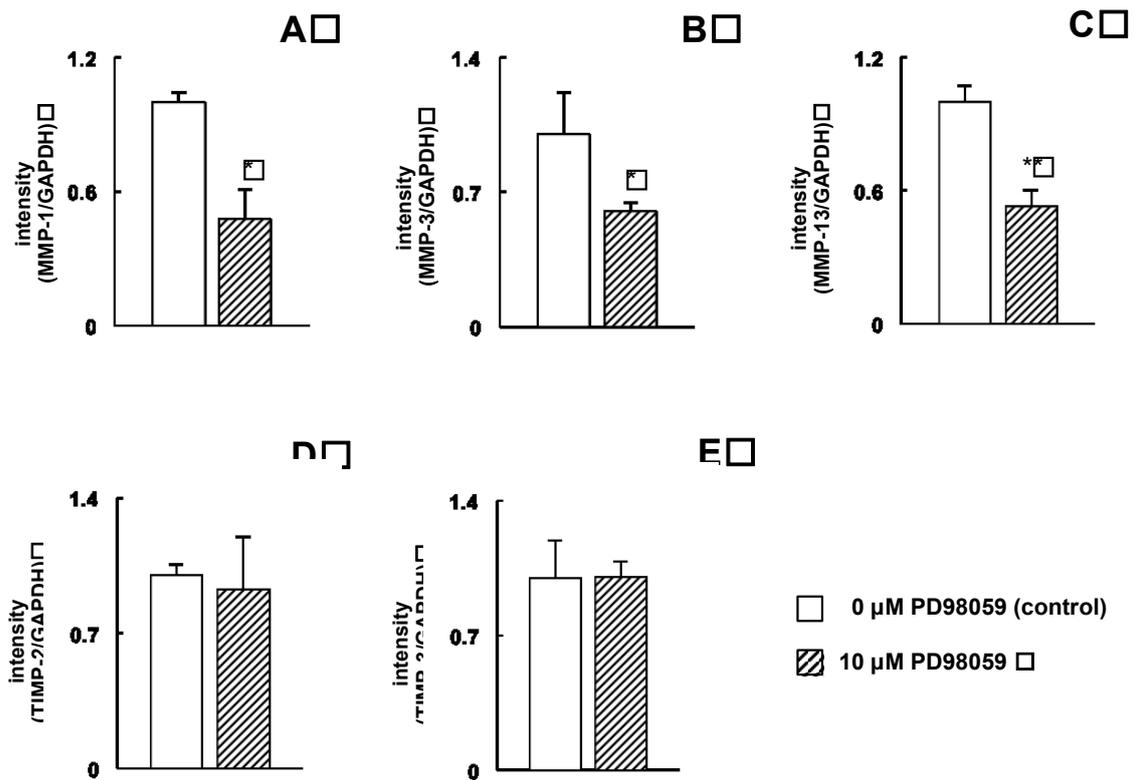


Fig. 6. Effect of PD98059 on MMP-1, -3 and -13 and TIMP-2 and -3 mRNA expression.

MC3T3-E1 cells were treated with or without 10 μM PD98059 (ERK inhibitor) for 24 hours, and the expression of MMP-1 (A), -3 (B), and -13 (C) and TIMP-2 (D) and -3 (E) was determined by real-time RT-PCR. The expression level is presented as the fold change relative to the control group. Each bar indicates the mean ± SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (vs. control).

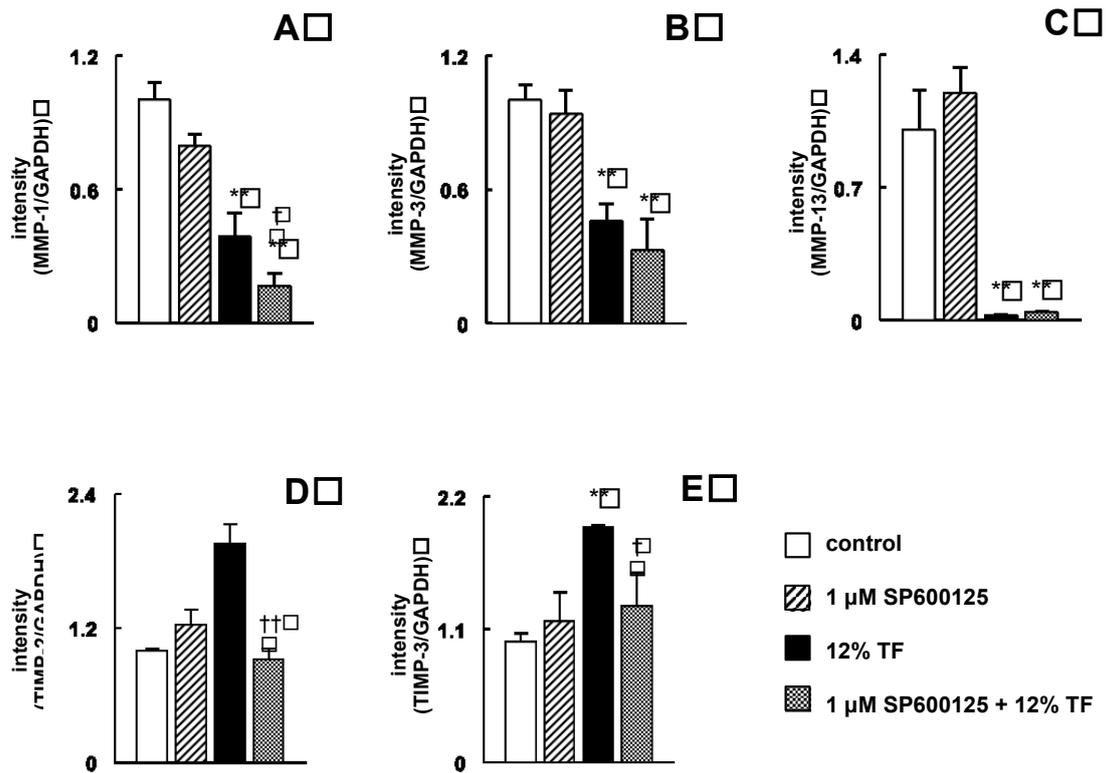


Fig. 7. Effect of SP600125 on TF-induced downregulation of MMP-1, -3 and -13 expression and upregulation of TIMP-2 and -3 expression.

MC3T3-E1 cells were pretreated with 10 μM SP600125 (JNK inhibitor) and then subjected to 0 (control) or 12% TF for 24 h. The expression of MMP-1 (A), -3 (B), and -13 (C) and TIMP-2 (D) and -3 (E) was determined by real-time PCR. The expression level is presented as the fold change relative to the control group. Each bar indicates the mean ± SD from three independent experiments. ***p* < 0.01 (TF vs. control), ††*p* < 0.01, †*p* < 0.05 (TF vs. TF plus 1 μM SP600125)

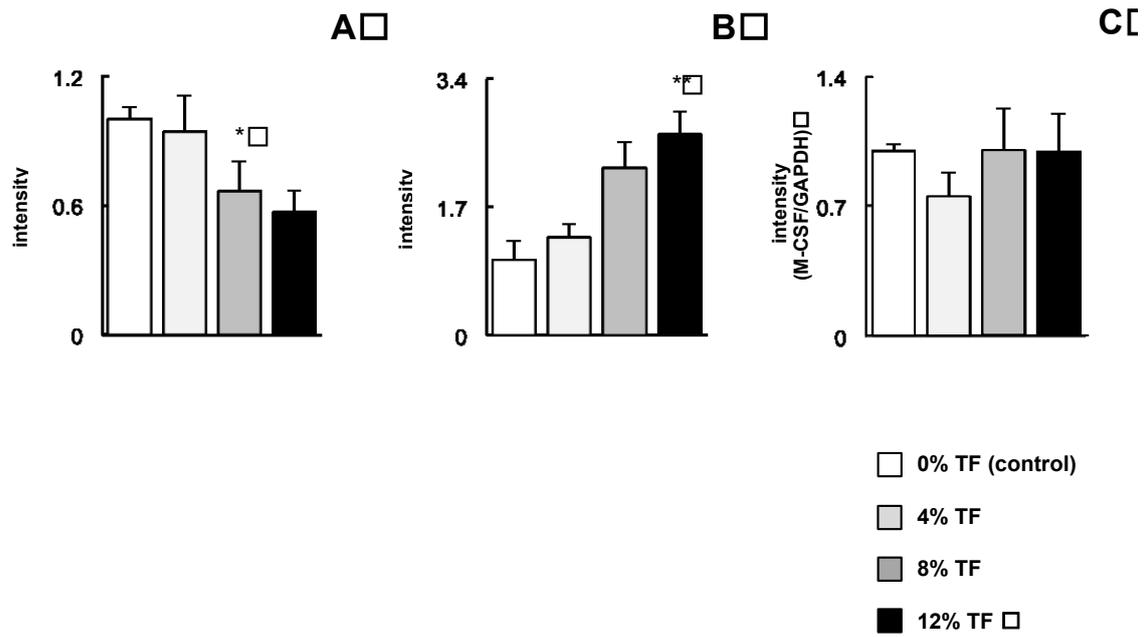


Fig. 8. Effect of TF on RANKL, OPG and M-CSF mRNA expression.

MC3T3-E1 cells were subjected to 0% (control), 4, 8, or 12% TF for 24 hours, and the expression of RANKL (A), OPG (B) and M-CSF (C) was determined using real-time RT-PCR. Gene expression is described as the fold change relative to the control group. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (vs. control).

考 察

適度な TF 負荷は, 骨芽細胞の骨形成機能を高める一方で, 過度な TF 負荷は, これを抑制することが知られている。具体的には, Jacobs ら (Jacobs et al., 2013) は, ヒト骨芽細胞の I 型コラーゲン発現およびアルカリフォスファターゼ活性は 5% TF 負荷で増加したが, 10% TF では減少したと報告している。また, Fushiki ら (Fushiki et al., 2015) は, ラット頭蓋冠より分離した細胞に 18% TF を負荷すると, 石灰化物形成量が減少したと報告している。さらに, Kariya ら (Kariya et al., 2015) は, MC3T3-E1 への 6 および 18% の TF 負荷で, 骨芽細胞分化に関連する転写因子である Runx2 と Osterix 発現が増加したことを, また, この TF 誘導性の Runx2 および Osterix の発現誘導は 18% TF 負荷より 6% TF 負荷で顕著であり, さらに, 6% TF 負荷はアルカリフォスファターゼ活性, ECM タンパク発現および石灰化物形成能も増加させたと報告している。

これらの報告に基づいて著者は, 骨芽細胞の骨形成機能を促進する適度な TF 負荷は, 骨芽細胞による ECM タンパク分解を抑制し, 総じて骨吸収よりも骨形成が誘導されるのではないかと考え, MC3T3-E1 への 4~12% TF 負荷が, MMPs および TIMPs 発現に及ぼす影響を調べた。その結果, TF 負荷によって, MC3T3-E1 の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現は減少し, TIMP-2 および TIMP-3 発現は増加した。MMP-1 および MMP-13 は主にコラゲナーゼとして働き, osteoid 層中で最も多量に存在する未変性の I 型コラーゲンの三重らせん構造を, 3:1 の長さの断片に分解する。また, MMP-3 はストロムライシン-1 として, プロテオグリカン, ゼラチンおよびその他の非コラーゲン性タンパクを分解する (Nagase et al., 2006; Paiva et al., 2014)。一方, TIMP-2 は MMP に, TIMP-3 は ECM タンパクにそれぞれ結合することで, MMPs の活性を阻害する (Visse et al., 2003; Nagase et al., 2006)。すなわち, 本研究結果から, TF 負荷は, 骨芽細胞による ECM タンパク分解過程を抑制すると考えられた。

様々な種類のメカニカルストレスが, 細胞内の MAPK シグナル経路を介して伝達されることが知られているが (Yang et al., 2004; Bandow et al., 2007; Kanno

et al., 2007; Yanagisawa et al., 2007; Yan et al., 2012; Mu et al., 2014), その全体像は明らかにされていない。本研究では, TF 負荷は, MC3T3-E1 の ERK1/2, p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化に, それぞれ異なる影響を及ぼした。すなわち, TF 負荷で ERK1/2 のリン酸化が抑制された一方で, SAPK/JNK のリン酸化は促進され, p38 MAPK のリン酸化は変化しなかった。MAPK の活性化に及ぼす TF (Yang et al., 2004; Kanno et al., 2007; Yan et al., 2012), 圧迫力 (Yanagisawa et al., 2007), 遠心力 (Mu et al., 2014) および超音波 (Bandow et al., 2007) の影響を調べたこれまでの研究では, これらのメカニカルストレスが, ERK1/2, p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化を誘導したと報告されている。一方, Jackson ら (Jackson et al., 2006) は, MC3T3-E1 に TF と流体剪断力を 1 日 1 時間, 5~30 日 負荷すると, ERK1/2 のリン酸化は減少したが, p38 MAPK のリン酸化は変化しなかったと報告している。さらに Matsuda ら (Matsuda et al., 1998) は, ヒト歯根膜細胞への 15~60 分間の TF 負荷は, SAPK/JNK のリン酸化を誘導したが, ERK1/2 と p38 MAPK のリン酸化には影響しなかったと報告している。すなわち, Jackson ら (Jackson et al., 2006) および Matsuda ら (Matsuda et al., 1998) による研究と本研究では, 部分的に一致する所見が認められた。

ERK1/2 リン酸化の減少が, MMPs の発現減少と TIMPs の発現増加に関与することがいくつかの先行研究 (Tower et al., 2002; Chen et al., 2013; Zhong et al., 2013; Xue et al., 2014) で明らかにされていることから, 本研究で認められた TF 誘導性の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現抑制ならびに TIMP-2 および TIMP-3 発現増加にも, ERK1/2 リン酸化の減少が関与している可能性が考えられた。しかし本研究では, ERK1/2 の特異的なリン酸化阻害剤である PD98059 で MC3T3-E1 を処理すると, MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現が減少した一方で, TIMP-2 および TIMP-3 発現は変化しなかった。本結果から, TF 負荷は, ERK1/2 のリン酸化抑制を介して MMPs 発現を減少させるが, TIMPs 発現の増加には他の経路が関与する可能性が考えられた。MMPs と TIMPs の発現変化と ERK1/2 リン酸化との関連性を調べた先行研究 (Zhong et al., 2013; Xue et al., 2014) では, ヒストン脱アセチル化阻害剤または抗がん剤によって, ERK1/2 のリン酸化が減少するだけでなく, p38 MAPK のリン酸化が増加したと報告さ

れている。本研究では、TF 負荷 によって ERK1/2 のリン酸化は減少する一方で、SAPK/JNK のリン酸化は増加したが、p38 MAPK のリン酸化には変化が認められなかった。さらに、TF を負荷する前に SAPK/JNK のリン酸化を特異的に阻害する SP600125 で MC3T3-E1 を処理したところ、TF 誘導性の TIMP-2 および TIMP-3 発現増加は完全にブロックされたが、TF 誘導性の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現減少に SP600125 処理の影響は認められなかった。これらの結果から、TF 誘導性の MMPs の発現減少と TIMPs の発現増加には、ERK1/2 のリン酸化減少と SAPK/JNK のリン酸化増加が同時に生じる必要があると考えられた。

これまでの2つの先行研究 (Yang et al., 2004; Li et al., 2010) では、TF 負荷が MC3T3-E1 の MMP-13 発現を誘導したと報告されている。Yang ら (Yang et al., 2004) は、MC3T3-E1 に 8% TF を 4 時間にわたって負荷すると、30 分後から MMP-13 の mRNA およびタンパク発現が増加し、この増加は 1 時間後にプラトーに達したと報告している。本研究結果と Yang ら (Yang et al., 2004) の所見から、TF の短時間 (30 分) 負荷 と長時間 (24 時間) 負荷では MMP-13 発現に及ぼす影響が異なる、すなわち、TF の短時間負荷は発現増加を、長時間負荷では発現減少を誘導すると考えられた。一方、Li ら (Li et al., 2010) は、MC3T3-E1 に 24 時間、6~18% の TF を負荷すると、TF の強度に依存して MMP-13 発現が増加したと報告している。本研究と Li ら (Li et al., 2010) の研究で、TF 負荷が MMP-13 発現に相反する影響を及ぼした原因は明らかでないが、一方で最近、培地に添加する血清濃度が MMP を含む複数の遺伝子発現に影響したという報告がなされた (Harada et al., 2015)。本研究では、細胞の増殖、維持および TF 負荷時に 10% の FBS を含む培地を用いている。一方 Li ら (Li et al., 2010) は、TF を負荷する際に FBS 濃度を 10% から 1% に減じている。これら FBS の濃度の違いが、MMP-13 発現の違いに影響した可能性が考えられる。

これまでに、TF 負荷が滑膜細胞と腱細胞の MMPs の発現減少と TIMPs の発現増加を誘導することが報告されている (Sun et al., 2002; Maeda et al., 2009; Wang et al., 2009; Jones et al., 2013)。一方、本研究では、TF 負荷による骨芽細胞のコラゲナーゼ (MMP-1 および MMP-13) とストロムライシン (MMP-3) の発

現減少と、それらの内因性阻害剤 (TIMP-2 および TIMP-3) の発現増加が認められた。骨表面の osteoid 層からのコラーゲン性および非コラーゲン性タンパクの除去は、破骨細胞の骨表面への吸着において重要なプロセスとなる (Holliday et al., 1997; Zhao et al., 1999)。一方, Tang ら (Tang et al., 2006) は, TF を MC3T3-E1 に負荷すると,破骨細胞分化に必須のサイトカインである RANKL 発現が減少し, RANKL の decoy 受容体である OPG 発現が増加したと報告している。そこで, 本研究においても, RANKL および OPG 発現に及ぼす TF 負荷の影響を検討した。その結果, Tang ら (Tang et al., 2006) の報告と同様に本研究においても, TF 負荷で RANKL 発現は減少し, OPG 発現は増加した。本研究では, RANKL と同様に破骨細胞分化と成熟を促進する M-CSF (Maeno et al., 2013) 発現も調べたが, TF 負荷は M-CSF 発現には影響しなかった。本研究結果から, TF 負荷は, M-CSF 発現に影響しないものの, RANKL 発現減少と OPG 発現増加を介して破骨細胞の分化を抑制する可能性が考えられた。

結 論

歯科矯正力が骨芽細胞の ECM タンパク代謝ならびに破骨細胞分化を調節する機能に及ぼす影響を、細胞および分子生物学的に明らかにすることを目的として、MC3T3-E1 に TF を負荷し、ECM タンパク分解酵素とその内因性阻害剤および破骨細胞分化調節因子の発現、ならびに MAPK シグナル伝達因子の活性化を調べ、以下の結果を得た。

1. TF 負荷で、MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現は有意に低下し、TIMP-2 および TIMP-3 発現は有意に増加したが、MMP-2, MMP-14, TIMP-1 および TIMP-4 発現には TF 負荷の影響が認められなかった。
2. TF 負荷で、ERK1/2 のリン酸化は有意に低下し、SAPK/JNK のリン酸化は有意に増加したが、p38 MAPK のリン酸化には TF の影響が認められなかった。
3. ERK1/2 のリン酸化阻害剤処理は、MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現を低下させたが、TIMP-2 および TIMP-3 発現には影響が認められなかった。また、TF 負荷前の SAPK/JNK のリン酸化阻害剤処理は、TF 誘導性の TIMP-2 および TIMP-3 の発現増加を有意に抑制したが、TF 誘導性の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 の発現減少には影響が認められなかった。
4. TF 負荷で、RANKL 発現は有意に低下し、OPG 発現は有意に増加したが、M-CSF 発現には TF の影響が認められなかった。

以上の結果から、TF 負荷は、骨芽細胞内の MAPK シグナル伝達経路を介して MMP-1, MMP-3 および MMP-13 産生を減少させる一方で、TIMP-2 および TIMP-3 産生を増加し、ECM タンパク分解を抑制することが明らかになった。また、骨芽細胞への TF 負荷 は、RANKL 発現減少と OPG 発現増加を誘導し、破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究遂行にあたり、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部矯正学講座の清水典佳教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました本学部衛生学講座の前野正夫教授、川戸貴行准教授、田中秀樹助教および中井久美子助教を始め、矯正学講座および衛生学講座の皆様に深く感謝致します。

本研究は、平成 26 年度大学院歯学研究科研究費（学生分、柄澤瑤子）によってなされた。

また、本研究の一部は、平成 26 年度日本大学歯学部総合歯学研究所研究費（研究代表者：川戸貴行）、平成 27 年度日本大学歯学部総合歯学研究所研究費（研究代表者：田中秀樹）、平成 26 年度日本大学歯学部上村安男・治子研究費＜短期研究＞（研究代表者：前野正夫）、平成 27 年度日本大学歯学部上村安男・治子研究費＜短期研究＞（研究代表者：前野正夫）、平成 27 年度日本大学歯学部佐藤研究費（研究代表者：中井久美子）によってなされた。

本研究の要旨は、第 66 回日本大学歯学会総会（2014, 東京）、第 63 回日本口腔衛生学会・総会（2014, 熊本）、第 73 回日本矯正歯科学会大会（2014, 千葉）、93rd General Session & Exhibition of the IADR（2015, Boston）において発表した。なお、第 66 回日本大学歯学会総会・学術大会において口頭発表した演題が奨励賞を受賞した。

引用文献

- Anderson HC (1989) Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 60, 320-30.
- Bandow K, Nishikawa Y, Ohnishi T, et al. (2007) Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1 β expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. *J Cell Physiol* 211, 392-8.
- Chen K, Zhang S, Ji Y, et al. (2013) Baicalein inhibits the invasion and metastatic capabilities of hepatocellular carcinoma cells via down-regulation of the ERK pathway. *PLoS One* 8, e72927.
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-74.
- Fushiki R, Mayahara K, Ogawa M, et al. (2015) High-magnitude mechanical strain inhibits the differentiation of bone-forming rat calvarial progenitor cells. *Connect Tissue Res*, 1-6.
- Harada K, Kawai S, Wen-an X, et al. (2015) Alterations in deciduous dental pulp cells cultured with serum-free medium. *J Hard Tissue Biol* 24, 17-22.
- Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, et al. (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* 272, 22053-8.
- Huang W, Li WQ, Dehnade F, et al. (2002) Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *J Cell Biochem* 85, 295-303.
- Jackson RA, Kumarasuriyar A, Nurcombe V, et al. (2006) Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Cell Physiol* 209, 894-904.
- Jacobs C, Grimm S, Ziebart T, et al. (2013) Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain. *Arch Oral Biol* 58, 896-904.
- Jones ER, Jones GC, Legerlotz K, et al. (2013) Cyclical strain modulates metalloprotease and matrix gene expression in human tenocytes via activation of TGF β . *Biochim Biophys Acta* 1833, 2596-607.
- Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, et al. (2007) Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem* 101, 1266-77.

- Kariya T, Tanabe N, Shionome C, et al. (2015) Tension force-induced ATP promotes osteogenesis through P2X7 receptor in osteoblasts. *J Cell Biochem* 116, 12-21.
- Koyama Y, Mitsui N, Suzuki N, et al. (2008) Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch Oral Biol* 53, 488-96.
- Krishnan V, Davidovitch Z (2006) Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129, 469.e1-32.
- Li Y, Tang L, Duan Y, et al. (2010) Upregulation of MMP-13 and TIMP-1 expression in response to mechanical strain in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *BMC Res Notes* 3, 309.
- Maeda E, Shelton JC, Bader DL, et al. (2009) Differential regulation of gene expression in isolated tendon fascicles exposed to cyclic tensile strain in vitro. *J Appl Physiol* 106, 506-12.
- Maeno M, Tanaka H, Zhang F, et al. (2013) Direct and indirect effects of IL-17A on RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Hard Tissue Biol* 22, 287-92.
- Malemud CJ (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 11, 1696-701.
- Matsuda N, Morita N, Matsuda K, et al. (1998) Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 350-4.
- Mitsui N, Suzuki N, Maeno M, et al. (2005) Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E₂ production appropriately. *Life Sci* 77, 3168-82.
- Mu C, Lv T, Wang Z, et al. (2014) Mechanical stress stimulates the osteo/odontoblastic differentiation of human stem cells from apical papilla via ERK 1/2 and JNK MAPK pathways. *Biomed Res Int* 2014, 494378.
- Mundlos S, Olsen BR (1997) Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J* 11, 227-33.
- Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-73.
- Nakai K, Kawato T, Morita T, et al. (2013) Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT₁ receptor in osteoblasts. *Biochimie* 95, 922-33.

- Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, et al. (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272, 29975-83.
- Paiva KB, Granjeiro JM (2014) Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys* 561, 74-87.
- Roberts WE, Goodwin WC, Heiner SR (1981) Cellular response to orthodontic force. *Dent Clin North Am* 25, 3-17.
- Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, et al. (1993) Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 8, S483-7.
- Sanuki R, Shionome C, Kuwabara A, et al. (2010) Compressive force induces osteoclast differentiation via prostaglandin E₂ production in MC3T3-E1 cells. *Connect Tissue Res* 51, 150-8.
- Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, et al. (1995) Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin 1- β production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 74, 1382-8.
- Shionome C, Kawato T, Tanabe N, et al. (2012) Compressive force induces the expression of bone remodeling-related proteins via interleukin-11 production in MC3T3-E1 cells. *J Hard Tissue Biol* 21, 65-74.
- Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, et al. (2010) MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation--divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 279-88.
- Sun HB, Yokota H (2002) Reduction of cytokine-induced expression and activity of MMP-1 and MMP-13 by mechanical strain in MH7A rheumatoid synovial cells. *Matrix Biol* 21, 263-70.
- Tang L, Lin Z, Li YM (2006) Effects of different magnitudes of mechanical strain on osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 344, 122-8.
- Tower GB, Coon CC, Benbow U, et al. (2002) Erk 1/2 differentially regulates the expression from the 1G/2G single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1586, 265-74.
- Vande Geest JP, Di Martino ES, Vorp DA (2004) An analysis of the complete strain field within Flexercell membranes. *J Biomech* 37, 1923-8.
- Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-39.
- Wang P, Yang L, You X, et al. (2009) Mechanical stretch regulates the expression of

- matrix metalloproteinase in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Connect Tissue Res* 50, 98-109.
- Xue P, Zhao Y, Liu Y, et al. (2014) A novel compound RY10-4 induces apoptosis and inhibits invasion via inhibiting STAT3 through ERK-, p38-dependent pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Chem Biol Interact* 209, 25-34.
- Yan YX, Gong YW, Guo Y, et al. (2012) Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PLoS One* 7, e35709.
- Yanagisawa M, Suzuki N, Mitsui N, et al. (2007) Effects of compressive force on the differentiation of pluripotent mesenchymal cells. *Life Sci* 81, 405-12.
- Yang CM, Chien CS, Yao CC, et al. (2004) Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Biol Chem* 279, 22158-65.
- Yu WH, Yu S, Meng Q, et al. (2000) TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 275, 31226-32.
- Zhang F, Wang CL, Koyama Y, et al. (2010) Compressive force stimulates the gene expression of IL-17s and their receptors in MC3T3-E1 cells. *Connect Tissue Res* 51, 359-69.
- Zhao W, Byrne MH, Boyce BF, et al. (1999) Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice. *J Clin Invest* 103, 517-24.
- Zhong HM, Ding QH, Chen WP, et al. (2013) Vorinostat, a HDAC inhibitor, showed anti-osteoarthritic activities through inhibition of iNOS and MMP expression, p38 and ERK phosphorylation and blocking NF- κ B nuclear translocation. *Int Immunopharmacol* 17, 329-35.

基幹論文

Yoko Karasawa, Hideki Tanaka, Kumiko Nakai, Natsuko Tanabe, Takayuki Kawato, Masao Maeno, Noriyoshi Shimizu (2015) Tension force downregulates matrix metalloproteinase expression and upregulates the expression of their inhibitors through MAPK signaling pathways in MC3T3-E1 cells. International Journal of Medical Sciences 12, 905-913.