

学位研究紹介

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 における  
ギャップ結合細胞間コミュニケーション  
は, basic fibroblast growth factor と  
phorbol ester により, 抑制される。  
Down-Regulation of Gap Junctional  
Intercellular Communication  
Between Osteoblastic MC3T3-E1  
Cells by Basic Fibroblast Growth  
Factor and a Phorbol Ester

新潟大学歯学部歯科矯正学講座<sup>1</sup>  
 明海大学歯学部口腔解剖学第一講座<sup>2</sup>  
 澤田美穂<sup>1,2</sup>, 花田晃治<sup>1</sup>, 久米川正好<sup>2</sup>,  
 羽毛田慈之<sup>2</sup>  
 Department of Orthodontics,<sup>1</sup>  
 Niigata University School of Dentistry  
 Department of Oral Anatomy,<sup>2</sup>  
 Meikai University School of Dentistry  
 MIHO SAWADA<sup>1,2</sup>,  
 KOOJI HANADA<sup>1</sup>, MASAYOSHI KUMEGAWA<sup>2</sup>,  
 YOSHIYUKI HAKEDA<sup>2</sup>

J. Bone and Miner. Res. 12(8), 1165-1173, 1997

【緒言】 骨組織においては, 骨芽細胞同士, 骨細胞同士, また, 骨芽細胞と骨細胞とがギャップ結合を介してお互いに接触し, 高度な細胞間ネットワークを形成している (Fig. 1)。そして, このギャップ結合細胞間コミュニケーション (GJIC) によって, 骨代謝調節ホルモンやサイトカイン, さらにはメカニカルストレスなどの様々な外的刺激が, 協調的に骨芽細胞及び骨細胞間に伝播され, 骨形成系細胞の増殖・分化を調節することが推測される。また近年, いくつかのホルモンやサイトカインが骨芽細胞における GJIC を調節することが報告された。しかし, それらの因子が, ギャップ結合の構成蛋白質であるコネクシンに与える影響について, 分子生物学的レベルで検討したものは少ない。そこで, 今回, 骨芽細胞

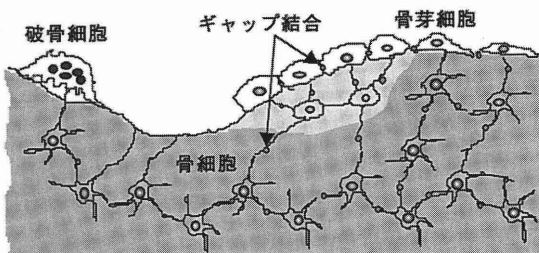


Fig. 1 骨組織における細胞間コミュニケーション

の GJIC と増殖との関連に着目し, 骨芽細胞の強力な増殖促進因子である basic fibroblast growth factor (bFGF) とフォルボールエステル (TPA) がどのように株化骨芽細胞 MC3T3-E1 の GJIC に影響を与えるかを検討した。

【方法】 Quiescent な MC3T3-E1 を各種濃度の bFGF と TPA および, tyrosine kinase (TyrK) と protein kinase C (PKC) の阻害剤で任意時間処理した。GJIC の測定は, レーザーサイトメーター ACAS を用いて行った。(Fig. 2)。ギャップ結合の主要な構成蛋白質であるコネクシン 43 (Cx43) の変化については, 抗 Cx43 抗体を用いた Western blot 分析, および Cx43 の cDNA プロンプを用いた Northern blot 分析により検討した。

【結果・考察】 MC3T3-E1 の GJIC は細胞同士が接触し始める頃から観察され始め, confluent になり alkaline phosphatase 活性が上昇するとともに増加した (data not shown)。これは, GJIC と骨芽細胞の分化との間の正の相関を示している。そこで, 骨芽細胞の分化と相反する増殖と GJIC の関連を知るために, TPA と bFGF の GJIC への影響を調べた。TPA と bFGF は添加後 24 時間で, 濃度依存的に DNA 合成を促進した。一方, GJIC は, TPA と bFGF により, 濃度依存的に抑制され, MC3T3-E1 の増殖に伴い, GJIC が抑制されること

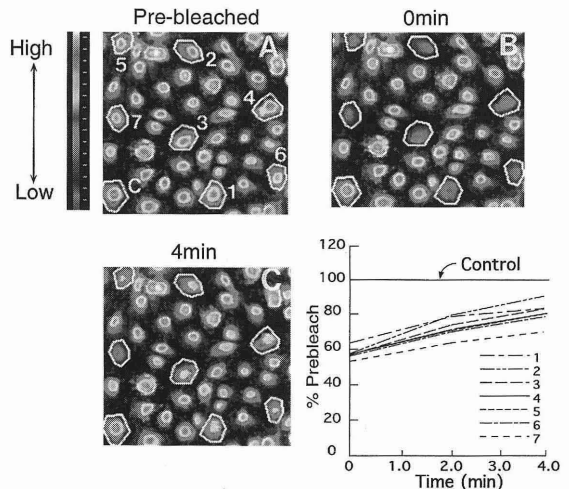


Fig. 2 ACAS 570 を用いた, GJIC の測定  
 (A) Confluent 状態の MC3T3-E1 細胞に蛍光色素 (CFDA) を一様に取り込ませる。ACAS 570 にて scanning し, 任意細胞 (#1-7) を選択する。C はコントロールの細胞を示す。(B) レーザーにて, 任意細胞の CFDA を消光する。(C) 隣接する細胞と GJIC を持っていれば, 隣接細胞から CFDA が流入し蛍光強度が回復する。このときの蛍光強度回復速度を測定する。グラフは, 消光前の蛍光強度を 100% としたときの各細胞の蛍光強度の経時変化を示している。

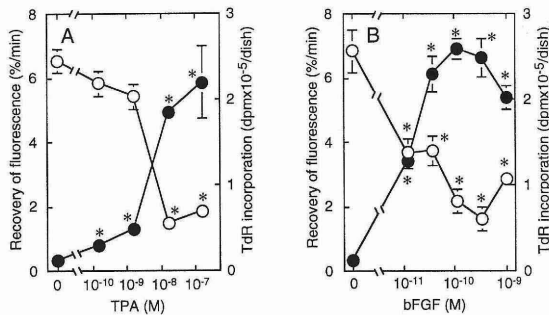


Fig. 3 MC3T3-E1 の GJIC 量 (○), DNA 合成 (●) に対する TPA (A) または bFGF (B) の効果。\* $p < 0.01$ , 未処理群との比較。

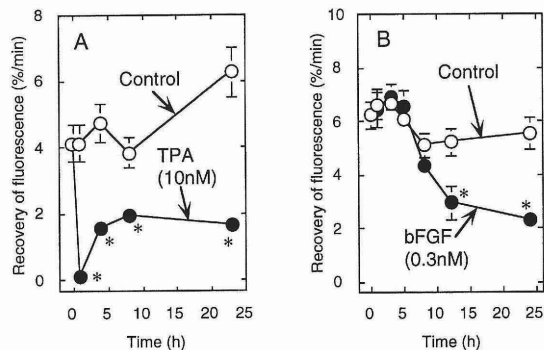


Fig. 4 TPA (A) または bFGF (B) の添加による, MC3T3-E1 の GJIC 量の経時的変化。\* $p < 0.01$ , 未処理群との比較。

が明らかとなった (Fig. 3)。経時的変化を見ると, TPA は処理後 1 時間で GJIC を大きく抑制し, その低レベルは 24 時間まで持続した (Fig. 4A)。しかし, bFGF では, 約 10 時間後から GJIC の抑制を認めた (Fig. 4B)。

Western blot 分析の結果から TPA の処理後 1 時間で, Cx43 はリン酸化され, SDS-PAGE 上で 43kDa の上方にシフトした。そして, 約 6 時間後から Cx43 の mRNA 量の減少とそれに伴う Cx43 蛋白質量の減少が認められた (Fig. 5A, 6A)。これより, TPA による短時間後の GJIC の抑制は, Cx43 のリン酸化に伴う質的变化から, さらにその後の抑制は Cx43 の量的な減少からもたらされることが示唆された。一方, bFGF では, TPA と同様に添加後 1 時間で Cx43 のリン酸化が認められたが, bFGF は TPA と異なり短時間で GJIC を抑制しないことから, TPA と異なったリン酸化様式が示唆された。処理約 6 時間後から, Cx43 の mRNA 量を減少し, その後, それに伴う Cx43 蛋白質量の減少が認められた (Fig. 5B, 6B)。これより, bFGF による GJIC の抑制は主に Cx43 の量的減少に起因すると考えられた。さらに, これらの GJIC 抑制効果, Cx43 の質的・量的変化は, TPA では PKC の阻害剤で, bFGF では TyrK の阻害剤で, それぞれ完全に解除された。

【結論】 bFGF と TPA は, それぞれ異なった様式

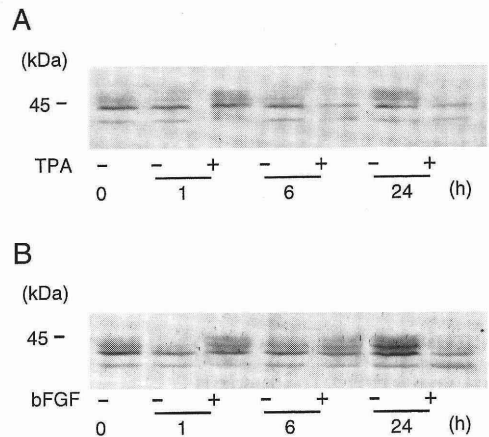


Fig. 5 TPA (10nM, A), bFGF (0.5nM, B) で各時間処理後, 細胞膜分画を調整し, Western blot 分析を行った。MC3T3-E1 の細胞膜上には分子量の異なる数種の Cx43 が存在する。このサンプルをアルカリ性ホスファターゼにより脱リン酸化すると 41kD の単一バンドになる (data not shown)。

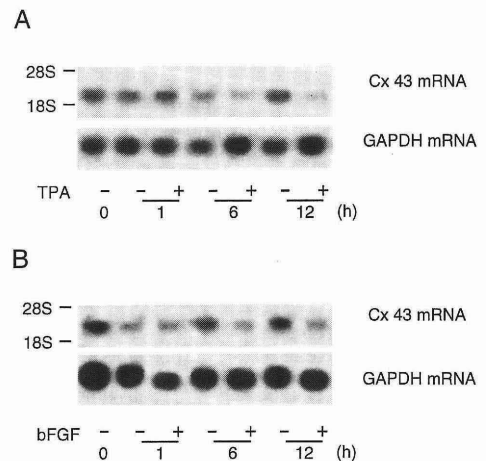


Fig. 6 TPA (10nM, A), bFGF (0.5nM, B) で各時間処理後, total RNA を抽出し, Northern blot 分析を行った。

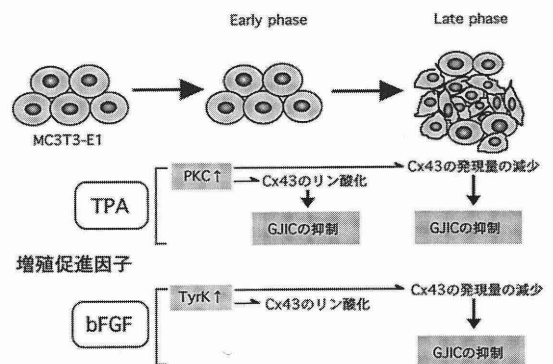


Fig. 7 TPA と bFGF による株化骨芽細胞 MC3T3-E1 の GJIC に対する抑制機構

(Fig. 7) で, 株化骨芽細胞 MC3T3-E1 の Cx43 の質的変化もしくは量的減少を引き起こし, GJIC を抑制する。