

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 Lay Thant
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第488号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 How does the ROCK inhibitor enhance osteoblastic differentiation?
(ROCK 阻害剤はどのように骨芽細胞分化を促進するか?)

論文審査委員 主査 教授 齋藤 功
副査 教授 佐伯万騎男
副査 教授 魚島勝美

博士論文の要旨

【背景と目的】

骨はミネラルを豊富に含んだ硬組織であり、体の構造を支持し、剛性や形態を与え、運動機能を補助する。骨代謝は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によって担われており、それらの活性制御に ROCK (Rho associated coiled-coiled-coil kinases) が関与していることが、先行研究によって明らかにされてきた。ROCK は Rho キナーゼの下流のエフェクター因子として機能し、ROCK 阻害剤によって、破骨細胞と骨芽細胞の分化が促進され、さらにラットの頭蓋骨正中欠損モデルにおいて骨形成が促進することが見出されている。この結果は、骨代謝のターンオーバーにおける ROCK の機能的関与を強く示唆するものであるが、その分子メカニズムについては未解明である。本研究では、骨芽細胞分化における ROCK 阻害剤の薬理学的作用と ROCK の機能解明をめざし、*in vitro* および *in vivo* 実験系を用いて分子メカニズム解析ならびに免疫組織化学的解析を行った。

【材料と方法】

細胞は MC3T3-E1 を用いた。アリザリンレッド S 染色により石灰化の評価を行った。各タンパク質の発現はウエスタンブロット法を用いた。基質小胞は、MagCapture Exosome Isolation Kit PS (富士フイルム和光純薬) を用いて培地上清から単離した。質量分析法によって基質小胞タンパク質の網羅的な同定を行った。各遺伝子のノックダウンは、siRNA 干渉法を用いた (Lipofectamine RNAiMAX, ThermoFisher)。また、*in vivo* での実験としては、実験的歯の移動マウスモデルを用いて生体内での歯の移動初期の骨形成領域における免疫組織化学的解析を行った。

【結果および考察】

MC3T3-E1 細胞の石灰化に対する ROCK 阻害剤の効果をアリザリンレッド S 染色によって評価したところ、ROCK 阻害剤存在下では、増殖培地および石灰化培地の両方において石灰化の促進が見られた。さらに、ROCK 阻害剤存在下では、骨芽細胞分化誘導時に ALP と RUNX2 タンパク質の顕著な増加が観察されたことから、骨芽細胞分化関連因子のタンパク質発現を亢進させ、石灰化を促進することが明らかになった。プロテオミクス解析では、ROCK 阻害剤処理し

た細胞由来の基質小胞において、98 個のユニークなタンパク質が同定された。それらには、ALP や ADP リボシル化因子、さらに一連の Rab (Ras-associated binding)ファミリータンパク質が多く含まれていたことから、ROCK 阻害によって基質小胞の生合成や分泌が促進されることが示唆された。また、骨芽細胞分化誘導時において ROCK 阻害剤による Rab11 と Rab35 のタンパク質レベルの亢進が見られ、ROCK 阻害剤が細胞外基質小胞の分泌経路を亢進している可能性が示された。一方で、Rab11a、Rab11b および Rab35 のノックダウンは、ALP およびアリザリンレッド S 染色に有意な影響を与えなかった。これは、お互いの Rab タンパク質の機能重複によるものではないかと推察された。Runx2 の siRNA ノックダウンは、Rab11a と Rab11b のタンパク質レベルを有意に低下させたが、Rab35 では変化が見られなかった。このことから、骨芽細胞分化過程における Rab11a と Rab11b のタンパク質発現が Runx2 によって直接的または間接的に制御されていることが示唆された。

実験的歯の移動マウスモデルを作製し、移動開始後 7 日目と 14 日目において、歯根膜 (PDL) 牽引側で新たに生じた骨形成を免疫組織化学的に解析したところ、新生骨形成領域において Rab11 と Rab35 の蓄積が観察された。これまでの報告から、Rab タンパク質は小胞の細胞内輸送および膜結合に関与することが知られており、特に Rab11、Rab35、および Rab27 は、細胞外基質小胞の生合成および分泌に直接かつ重要な役割を果たすことが示されている。本研究における *in vivo* での実験結果では、Rab11 と Rab35 が骨芽細胞分化過程における基質小胞分泌に関与しているという新しい知見が見いだされた。

【結論】

本研究では、ROCK の活性阻害が基質小胞分泌の活性化と骨芽細胞分化を促進することが示された。また、Rab タンパク質が *in vitro* および *in vivo* での骨石灰化あるいは骨添加のプロセスに少なくとも部分的に関与している可能性が示唆された。本研究によって、骨芽細胞分化の新規関連因子として Rab タンパク質が同定されたが、今後は、ROCK と Rab タンパク質がどのように相互作用して骨芽細胞分化を制御しているかについてさらなる解析が必要である。

審査結果の要旨

ミネラルを豊富に含んだ硬組織である骨は、体の構造支持、剛性や形態の付与、運動機能の補助において重要な役割を果たしている。骨代謝は、周知のとおり破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成から成り立ち、それらの活性制御に ROCK (Rho associated coiled-coiled-coil kinases) が関与していることが、近年における先行研究によって明らかにされてきた。

ROCK は Rho キナーゼの下流のエフェクター因子として機能するが、ROCK 阻害剤によって破骨細胞と骨芽細胞の分化が促進され、さらに、ラットの頭蓋骨正中欠損モデルを用いた最近の研究で骨形成が促進することが明らかにされている。これらの結果は、骨代謝のターンオーバーにおける ROCK の機能的関与を強く示唆するものと考えられるが、その分子メカニズムについては未だ十分な解明がなされていない。

そこで本研究では、骨芽細胞の分化過程における ROCK 阻害剤の作用機序について *in vitro* および *in vivo* 両者の系を用いて解析を行った。

in vitro の系では、材料として MC3T3-E1 を利用した。石灰化の評価はアリザリンレッド S 染色により、また、各タンパク質の発現はウエスタンブロット法を用いて行った。基質小胞は培地上清から単離し、質量分析法によって基質小胞タンパク質の網羅的な同定を行った。各遺伝子のノックダウンは、siRNA 干渉法を用いて (Lipofectamine RNAiMAX, ThermoFisher) 施行し、さらに、*in vivo* での実験として、矯正的 (実験的) 歯の移動マウスモデルを用いて生体内での歯

の移動初期の骨形成領域における免疫組織化学的解析を行った。

その結果、*in vitro*における実験では、ROCK 阻害剤存在下においては Rab タンパク質の発現が活性化され、ROCK 阻害剤処理した細胞由来の基質小胞において 98 個のユニークなタンパク質が同定されたとともに、基質小胞の生合成や分泌を亢進させることで骨芽細胞分化を誘導、促進させることが明らかになった。また、実験的歯の移動モデルを用いた *in vivo* では、Rab11 と Rab35 が歯根膜牽引側の骨芽細胞分化過程における基質小胞分泌に関与し、生体内の骨添加プロセスとの間に密接な関係を有するという新しい知見を見いだした。

本審査では、研究を実施するに至った背景、研究対象、解析方法、研究結果ならびに考察の妥当性、研究成果の発展性、臨床における貢献度、他領域における最新の関連知見などについて試問し、いずれについても適切な回答を得た。

本研究は、骨芽細胞の分化過程における ROCK 阻害剤の薬理学的作用機序を明らかにし、実験的歯の移動時における Rab タンパク質の関与というきわめて新規な知見を示したことから、学位を授与するに相応しい研究であると判断した。