

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 井田 貴子
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第339号
学位授与の日付 平成28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 Extracellular Matrix with Low Collagen Cross-links Affects Differentiation of Bone-associate Cells (コラーゲン・クロスリンクが低下した細胞外マトリックスは骨関連細胞の分化に影響を及ぼす)

論文審査委員 主査 教授 織田 公光
副査 教授 魚島 勝美
副査 教授 大峽 淳

博士論文の要旨

【緒言】

コラーゲン・クロスリンクはコラーゲンの翻訳後修飾によって付与される2次的な構造であり、コラーゲン分子間を強固に架橋することから、骨の機械的特性に影響を及ぼす因子の一つとしても重要である。さらに近年の研究から、細胞の活性にとってその周囲環境を構成する細胞外マトリックスの構成要素ならびにその2次構造が影響を及ぼすことが明らかとなりつつある。そこで、本研究ではコラーゲン・クロスリンクが骨の局所的なリモデリングに及ぼす影響を明らかにする為に、クロスリンクの減少が骨のリモデリングに関わる骨芽細胞、破骨細胞、骨髄由来間質細胞の分化に及ぼす影響を解析した。

【方法】

クロスリンク阻害剤である β -aminopropionitrile (BAPN, 0 - 2.0 mM) が前骨芽細胞株 (MC: MC3T3-E1) に及ぼす影響を、MTS法による細胞増殖能およびrealtime PCRによる遺伝子発現解析にて評価した。MCをBAPN存在下に2週間培養し、クロスリンクの程度が異なるマトリックスを得た。得られたマトリックスのクロスリンク評価は、Picrosirius red染色、SDS-PAGE、HPLCにて行った。細胞成分をDeoxycholateにて除去したマトリックス上にMC、前破骨細胞株 (RAW264.7)、マウス骨髄由来間質細胞 (BMSCs) を各々播種した。骨芽細胞分化はAlkaline phosphatase (ALP) 活性および遺伝子発現解析にて評価した。RAW264.7の破骨細胞分化はTartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色および遺伝子発現解析にて評価した。BMSCsについては、細胞接着能の評価ならびに骨芽細胞分化の評価を行った。また、4週齢のC57BL/6JマウスをBAPN含有飼料 (0.1%および0.25%) またはコントロール飼料にて8週間飼育し、クロスリンク形成不全マウスを作製した。通常飼料に戻した後、0, 2, 4週間後に屠殺し、上腕骨はHPLCによるクロスリンク解析、大腿骨はマイクロCTによる骨形態計測、組織解析を行った。

【結果】

BAPN添加によりMCの増殖能およびRunx2/Cbfa1、Col1a2遺伝子発現量に影響は認めなかったが、Lox遺伝子発現量はBAPN濃度依存的に上昇した。BAPNの添加によって得られたマトリックスは0.5 - 1.0 mMの濃度ではコラーゲンの産生量に影響を及ぼさずクロスリンクの形成を阻害した。特に1.0 mMではコントロールで検出されたクロスリンク (Pyridinoline, DHLNL, HLNL) 量は検出限界以下まで抑制された。クロスリンクの低下したマトリックス上に播種したMCでは増殖能、Alpl、Col1a2、Spp1遺伝子発現量、ALP活性の上昇が認められた。RAW264.7においては、TRAP陽性細胞数およびCtsk、Nfatc1遺伝子発現量の上昇が認められた。BMSCsに関しては、初期の細胞接着数の上昇、骨芽細胞分化誘導後の細胞増殖能、ALP活性、Alpl、Col1a2、Spp1遺伝子発現量においても上昇が認められた。一方、マウスにおける8週間のBAPN含有飼料の投与により各群間で体重変化は認められず、骨中のコラーゲン量にも影響は認められなかったが、クロスリンク量は有意に減少した。骨形態計測解析においては、BAPN

摂取群で骨組織体積および骨表面積の増加が認められたものの、骨密度や骨量に関わるパラメータに影響は認められなかった。Picosirius red 染色により 8 週間の BAPN 含有飼料投与は濃度依存的に骨基質成熟度の低下を示した。通常飼料に戻して 4 週間後において BAPN 摂取群における骨芽細胞の活性は有意に上昇したものの破骨細胞の活性に変化は認められなかった。

【考察および結論】

本研究においてクロスリンク阻害剤である BAPN の投与により、コラーゲン産生量に影響を及ぼさずにクロスリンクの形成を阻害することが可能であった。さらにクロスリンクの低下したマトリックスは骨芽細胞、破骨細胞の分化、ならびに骨髄由来間質細胞の骨芽細胞分化を促進した。以上の結果からコラーゲン・クロスリンクは骨の機械的特性を担う構造としてのみならず、骨のリモデリングに関わる細胞の分化に影響を及ぼすことにより、骨代謝に関与する可能性が示唆された。現時点で細胞がコラーゲン・クロスリンクの変化を検出する分子メカニズムについては不明であるが、本研究で我々が見出した細胞外基質の 2 次構造の変化による細胞の分化制御は、局所的な骨代謝の制御メカニズムとしてだけでなく、骨関連疾患の治療標的ならびに細胞担体を用いた幹細胞の指向性分化制御という観点からも有用であると考えられる。

審査結果の要旨

臨床の現場においてインプラント埋入の際に骨量や骨密度の検査は行われているが、埋入部位における骨質の評価についてはほとんど行われていない。CT 検査によって得られるハンスフィールド・ユニットは一般に骨質と呼ばれるものの、これは骨密度を数値化したものであり、本来の骨質とは異なるものである。また現存する骨の状態のみならず将来的な骨代謝回転は、インプラントの長期予後を予測するうえで重要な情報となり得るものであるが、その詳細は依然として明らかではない。

コラーゲン・クロスリンクはコラーゲンの翻訳後修飾によって付与される 2 次的な構造であり、コラーゲン分子間を強固に架橋することから、骨の機械的特性に影響を及ぼす因子の一つとして重要である。本研究ではコラーゲン・クロスリンクが骨の局所的なリモデリングに及ぼす影響を明らかとする為に、クロスリンクの減少が骨のリモデリングに関わる骨芽細胞、破骨細胞、骨髄由来間質細胞の分化に及ぼす影響を解析している。

クロスリンク阻害剤である BAPN が前骨芽細胞株 (MC) に及ぼす影響を、細胞増殖能および遺伝子発現解析にて評価した。MC を BAPN 存在下にて 2 週間培養し、クロスリンクの程度が異なるマトリックスを得た。細胞成分を除去したマトリックス上に MC、前破骨細胞株 (RAW264.7)、マウス骨髄由来間質細胞 (BMSCs) を各々播種した。骨芽細胞、破骨細胞分化を評価し、BMSCs については、細胞接着能の評価ならびに骨芽細胞分化の評価を行った。4 週齢の C57BL/6J マウスを BAPN 含有飼料またはコントロール飼料にて 8 週間飼育し、クロスリンク形成不全マウスを作製し、HPLC によるクロスリンク解析、大腿骨はマイクロ CT による骨形態計測、組織解析を行った。

BAPN の添加によって得られたマトリックスはコラーゲン量の産生量に影響を及ぼさずにクロスリンクの形成を阻害した。クロスリンクの低下したマトリックス上に播種した MC では増殖能、骨芽細胞関連遺伝子発現量、ALP 活性の上昇が認められた。RAW264.7 においては、TRAP 陽性細胞数の上昇が認められた。BMSCs に関しては、初期の細胞接着数の上昇、骨芽細胞分化誘導後の細胞増殖能、ALP 活性においても上昇が認められた。マウスにおける 8 週間の BAPN 含有飼料の投与によりクロスリンク量は有意に減少した。BAPN 摂取群における骨芽細胞の活性は有意に上昇したものの破骨細胞の活性に変化は認められなかった。

骨の機械的特性の中でもその硬度は無機成分、弾性や靱性は有機成分が担うと言われている。米国の NIH Consensus 会議の報告では、骨の機械的特性の中で骨密度によって規定されない約 30% を “骨質” と定義し、これにはミネラルの配向、マイクロクラック、コラーゲン・クロスリンクなどが影響しているとされている。ごく最近、短期間 (3 週間) ではあるが BAPN を皮下投与した際の骨強度への影響を解析した論文が発表され、短期間の BAPN 投与により、クロスリンク量の低下と皮質骨の骨強度低下との相関性を明らかにしている。本研究では骨の機械的強度に関する直接的な検索は行っていないが、この報告と比べてクロスリンクの減少が顕著であることから

その機械的強度は更に低いであろうことが示唆される。細胞培養系ではクロスリンクが低下したマトリックス上の骨芽細胞および破骨細胞の活性がともに上昇した。一方、動物実験では骨芽細胞の活性が増加したものの、破骨細胞活性には影響が認められなかった。我々が使用した細胞実験系は骨組織とは異なり、石灰化物が存在しない、ほぼ有機成分のみで構成された環境であることから、クロスリンクの減少による細胞への影響をより直接的に解析する方法としては優れている。しかしながら実際の骨組織は石灰化組織であり、無機成分の存在が細胞活性に影響を及ぼす可能性も否定出来ない。さらに我々が使用した動物モデルでは、8週間のBAPN経口投与により、正常骨と低クロスリンク骨が混在する状態になっていると考えられる。骨芽細胞は低クロスリンクの新生骨上にさらに骨を添加し、破骨細胞は正常な既存骨を吸収する可能性が高いことから、動物モデルでは骨芽細胞に関するパラメーターのみに変化が見られたと考えられる。

一方、本研究ではBAPN投与による大腿骨の変化を解析しているが、歯科医師が臨床で対象とする組織は歯槽骨であり、大腿骨と歯槽骨では発生学的にもその由来は異なる。顎骨では長管骨に比べて未成熟なクロスリンクが多く、骨のリモデリングが早いことが報告されているばかりか、BP製剤に対する破骨細胞の挙動が異なると言われている。BAPN投与動物の歯槽骨における組織学的変化についても解析が必要であろう。さらに、本研究で示された結果は人為的にクロスリンクを変化させることにより、骨関連細胞の活性を制御できる可能性を示唆している。したがって骨再生の際に用いられるGTR膜や細胞移植担体として用いられるコラーゲン基質の架橋を改変することによって、より効果的な材料の開発に応用できる可能性が示唆される。

以上より、本研究はコラーゲン・クロスリンクが骨リモデリングに関わる細胞の分化に影響を及ぼすことにより、骨代謝に関与する可能性を示した研究として学術的意義は高く、学位論文としての価値を認める。