

(西口 美由季) 論文内容の要旨

Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via downregulation of RANKL, M-CSF and fibronectin expression in osteoblasts

アメロジェニンとは、骨芽細胞における RANKL, M-CSF, fibronectin 発現の抑制を通じて、破骨細胞分化の負の調節を行なう因子である

Miyuki Nishiguchi, Kenji Yuasa, Kan Saito, Emiko Fukumoto, Aya Yamada, Tomokazu Hasegawa, Keigo Yoshizaki, Yoko Kamasaki, Kazuaki Nonaka, Taku Fujiwara, Satoshi Fukumoto

(掲載雑誌名・ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY 52 巻 3 号, 237-243, 2007 年)

[7 ページ]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員：藤原 卓 教授)

緒言

アメロジェニンはエナメル芽細胞から産出され、エナメル質の石灰化と成熟の進行に関連する代表的なエナメル質タンパクの一つであり、そのノックアウトマウスでは、エナメル質の形成不全と共に、破骨細胞を誘導する因子である RANKL の発現の増加と破骨細胞の顕著な増加、それに伴う歯根セメント質の吸収が認められる。このことから、アメロジェニンが破骨細胞形成の抑制因子として作用していることが示唆される。破骨細胞は TNF- α ファミリーに属する RANKL が破骨細胞前駆細胞上の受容体に接着し、幾つかのシグナル伝達を活性化することで分化が導かれること、その際にはマクロファージの成熟に必要な M-CSF が必要であるということが明らかにされている。しかし、破骨細胞に対するアメロジェニンの分子メカニズムは未だ解明されていない。そこで本研究では、破骨細胞形成過程におけるアメロジェニンの役割を、*in vitro* での破骨細胞分化モデルを用いて解析した。更に fibronectin による RANKL, M-CSF 遺伝子の発現の調節について検討した。

対象と方法

骨芽細胞はマウス頭蓋冠より、また破骨細胞の前駆細胞を含む骨髄細胞は 4 週齢の雄のマウスの頸骨と大腿骨より調製した。組み換えアメロジェニンタンパク質は大腸菌 BL21 株に発現されたものを精製して使用した。

1. 骨芽細胞へアメロジェニンを濃度別に添加して培養し, RANKL, M-CSF, fibronectin の発現の変化と経時的な発現の変化を RT-PCR にて検討した。 2. 骨髄細胞へアメロジェニンを添加した群, RANKL, M-CSF を添加した骨髄細胞へアメロジェニンを添加した群, 骨芽細胞と骨髄細胞の共培養系へアメロジェニンを添加した群における破骨細胞形成能を TRAP 染色にて評価した。 3. 骨芽細胞を fibronectin でコートした培養皿にて培養し, RANKL, M-CSF の発現を RT-PCR にて検討した。 4. fibronectin siRNA によるノックダウン実験にて, 骨芽細胞での fibronectin 発現の減少が RANKL, M-CSF 発現に与える影響を検討した。

結果

1. アメロジェニン添加は骨芽細胞上の RANKL, M-CSF の発現を濃度依存的に抑制した。fibronectin 発現の抑制も同様に認められた。また経時的な発現の減少も示した。 2. 骨髄細胞単独培養では TRAP 陽性細胞は認められなかった。RANKL, M-CSF 存在下では, 骨髄細胞は TRAP 陽性細胞の形成が認められた。しかし, RANKL, M-CSF の存在下の骨髄細胞へアメロジェニンを添加しても, TRAP 陽性細胞数は同程度であり, 破骨細胞形成の抑制は認められなかった。一方, 骨芽細胞と骨髄細胞の共培養系では, 骨芽細胞へアメロジェニン前処理を行なうと有意に破骨細胞形成を抑制したが, 共培養後にアメロジェニンを添加しても破骨細胞形成の抑制は認められなかった。 3. 骨芽細胞における RANKL, M-CSF 発現は, fibronectin 依存的に増加し, 特に RANKL は通常の 2 倍程度にまで誘導された。 4. 逆に骨芽細胞から発現される fibronectin を siRNA を用いて抑制すると, fibronectin の抑制量に比例して RANKL, M-CSF の発現が減少した。骨芽細胞にアメロジェニンを添加し, 培養すると RANKL の発現は抑制されたが, 骨芽細胞に fibronectin 添加後に, アメロジェニンを添加しても骨芽細胞における RANKL 発現は抑制されず, TRAP 陽性多核細胞形成の抑制も認められなかった。

考察

アメロジェニンによる破骨細胞形成の抑制効果は, 直接破骨細胞前駆細胞に作用するのではなく, 骨芽細胞での RANKL, M-CSF および fibronectin の発現抑制によって, 二次的に分化抑制が起こっていることが示唆された。骨のリモデリングにおいて, アメロジェニンは骨芽細胞における RANKL らの発現に関与するシグナル分子である fibronectin の発現を調整することで破骨細胞形成を抑制することが示唆された。今回の破骨細胞分化における抑制効果についての結果からアメロジェニンには病的な骨破壊の抑制治療に応用できる可能性があると考えられた。