

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？

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 Lay Thant

【目的と背景】 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。

【結果と議論】 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。