

たきざわ ふみお

氏 名 滝沢 史夫
学 位 博 士 (歯学)
学 位 記 番 号 新大院博 (歯) 第 30 号
学 位 授 与 の 日 付 平成 17 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 3 条第 3 項該当
博 士 論 文 名 Integrin $\alpha 7$ enables ligaments to inhibit mechanical stress-induced mineralization

インテグリン $\alpha 7$ は、靭帯において、メカニカルストレス誘導性の石灰化を抑制する

論文審査委員 主査 教授 川島 博行
副査 教授 吉江 弘正
教授 朔 敬

博士論文の要旨

研究の背景：

- ① 靭帯や腱は強力なメカニカルストレス (MS) に曝されているながら石灰化することはない。これは、MS に応答して石灰化する骨組織と対照的である。しかし、靭帯や腱が石灰化しない理由は不明である。
- ② *In vitro* では、歯根膜細胞や脊椎後縦靭帯細胞などが石灰化するというデータと石灰化しないというデータが報告されていて決着がつかない。

仮説：靭帯や腱が石灰化しないのは、骨芽細胞のように MS 刺激によって石灰化が誘導される細胞とは異なり、石灰化抑制機構が備わっているからである

研究の目的：

- ① 上記仮説の是非を確認する
- ② そのために、*in vitro* の実験系を確立する
- ③ 確立した実験系において靭帯細胞の MS 応答性を調べる
- ④ 確認された MS 応答性を担う分子とそのメカニズムを明らかにする
- ⑤ 明らかにされたメカニズムが *in vivo* で作動しているか否かを確認する

研究方法：

- ① MS 負荷：Flexer system、②石灰化の評価 (Alizarin red 染色)、③RT-PCR、④ Western blot analysis、⑤Reporter assay、⑥遺伝子発現制御 (RNAi など)、⑦ Immunoprecipitation assay、⑧Immunostaining、⑨In situ hybridization
- ⑩ von Kossa 染色等

研究結果：

- ① Flexer System を用いて MS に対する応答性を評価する実験系を確立した
- ② この実験系において、MS に応答して骨芽細胞の石灰化が亢進する
- ③ 靭帯細胞 PDL-L2 は MS 負荷下に培養しても石灰化することはない
- ④ 骨芽細胞では、MS 刺激応答した石灰化亢進に先立って、順次、FAK-ERK1/2-Runx2-オステオカルシン遺伝子発現の亢進が起こる

- ⑤ PDL-L2 ではこのような変化は一切起きない。従って、MS 刺激伝達過程のうち、FAK のリン酸化に至るステップが抑制されている
- ⑥ cDNA microarray により検討した結果、この分子メカニズムを説明する可能性を持つ分子として、その発現が PDL-L2 では高く MC3T3-E1 では検出できない integrin $\alpha 7$ に注目した。
- ⑦ integrin $\alpha 7$ の発現量を低下させると、PDL-L2 は石灰化するようになり、上記④のステップが活性化される
- ⑧ 逆に integrin $\alpha 7$ を過剰発現しても MS 刺激に応答した MC3T3-E1 の石灰化亢進は影響を受けない
- ⑨ Integrin $\alpha 7$ の細胞外ドメインを欠いた分子を過剰発現させると、このものはドミナントネガティブに働き、PDL-L2 においても MS に応答して Runx2 が活性化される。
- ⑩ Integrin $\alpha 7$ 欠損マウスの歯根膜や半月板では異所性石灰化が認められる

結論

- ① 靭帯細胞には、MS によって誘導される石灰化刺激を抑制する機構が存在する
- ② その分子メカニズムを担うのは、integrin $\alpha 7$ であり、integrin $\alpha 7$ によってリクルートされる靭帯細胞特異的分子（未同定）が FAK の活性化を抑制し石灰化に向かうシグナルを負に制御することが強く示唆される
- ③ integrin $\alpha 7$ を欠損させることにより靭帯や半月板に異所性石灰化が起こる
- ④ 脊椎後縦靭帯骨化症（OPLL）等の病因のひとつとして、この抑制機序の破綻が考えられる

審査結果の要旨

研究の背景および仮説について：

本研究の主たる対象は、靭帯・腱など硬組織同士または硬組織と筋肉とを結ぶ結合組織である。これらの結合組織と硬組織、筋肉は運動骨格系として強制的に働くが、いずれもその構造と機能を維持するためにメカニカルストレス（MS）による刺激が必須となっている。しかしながら、MS に対する応答性は著しく異なっている。すなわち、骨が MS に応答して石灰化するのに対し、靭帯や腱は決して石灰化することはない。この相違を説明するため、靭帯細胞は MS 誘導性の石灰化刺激に対する抑制機構を備えている、という仮説が提唱された。学位申請者が所属する研究グループは、歯根膜細胞（歯周靭帯細胞）を樹立し、この細胞は石灰化能を保持しているが、Msx2 を高発現しているために通常は石灰化しないことを明らかにしている。それとは独立な抑制機構が MS 刺激に対して作動している可能性について検討するのが本研究の目的である。研究の着想はユニークであり、石灰化の制御機構を明らかにする上で貴重なデータが得られる可能性が高い。

研究結果について：

靭帯細胞 PDL-L2 と骨芽細胞 MC3T3-E1 の MS に対する応答性を *in vitro* で比較することにより以下のような新知見が得られた。

- ① 靭帯細胞 PDL-L2 は MS 刺激下で培養しても石灰化することはない（新知見）
- ② 骨芽細胞において、MS によって活性化されるシグナル伝達系（既知）すなわち FAK-ERK1/2-Runx2-オステオカルシン遺伝子発現-石灰化は、MS 刺激下の靭帯細胞では活性化されない（このシグナル伝達系そのものは存在する）（新知見）

- ③ 上記シグナル伝達系の上流にあって MS を受容する分子の候補として インテグリンが想定されているが、PDL-L2 細胞には、骨芽細胞には発現していない integrin $\alpha 7$ が高レベルで発現している。In situ hybridization でマウスの組織を調べてみると、歯根膜やアキレス腱、半月板などに integrin $\alpha 7$ が発現していた (新知見)。
- ④ Integrin $\alpha 7$ の役割を調べるため、RNAi を用いて PDL-L2 の integrin $\alpha 7$ の発現量を低下させたところ、MS に応答して上記②のシグナル伝達系が活性化され石灰化が誘導された (新知見)。逆に、MC3T3-E1 に integrin $\alpha 7$ を発現させた場合には、MS 誘導性の石灰化は影響を受けなかった (新知見)。さらに、integrin $\alpha 7$ の細胞外ドメインを欠失した変異体を過剰発現すると、ドミナントネガティブに作用して PDL-L2 は Runx2 転写活性が上昇し石灰化するようになった (新知見)。

上記の結果から、integrin $\alpha 7$ が欠損している動物では靭帯の異所性石灰化が顕著に認められると予想される。実際、

- ⑤ integrin $\alpha 7$ KO マウスでは、歯根膜や半月板に石灰化が認められた (新知見)。

考察と結論：

文献的考察と研究グループの手持ちのデータを基に提唱された「靭帯細胞は MS 誘導性の石灰化刺激に対する抑制機構を備えている」という仮説は、in vitro および in vivo の詳細なデータによって、同機構が実際に作動していることが示され、その機構にかかわる分子のひとつが明らかにされた。本研究は、シグナル伝達を細胞特異的に制御する分子として integrin が作用し得ることを示した最初の例である。同様の機序が他の異なる細胞の機能を制御する可能性も強く示唆され、細胞の機能やシグナル伝達の制御に関して、新しいメカニズムを提示した点で意義がある。Integrin $\alpha 7$ と協同して作用することが想定される靭帯細胞特異的分子を同定することは、本研究をさらに進めて、MS 応答性シグナル伝達制御の詳細を解明するために必須のことであり、今後の発展が期待される。また、本研究の成果は、OPLL の病因解明や骨の石灰化の制御に関する研究についても新しい展開方向を示すものとして注目される。

このように、本研究は、独創性、データの質・量 とともにきわめて高く、学位論文として相応しいものと判定する。