

## 論文の内容の要旨

氏名：清水 なつ生

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：高濃度グルコースが成熟骨芽細胞の石灰化に与える影響

歯科矯正治療では歯牙移動装置からの外力によって、歯槽骨の改変が誘導され、歯を目的の位置に移動させることができる。この際、圧迫側の歯槽骨には破骨細胞分化の促進によって骨吸収が起こり、反対に牽引側では骨芽細胞の機能が活性化され骨の添加が起こる。このような破骨細胞と骨芽細胞による骨の改変現象は、全身の骨の成長や骨の損傷治癒過程でも生じており、血中グルコース濃度が様々な影響を与えることが知られている。グルコースは骨芽細胞の主なエネルギー源であり、骨組織では活発なグルコースの取り込みが観察されている。また、最近の研究から骨芽細胞の分化過程でグルコース代謝が大きく変化することも知られている。例えば、前骨芽細胞の増殖には解糖系が、また骨芽細胞への分化には解糖系とミトコンドリア呼吸の両方が、そして成熟骨芽細胞へ分化すると再び解糖系が主なグルコース代謝経路となっている。一方、初代骨芽細胞を利用した研究から、骨芽細胞の成熟過程において解糖系で機能するヘキソキナーゼやピルビン酸キナーゼ、グルコース輸送体である *glucose transporter 1* の発現が上昇することが知られている。さらに、骨芽細胞のグルコースの取り込みによって *AMP-activated protein kinase* が活性化され、その結果、骨芽細胞分化関連転写因子の  *runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* の発現が誘導され、骨芽細胞分化が促進する。これらの知見は、グルコース代謝の制御が骨芽細胞の分化において重要な役割を持つことを意味している。高濃度グルコースによる骨芽細胞分化や基質の石灰化に与える影響については、マウス前骨芽細胞株細胞 *MC3T3-E1* を使った培養系で研究されている。しかしながら、報告ごとに結果が異なり、一定の見解が得られていないのも事実である。例えば、11 mM から 33 mM のグルコースが *MC3T3-E1* の骨芽細胞への分化と石灰化を促進するという報告がある。一方、15.5 mM のグルコースは、*MC3T3-E1* の増殖や分化、石灰化を促進するが、25.5 mM または 35.5 mM のグルコースでは、抑制的に機能する場合もある。*MC3T3-E1* は *BMP-2* を含む培地で3週間から4週間培養することによって、石灰化能をもつ成熟骨芽細胞に分化するが、最初の1週間だけ高濃度グルコースを含む培地にするだけでも石灰化は促進する。しかし、最後の1週間のみを高濃度グルコースにしても変化は見られない。すなわち、高濃度グルコースが、前骨芽細胞から骨芽細胞、さらに成熟骨芽細胞へ分化する過程で異なる影響を及ぼす可能性があり、*MC3T3-E1* を利用した研究において、一定の見解が得られていない理由の1つであると考えられる。そこで、本研究では成熟骨芽細胞の性質をもつラット骨肉腫由来株細胞 *ROS17/2.8* を使用して、高濃度グルコースが基質の石灰化を抑制するメカニズムについて検討した。*ROS17/2.8* は、 $\alpha$ MEM に 10%牛胎児血清、600 mg/L glutamine, 100 IU/mL penicillin と 100 mg/mL streptomycin を添加した培地で、湿度 100%, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。なお、通常の 10% FBS が含まれた  $\alpha$ MEM のグルコース濃度は 5.5 mM に設定されているため、この培地で培養した細胞を対照群とし、終濃度が 11 mM と 22 mM になるようにグルコースを加えて培養した細胞を実験群とした。*alkaline phosphatase* は 0.19 mg/ml の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate と 0.4 mg/ml の *nitro blue tetrazolium chloride* を含む溶液による発色によって評価した。基質の石灰化は *alizarin red (AR)* 染色と *AR* 染色後の溶解液の吸光度法を測定して評価した。細胞の生存レベルは *WST8* 試薬を使用して調べた。骨芽細胞関連因子の *Runx2*, *type I collagen (Col1A1)*, *osteocalcin (OCN)*, *osteopontin (OPN)* の遺伝子発現については *quantitative RT-PCR (qPCR)* によって検討した。ピロリン酸 (*PPi*)、モノリン酸 (*Pi*) および *ATP* の濃度測定は市販の測定キットを使用した。

通常の 10%FBS が含まれた  $\alpha$ MEM のグルコース濃度は 5.5 mM であることから、今回は 11 mM と 22 mM を高濃度グルコースとした。異なる濃度のグルコースを含む培地で *ROS17/2.8* を培養し、7日目に *ALP* 活性と基質の石灰化を調べた。その結果、いずれのグルコース濃度でも *ALP* 活性の変化は見られなかったが、5.5 mM グルコースで培養した細胞（対照群）と比較して、高濃度グルコースを加えて培養した細胞では、石灰化の抑制が認められた。*AR* 染色後の基質を 5%ギ酸で溶解し、染色レベルを数値化した結果、この石灰化抑制は、対照群を 1 とした場合、11 mM グルコース添加群で  $0.53 \pm 0.15$

( $p < 0.01$ ), また 22 mM グルコース添加群では  $0.13 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) であった。対照群に 5.5 mM と 16.5 mM のマンニトールを加え、浸透圧を 11 mM と 22 mM グルコース添加群と同等にし、7 日間の培養を行った。AR 染色の結果、マンニトール添加群の石灰化抑制は認められなかった。細胞の生存レベルを WST8 アッセイによって調べた。その結果、生存レベルは対照群と比較して 11 mM と 22 mM グルコース添加群で増加を示し、対照群を 1 とした場合、11 mM グルコース添加群で  $1.48 \pm 0.06$  ( $p < 0.01$ ), 22 mM グルコース添加群では  $1.88 \pm 0.04$  ( $p < 0.01$ ) となった。骨芽細胞関連因子の遺伝子発現について検討したところ、RUNX2, COL1A1, OCN の発現は 11 mM と 22 mM グルコース添加群で顕著な増加を示した。しかし、OPN の発現は対照群を 1 とした場合、11 mM グルコース添加群で軽度に増加したが、22 mM グルコース添加群では有意な差は認められなかった。7 日間の培養期間中、どのタイミングで高濃度グルコースを加えると石灰化が抑制されるか検討した。その結果、対照群と比較して、5 日目、3 と 5 日目、1, 3, 5 日目、および 1 と 5 日目に 22 mM グルコースを含む培地に交換した実験群の石灰化が強く抑制された。また、1 と 3 日目および 3 日目のみに 22 mM グルコースを含む培地に交換した実験群でも石灰化の軽度な抑制が認められた。これらの結果から、5 日目に高濃度グルコースを含む培地に交換すれば、1 日目と 3 日目のグルコース濃度の違いに関係なく、強い石灰化の抑制が起きることが示された。次に高濃度グルコースを含む培地で 7 日間培養した ROS17/2.8 が産生する PPi と、PPi の分解によって生じる Pi の濃度変化について検討した。細胞内 PPi 濃度は、対照群が  $22.9 \pm 2.1$  nmol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で  $20.9 \pm 0.9$  nmol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では  $18.4 \pm 2.1$  nmol/ $\mu$ gDNA であった。逆に細胞外 PPi は、対照群が  $16.2 \pm 0.5$  nmol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で  $20.7 \pm 0.4$  nmol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では  $26.7 \pm 1.1$  nmol/ $\mu$ gDNA と増加した。一方、Pi の濃度は細胞内・外ともに高濃度グルコース添加群で減少した。対照群の細胞内 Pi は  $0.74 \pm 0.02$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で  $0.53 \pm 0.01$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では  $0.23 \pm 0.01$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA であった。また、細胞外 Pi 濃度は対照群が  $0.52 \pm 0.02$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で  $0.42 \pm 0.01$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では  $0.27 \pm 0.01$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA となった。対照群に 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 250  $\mu$ M のピロリン酸ナトリウム (PPNa) を添加した結果、PPNa による石灰化の抑制がみられた。さらに、高濃度グルコースが細胞内・外の ATP 濃度どのような影響を及ぼすか調べた結果、対照群の細胞内 ATP 濃度は  $73.6 \pm 3.9$  pmol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で  $102.5 \pm 29.9$  pmol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では  $112.3 \pm 13.6$  pmol/ $\mu$ gDNA と軽度な増加を示した。しかし、細胞外 ATP 濃度については、対照群が  $56.8 \pm 28.2$  pmol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で  $21.2 \pm 14.2$  pmol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では  $13.6 \pm 5.6$  pmol/ $\mu$ gDNA と減少を示した。これらの結果から以下 1~6 に示す結論を得た。

1. 11 mM と 22 mM の高濃度グルコースは ROS17/2.8 の石灰化を抑制した。
2. 高濃度グルコースは細胞の生存レベルと骨芽細胞関連因子の RUNX2, COL1A1, OCN および OPN の遺伝子発現を増加させた。
3. 7 日間の培養期間中、5 日目に高濃度グルコースにすることで、石灰化を強く抑制した。
4. 高濃度グルコースは細胞外 PPi 濃度の上昇と、細胞内・外 Pi の濃度の低下を誘導した。
5. PPNa は 5.5 mM グルコースで培養した細胞の石灰化を抑制した。
6. 高濃度グルコースは細胞内 ATP の濃度を軽度に増加させ、細胞外 ATP を減少させた。

以上のことから、高濃度のグルコースを含む培地で培養した ROS17/2.8 に観察された石灰化抑制は、細胞外 PPi 濃度の上昇が原因で生じている可能性が示唆された。