

論文の内容の要旨

氏名：佐野麗美

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Compressive force induces the expression of osteoblast differentiation-related transcription factors via TGF- β s signaling pathway in MC3T3-E1 cells

(MC3T3-E1 細胞において圧迫力は TGF- β s シグナル伝達を介して骨芽細胞分化関連転写因子の発現を誘導する)

歯科矯正治療において、歯に加える矯正力は歯根膜を介して歯槽骨に伝達され、骨芽細胞、骨細胞、および破骨細胞の分化と機能に影響をおよぼすことが知られている。骨芽細胞に圧迫力を負荷した研究では、適度な圧迫力が、骨芽細胞への分化に不可欠な転写因子である Runx2 と Osterix の発現を増加させるとともに、骨形成機能を促進することが報告されている。一方、transforming growth factor (TGF)- β は、胚発育、細胞の増殖と分化、細胞運動能およびアポトーシスなどの様々な細胞内プロセスに影響するポリペプチドであり、TGF- β 1、TGF- β 2 および TGF- β 3 の3つのアイソフォームと、40以上の関連するファミリーメンバーが存在する。このうち TGF- β 1 と TGF- β 2 は、骨代謝との関連性が広く検討され、骨芽細胞の分化と機能に影響することが知られている。TGF- β が細胞膜上に発現する TGF- β 受容体に結合すると、その下流に位置する Smad2 と Smad3 のリン酸化が促進され、シグナルが細胞内に伝達される。また、TGF- β は、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) などの Smad 非依存的なシグナル伝達因子のリン酸化も促進することが知られている。しかし、圧迫力が負荷された際の骨芽細胞における TGF- β および TGF- β 受容体の発現、受容体下流の細胞内シグナル伝達の詳細なメカニズムについては未だ明らかにされていない。さらに、骨芽細胞への圧迫力負荷は Runx2 と Osterix に加えて Msx2 などの骨芽細胞分化関連転写因子発現を促進することも知られているが、これらの発現に TGF- β シグナル伝達がどのように関与しているかについては明らかにされていない。

そこで、著者は、圧迫力が骨形成を誘導する過程における TGF- β の役割を明らかにすることを目的とした *in vitro* 研究を行った。すなわち、骨芽細胞に圧迫力を負荷して、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 受容体 1 型 (T β r1) および 2 型 (T β r2) の発現と下流遺伝子である Smad2、Smad3 および p38 MAPK のリン酸化について検討した。さらに、圧迫力と骨芽細胞分化関連因子である Runx2、Osterix および Msx2 の発現との関連性について調べた。また、TGF- β 受容体阻害剤を用いて、圧迫力を負荷した際の骨芽細胞における TGF- β の autocrine 作用が、Smad2、Smad3 および p38 MAPK のリン酸化と Runx2、Osterix および Msx2 の発現におよぼす影響についても検討した。

本研究では、骨芽細胞としてマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を使用した。MC3T3-E1 細胞を 100 mm dish に播種して confluent になった時点で、細胞層上にガラス薄板とステンレス脚のついたアルミ容器を置き、容器と鉛球の総和として 1.0 g/cm² または 2.0 g/cm² の圧迫力を負荷し、1、3、6 および 9 時間培養した。なお、コントロールでは、ガラス板のみを細胞層上にのせた。TGF- β 1、TGF- β 2、T β r1、T β r2、Runx2、Osterix および Msx2 の遺伝子発現は real-time PCR 法、タンパク発現は Western blotting 法で調べた。また、Smad2、Smad3 および p38 MAPK のリン酸化は Western blotting 法で調べた。なお、T β r1 および T β r2 の阻害剤である LY2109761 (25 nM) は、細胞に圧迫力を負荷する 30 分前に培地に加えた。

その結果、1.0 g/cm² の圧迫力を負荷して 3 および 6 時間後の MC3T3-E1 細胞の TGF- β 1 と TGF- β 2 の遺伝子およびタンパク発現は、コントロールおよび 2.0 g/cm² 圧迫力負荷に比較して有意に増加した。一方、1.0 g/cm² および 2.0 g/cm² の圧迫力負荷後の T β r1 および T β r2 の遺伝子発現は、すべての負荷時間において、コントロールと比較して有意差を認めなかった。さらに、1.0 g/cm² の圧迫力を負荷して 6 時間後の Smad2、Smad3 および p38 MAPK のリン酸化は、コントロールおよび 2.0 g/cm² 圧迫力負荷に比較して有意に増加した。以上の結果から、骨芽細胞への 1.0 g/cm² 圧迫力負荷は、TGF- β 1 と TGF- β 2 の発現、その下流遺伝子である Smad 依存性および Smad 非依存性のシグナル伝達を促進する

ことが示唆された。また、2.0 g/cm² 圧迫力負荷では、これらの促進効果が認められないことが明らかとなった。

次に、圧迫力の負荷が骨芽細胞の分化に関連する転写因子の発現におよぼす影響を調べた。その結果、1.0 g/cm² の圧迫力を負荷して3および6時間後の Runx2, Osterix および Msx2 の遺伝子およびタンパク発現は、コントロールおよび2.0 g/cm² 圧迫力負荷に比較して有意に増加した。

これらの結果から、1.0 g/cm² 圧迫力負荷で誘導される TGF-β1 と TGF-β2 の autocrine 作用が Runx2, Osterix および Msx2 の発現増加に関与しているのではないかと考えられた。そこで、Tβr1 および Tβr2 の阻害剤である LY2109761 で細胞を前処理した後に1.0 g/cm² の圧迫力を負荷し、Tβr1 および Tβr2 の下流シグナル伝達因子のリン酸化と、これらの骨芽細胞分化関連転写因子の発現について調べた。その結果、1.0 g/cm² 圧迫力負荷で増加した Smad2, Smad3 および p38 MAPK のリン酸化は LY2109761 の前処理によってコントロールレベルまで減少し、さらに、Runx2, Osterix および Msx2 の遺伝子およびタンパク発現もコントロールレベルまで有意に減少した。以上の結果より、1.0 g/cm² 圧迫力負荷により誘導された TGF-β1 と TGF-β2 は、MC3T3-E1 細胞に autocrine に作用して、TGF-β 受容体の下流に位置する Smad 依存性および非依存性のシグナル伝達因子のリン酸化を促進するとともに Runx2, Osterix および Msx2 の発現を誘導する可能性が示唆された。

結論として、骨芽細胞への1.0 g/cm² 圧迫力負荷によって誘導される TGF-β は、その autocrine 作用によって Runx2, Osterix および Msx2 などの骨芽細胞の分化を促進する転写因子の発現を増加させることが示唆された。さらに、1.0 g/cm² の圧迫力によるこれらの骨芽細胞分化関連転写因子の発現増加には、Tβr1 と Tβr2 の下流に位置する Smad 依存性および Smad 非依存性のシグナル伝達経路が関与することが明らかになった。