

氏名	本 城 正
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 8 4 号
学位授与の日付	平 成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞に対する流体剪断応力負荷時における CTGF 発現に関わるシグナル伝達機構の研究
論文審査委員	教授 山本 敏男 教授 山本 照子 教授 杉本 朋貞

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【緒言】

歯科矯正治療における歯の移動は、矯正力を負荷された骨の改造を伴う。これは、骨中に存在する骨芽細胞をはじめとする細胞が機械的刺激を感受し、生物学的刺激に変換する過程によってなされている。現在のところ、骨にかかる機械的刺激の様式はまだ明らかではないが、骨が圧縮されたときに生じる体液の移動によって引き起こされる細胞表面の流体剪断応力が関与していると考えられている。一方、結合組織成長因子 (connective tissue growth factor: CTGF) は、ヒト臍帯血静脈血管内皮細胞の培養上清中から発見された成長因子で、early response gene の1つと考えられている。CTGF は、軟骨、骨芽細胞の増殖分化に関与していることが明らかになっている。しかも Yamashiro らは CTGF がラットの歯牙移動時に歯槽骨の牽引側および圧迫側の骨芽細胞および骨細胞において著しく発現することを報告した(J.Dent.Res. 2001)。そこで本研究では骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、流体剪断応力負荷時における CTGF の発現を検討し、そのシグナル伝達機構を各種阻害剤を用いて調べることを目的とした。

### 【材料および方法】

**細胞培養**：MC3T3-E1 細胞は 10%牛胎仔血清(FBS)含有  $\alpha$ -MEM 中で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下にて培養した。流体剪断応力負荷の実験に用いた細胞は、polyD-lysine(20 $\mu$ g/ml)と fibronectin(20 $\mu$ g/ml)で表面を処理したカバーガラス上で 48 時間培養し、confluent に増殖した時点で、0.5%FBS 含有  $\alpha$ -MEM に交換し、さらに 24 時間培養後、実験に使用した

**流体剪断応力の負荷**：Frangos らの方法(Science 1985)を参考に流体剪断応力負荷装置を作成した。スライドガラス上の培養細胞に 1.2Pa/cm<sup>2</sup> の一定した流れの流体剪断応力が負荷されるように調節した。流体剪断応力を負荷する 30 分前に各種阻害剤を添加し、実験中は 37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相の条件を維持した。阻害剤には nifedipine(5 $\mu$ M), gadolinium-chloride(10 $\mu$ M), EGTA(5mM), TMB-8(10 $\mu$ M), thapsigargin(1 $\mu$ M), BAPTA/AM(30 $\mu$ M), neomycin(5mM), forskolin(10 $\mu$ M), PD98059(10 $\mu$ M), SB203580(10 $\mu$ M), Y27632(10 $\mu$ M), LatrunculinA(1 $\mu$ M), cytochalasinD(10 $\mu$ M), jasplakinolide(10,50,200nM) を用いた。

**CTGF mRNA の定量**：MC3T3-E1 細胞から total RNA を回収し、それを逆転写した。これを鋳型とし Lightcycler(Roche)を用い定量 PCR 法を行った。定量には SYBR Green 1 の蛍光強度を計測しこれを比較した。

**アクチン染色**：重合したアクチン線維を観察するために培養細胞は formaldehyde(3%)で 10 分間固定し、Triton-X100(0.3%)で 10 分間の膜処理を行った後、Alexa488 標識 phalloidin で蛍光染色した。包埋後、標本は蛍光顕微鏡で観察し、高感度 CCD カメラを用いて蛍光画像を得た。

### 【結果および考察】

1. CTGF mRNA の発現は流体剪断応力により引き起こされる：MC3T3-E1 細胞に流体剪断応力を負荷したところ、CTGF mRNA の発現は負荷後 1 時間で有意な上昇を示し、2 時間で最大となり、その後減少した。このことから流体剪断応力は CTGF-mRNA の発現を誘起することが示された。

2.流体剪断応力による CTGF mRNA の発現には  $Ca^{2+}$  の細胞外からの流入および細胞内貯蔵  $Ca^{2+}$  の放出が関与している：L 型  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害剤である nifedipine および伸展力活性  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害剤である gadolinium-chloride は、流体剪断応力による CTGF mRNA の発現を抑制しなかった。しかし、細胞外液  $Ca^{2+}$  キレート剤である EGTA で前処理すると CTGF mRNA の発現は阻害された。細胞内  $Ca^{2+}$  の放出阻害剤である TMB-8 は部分的に CTGF mRNA の発現を抑制した。しかし、細胞内  $Ca^{2+}$  キレート剤である BAPTA-AM(30 $\mu$ M)は応力負荷による CTGF mRNA の発現を完全に抑制した。一方、細胞内  $Ca^{2+}$  の放出促進剤である thapsigargin 添加群は応力非負荷群において CTGF mRNA の著しい発現を認め、応力負荷群では相加性に発現の増強を示した。上記から L 型および伸展力活性  $Ca^{2+}$  チャンネル以外の  $Ca^{2+}$  チャンネルからの細胞外  $Ca^{2+}$  の流入、および小胞体などの細胞内貯蔵  $Ca^{2+}$  の放出が、流体剪断応力負荷時における CTGF mRNA の発現と関与があることが示唆された

3.流体剪断応力による CTGF mRNA の発現は PLC および cAMP, MAPK が関与している：Phospholipase C 阻害剤である neomycin および cAMP 合成酵素アデニル酸シクラーゼの促進剤である forskolin は、流体剪断応力負荷群において CTGF mRNA の発現を抑制した。MAPK においては ERK1/2 の阻害剤である PD-98059 および p38MAPK 阻害剤 SB-203580 は、応力非負荷群には影響を与えず応力負荷群の CTGF mRNA の発現を抑制した。このことから PLC および cAMP, また MAPK においては ERK 及び p38MAPK が、流体剪断応力負荷時の CTGF mRNA の発現に関与していることが示唆された。

4.アクチンの重合と CTGF mRNA 発現の相関性：Rho キナーゼ阻害剤である Y27632 が CTGF mRNA の発現を阻害したことから、CTGF mRNA の発現とアクチン重合の関与を検討した。アクチン単量体の重合を阻害する Latrunculin A は、応力負荷群の CTGF mRNA の発現を完全に抑制した。しかし、アクチン線維の重合速度が速いプラス端のみを重合阻害し、もう一方のマイナス端では重合を促進する cytochalasin D は、応力非負荷群で CTGF mRNA の発現を促進し、応力負荷群でも添加群が非添加群と同程度の CTGF mRNA の発現を示した。また、アクチン線維の変化を蛍光標識 phalloidin 染色で検討したところ、CTGF mRNA の発現とアクチン線維の蛍光強度に相関が認められた。次に、アクチン重合を促進する jasplakinolide(10,50,200nM)では、濃度依存的に CTGF mRNA の発現を促進し、アクチン線維束の蛍光強度が上昇した。アクチン重合阻害剤である Latrunculin A では、流体剪断応力負荷時の CTGF mRNA 発現が阻害され、さらに一部重合を促進する cytochalasin D, アクチンの重合促進剤である jasplakinolide により応力負荷群、非負荷群ともに CTGF mRNA 発現を誘発したことから、アクチン重合が CTGF mRNA の発現に関与していることが示唆された。

#### 【結論】

骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞において流体剪断応力を負荷することにより CTGF mRNA が発現した。その発現経路において細胞内外のカルシウムや cAMP, PLC, MAPK の関与が示唆された。またアクチンの重合化と CTGF mRNA 発現に相関性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

結合組織成長因子 (CTGF) は骨芽細胞や骨細胞、軟骨細胞の分化、増殖を促進することが知られている。矯正力を負荷した場合においても、歯槽骨中の細胞に CTGF mRNA の発現が認められたという報告がある。本研究はメカニカルストレスに対する CTGF の関与を明らかにすることを目的に、骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、流体剪断応力負荷による CTGF の発現を mRNA レベルで検討した。その結果、MC3T3-E1 細胞に流体剪断応力を負荷すると CTGF mRNA が上昇し、2 時間で最大となった。またその発現経路において細胞外 Ca イオンの流入、細胞内貯蔵 Ca イオンの放出や、PLC、MAPK、cAMP、Rho の関与が示唆された。また、CTGF mRNA の発現とアクチン重合体の形成に相関があることが示された。本研究により MC3T3-E1 細胞への流体剪断応力の負荷において、CTGF mRNA の発現が複数の経路を介して発現している可能性が示唆された。以上の結果は、矯正力を負荷した際の歯の移動時における骨のリモデリングにおいて、CTGF が重要な役割を果たしていることを示唆しており、また細胞が機械的な刺激を感受し、生物学的なシグナルに変換するメカニズムの解明に貢献するものである。したがって、歯科矯正学の基礎的な研究として意義があると考えられる。

よって、本申請論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。