

ヒト顎骨由来骨芽細胞における Melatonin による Runx2 発現誘導メカニズム
の解析

主指導教員：菅井 基行客員教授
(国立感染症研究所 薬剤耐性学)

副指導教員：谷本 幸太郎教授
(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：武知 正晃准教授
(医系科学研究科 口腔外科学)

室積 博
(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

I. 緒言

松果体より分泌されるホルモンである Melatonin (MEL)は、概日リズムの調整をはじめとして、神経保護作用や腫瘍抑制作用などの様々な働きを有する(1). また、MEL は未分化間葉系細胞の分化や前骨芽細胞の分化を促進し、骨形成に重要な役割を担う (2,3). さらに MEL は、in vitro にてマウス骨芽細胞(MC3T3-E1)の石灰化能の亢進に関与し、インプラント周囲の新生骨の形成やオッセオインテグレーションの促進に関与することが明らかとなった(4,5).

TGF- β は、MAPK-ERK シグナル伝達経路を介して、骨芽細胞の分化や石灰化の制御に関与している(6). しかしながら、MEL によって促進される石灰化と TGF- β により活性化される MAPK-ERK シグナル伝達経路との関係については不明である. また、microRNA (miRNA) は様々な遺伝子発現の制御を行うことにより、分化や発生の調節に重要な役割を担っている(7). 骨芽細胞においては、miRNA が Runx2 の発現を制御することにより、骨分化の調節に関与するとの報告がある(8). しかしながら、MEL により誘導される骨芽細胞の石灰化に miRNA がどのように関与しているかは未だ明らかでない. そのため本研究では、ヒト顎骨由来骨芽細胞を用いて、MEL による Runx2 の発現誘導メカニズムを明らかとし、さらに MEL により発現誘導される miRNA の役割について検討することとした. また、連通多孔体ハイドロキシアパタイト(Interconnected Porous Hydroxyapatite Ceramics : IP-CHA)は、優れた骨伝導能を有する骨補填材として広く臨床応用されている. MEL などの骨形成に関係する因子を IP-CHA 内に導入することにより、さらに骨芽細胞の石灰化能がより促進される可能性があると考えられる. そのため今回、MEL 徐放能を有する IP-CHA を作製し、IP-CHA 内で培養したヒト顎骨由来骨芽細胞の石灰化能について検討を行なった.

II. 実験材料および実験方法

1. 細胞培養

広島大学疫学研究倫理審査委員会の承認のもと、患者より事前に同意を得て、口腔顎顔面再建外科における手術の際に無菌的に採取したヒト正常顎骨由来の小骨片を用いて、エクスプラント法によりヒト顎骨由来骨芽細胞(以下、hOB細胞と略記する)の初代培養を行なった。T-75 組織培養用フラスコ(Greiner Bio One, Duesseldorf, Germany)に2~3 mm四方大に細断した組織片を静置し、培地には10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した α 変法イーグル培地(α -Minimum Essential medium:以下 α -MEM培地と略記する; SIGMA)を使用した。組織片細胞を0.05%トリプシン-EDTA(SIGMA)を用いて回収し継代培養を行なった。培養系は95%air, 5%CO₂, 37°Cの条件下で維持し、本実験では3~6継代細胞を用いた。hOB細胞を分化するため、L-アラニン-L-グルタミンを含む石灰化誘導培地(MSCgo™ OsteogenicXF, Biological Industries)で培養を行なった。1.0 μ M MEL(Sigma-Aldrich)およびTGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 5.0 ng/mlで72時間処理し細胞を回収した。

2. RNA抽出およびReal time-PCR法

hOB細胞からRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、Total RNAを抽出した。抽出したRNAの濃度をナノドロップ(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)により測定した。Total RNA 1 μ gをテンプレートとしてRever Tra Ace 1 μ l, RNAase inhibitor 1 μ l, 5 \times RT buffer 4 μ l, dNTP 2 μ l, Random primer 1 μ lを加えた反応液で逆転写反応を行なった。30°C10分, 42°C20分, 99°C5分, 4°C5分をMaster cycler gradient(Eppendorf, Hamburg,

Germany)を用いて実施し、20 μ L の 1 本鎖 cDNA を得た。cDNA 1 μ l, THUNDERBIRD SYSER qPCR Mix(TOYOBO) 10 μ l, 標的遺伝子特異的プライマー (sense, antisense を各 1 μ l), DDW 7 μ l を用いて, CFX connect real-time PCR detection system (BioRad, Hercules, CA, USA) にて遺伝子発現量を解析した。標的遺伝子の発現量は, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (以下 G3PDH と略記) の発現量を基準として標準化した。PCR プログラムは, 95 $^{\circ}$ C 10 分の後, 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 58 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 40 秒の反応を 40 サイクル行なった。使用したプライマー(北海道システムサイエンス)の塩基配列は表 1 に別記した。

3. タンパク質抽出および Western blotting

細胞をPBSにて洗浄後, 0.05%トリプシン-EDTA (SIGMA) により細胞を剥離, 回収し4 $^{\circ}$ C, 15000rpmにて5分間遠心しペレットを得た。タンパク抽出には Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma-Aldrich)を用いた。1%プロテアーゼインヒビター(Roche, Indianapolis, IN, USA)を添加した100 μ Lの氷冷Lysis bufferを回収したペレットに添加し, 100回ピペッティングを行い, 60分氷上にて振盪した後, 4 $^{\circ}$ C, 13000rpmにて10分遠心後, 上清をサンプルとして回収した。サンプルのタンパク質濃度はProtein Assay (Bio Rad, Hercules, California, USA)を用いて定量した。抽出した各種サンプルに5 \times sample buffer (1M Tris-HCL pH6.8, 10%SDS, glycerol, 5% 2-メルカプトエタノール, ブロモフェノールブルー)を加えた後, 95 $^{\circ}$ Cで5分加熱し, ただちに4%スタッキングゲル, 10%ランニングゲルを用いて電気泳動を行なった。サンプルはImmobilon-P PVDFメンブレン (Millipore corporate Headquarters, Billerica, MA, USA)に転写後, ブロッキングワンプ (ナカライテスク, 京都)により室温にて1時間ブロッキング

を行なった。1次抗体 anti-human Runx2 mouse monoclonal (Abcam, Cambridge, UK), anti-human ERK1/2 rabbit monoclonal (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-human phosphorylated-ERK1/2 rabbit monoclonal (Cell Signaling Technology), anti-human Smad2 rabbit monoclonal (Cell Signaling Technology), anti-human Smad3 rabbit monoclonal (Cell Signaling Technology), anti-human phosphorylated-Smad2 rabbit monoclonal (Cell Signaling Technology), anti-human phosphorylated-Smad3 rabbit monoclonal (Cell Signaling Technology) の抗体反応は各抗体に添付された条件に従い、5%牛血清アルブミンを含む TBS-T (20mM Tris-HCL (pH7.6), 0.14M NaCl, 0.05% Tween-20)にて4°Cで over nightにて行なった。

2次抗体反応はECL Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Whole Antibody (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京)をTBS-Tにて1000倍希釈した反応液を用いて室温60分にて行なった。2次抗体反応後, TBS-Tにて洗浄し, ECL TM Plus Western blotting system (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社)を発光基質として添加し, LAS 4000 mini (Fuji film, 東京)を用いて発光シグナルを検出した。NIH ImageJ (Version 1.47)を用いて, Western blotting により得られたバンドの濃度を測定し、タンパク質発現を定量化した。

4. 蛍光免疫染色法

24 Well Cell Culture Plate (CELLSTAR)に播種した細胞を、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて30分固定した。0.2% Triton X-100を用いて膜透過処理を行い、5%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline ; 以下 PBS と略記する)を用いてブロッキングを行い、1:1000倍希釈した1次抗体 Alexa Fluor® 488 anti-Runx2 rabbit monoclonal antibody

(abcam)を、室温で over night で反応させた。PBS にて洗浄後、1%牛血清アルブミンを含む PBS にて 1 : 500 倍希釈した蛍光標識 2 次抗体 (Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本)および 1 : 500 倍希釈した Alexa Fluor 568 phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を遮光下、室温で 1 時間反応させた。核染色は VECTASHIELD WITH DAPI (Vector Laboratories, CA, USA) にて行い、蛍光励起および位相差画像を蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE, 大阪) を用いて撮影した。

5. siRNA による遺伝子ノックダウン

Lipofectamine RNAi MAX (Life technologies, Carlsbad, USA)を用いて、製品マニュアルに従い、siRNA によるノックダウンを行なった。Opti-MEM 培地に Smad2, Smad3, Notch2 Stealth siRNA (Life technologies), Lipofectamine RNAi MAX を各々溶解し、20 分反応させた。その後、hOB 細胞に添加し 48 時間導入を行なった。Smad2, Smad3, Notch2 のノックダウンは Western Blotting にて確認した。Negative コントロールとして、Stealth RNAi Negative コントロール (Life technologies)を用いた。

6. miRNA inhibitor および mimic の導入

LipofectamineTM RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本)を使用して、製品マニュアルに従って、細胞に miRNA inhibitor または miRNA mimic を導入した。miR-181c-5p mirVanaTM miRNA inhibitor (Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本)および mirVanaTM miRNA inhibitor Negative コントロール (Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本)を最終濃度 10nM で使用し、miR-181c-5p mirVanaTM miRNA mimic (Thermo Fisher

Scientific, 東京, 日本)を最終濃度100nMにて使用した.

7. Alkaline Phosphatase (ALP)活性の測定

ALP活性は, TRACP&ALP Assay Kit (Takara, 大阪, 日本)を用いて行なった. 細胞を生理食塩液で洗浄後, キットに含まれる細胞抽出用溶液を加え攪拌し, 反応基質溶液を加え, 37°C, 60分反応させ, マイクロプレートリーダー(BioRad Laboratories)を用いて, 波長405nmにおける吸光度を測定した.

8. Alizarin red S 染色と定量化

細胞をPBSで2回洗浄した後, 10%中性緩衝ホルマリンで30分間固定を行なった. 固定処理後0.5%Alizarin red S/ PBS溶液を加え, 45分間室温にて緩やかに振盪し, 石灰化基質を測定した. また, 染色性を評価するため, 10%酢酸および20%エタノール混合液を添加し, 室温にて15分静置した. 得られた抽出液を96 Well Cell Culture Plate(CELLSTAR)に播種し, マイクロプレートリーダー(BioRad Laboratories)を用いて, 波長405nmにおける吸光度を測定した.

9. miRNA 発現のマイクロアレイ分析

Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 array を使用して miRNA 発現解析を行なった. RNaseH および DNA ポリメラーゼを用いて, Single-strand cDNA を増幅させた. マイクロアレイへのハイブリダイゼーションを行なった後にアレイの染色と洗浄を行なった. GeneChip Scanner (Affymetrix, Inc.) を使用して画像をスキャンした. Affymetrix Gene Chip Command Console ソフトウェアを使用してデータの解析を行なった.

10. 連通多孔体ハイドロキシアパタイト

連通気孔を有するハイドロキシアパタイト (エム・エム・ティー社 (大阪)) を使用した. IP-CHA は気泡ゲル化技術の応用により製造され, 三次元連通気孔構造による高い気孔率および高い機械的強度を特徴とする. 本研究では, ディスク状(直径 7 mm × 高さ 5 mm)の IP-CHA を用いた.

11. MEL 含有 IP-CHA の作製および hOB 細胞の導入

MEL(M5250-1g; Siguma-Aldrich, 東京)をジメチルスルホキシド(13406-55; ナカライテスク, 京都)に溶解し, PBS で希釈することにより 1 μ M および 10 μ M 濃度に調整した. 1 μ M および 10 μ M 濃度の MEL 溶液に IP-CHA を浸漬後, 常温にて 100mmHg の真空に 24 時間静置することにより, MEL 含有 IP-CHA を作製した. また, MEL 含有 IP-CHA 上に, α -MEM 培地を用いて懸濁した hOB 細胞を滴下し, 48 時間細胞培養を行うことにより, 細胞導入を行なった.

12. MEL 含有 IP-CHA の MEL 徐放能の測定

1 μ M および 10 μ M 濃度の MEL 溶液に浸漬させ作製した MEL 含有 IP-CHA を α -MEM 培地中に静置し, 培地を回収した. 培地は 4 日毎に交換を行い, 28 日間継続して培地交換を行なった. 採取した培地は, Melatonin ELISA kit (cat no ab213978; Abcam, Cambridge, UK)を使用して, 製品マニュアルに従って, MEL の濃度を測定した.

13. 走査型電子顕微鏡による観察

IP-CHA を 10%中性緩衝ホルマリンで 30 分間固定を行なった. IP-CHA を PBS で洗浄した後, 上昇エタノール系列 (50%, 60%, 70%, 85%, 90%, 95%,

100%)で脱水，乾燥後に走査型電子顕微鏡(VE-8800, KEYENCE, 大阪)にて観察を行なった。

14. 統計解析

全ての検定はサンプル数または症例数を 3 以上で行い，標準偏差は±，サンプル数または症例数は n にて示した。得られたデータの統計的有意性は，2 群間比較に Student's t-test を用いて解析し，P value<0.05 の場合を有意差ありとした。

III. 結果

1. ヒト顎骨由来骨芽細胞(hOB 細胞)の樹立

小骨片を細胞培養用フラスコに静置し，培養開始 7 日で小骨片周囲に細胞の遊走が確認された(図 1A)。細胞は線維芽細胞様の紡錘形を示した(図 1B)。石灰化誘導培地で培養し，培養 14 日目には，石灰化を示す Alizarin red S による染色が確認され(図 1C)，ヒト顎骨由来の骨芽細胞であることを確認した。さらに，ALP および Runx2 の mRNA 発現を認めた。

2. MEL 含有 IP-CHA の MEL 徐放能の検討

1 μ M 濃度の MEL 溶液に浸漬した IP-CHA において，4 日目では 31.5ng/ml，8 日目では 32.8 ng/ml，12 日目では 6.2ng/ml，16 日目では 1.5ng/ml の MEL の徐放を認めた。20 日目では MEL の徐放は確認されなかった(図 2A)。10 μ M 濃度の MEL 溶液に浸漬した IP-CHA において，4 日目，8 日目では MEL の濃度測定は困難であったが，12 日目では 522.4ng/ml，16 日目では 405.3ng/ml，

20 日目では 112.4ng/ml, 24 日目では 30.5ng/ml, 28 日目では 5.3ng/ml と, 高濃度の MEL が長期間放出されることが確認された(図 2B).

3. SEM による形態観察

MEL 非含有 IP-CHA と, 1 μ M および 10 μ M 濃度の MEL 溶液に浸漬した MEL 含有 IP-CHA 上に hOB 細胞を播種し, α -MEM 培地で 2 日間培養後, SEM にて細胞の形態観察をしたところ, いずれの IP-CHA 内においても hOB 細胞が確認された(図 3A, 3B, 3C).

4. MEL 含有 IP-CHA 内で培養した hOB 細胞の石灰化能の検討

MEL 含有 IP-CHA または MEL 非含有 IP-CHA で hOB 細胞を 14 日間培養し, IP-CHA の水平断面を Alizarin red S にて染色した結果, 1 μ M MEL 含有 IP-CHA および 10 μ M MEL 含有 IP-CHA の水平断面において Alizarin red S のより強い染色性が確認された(図 4A). Alizarin red S を可溶化し, 比色定量法により OD 値を測定した結果, 1 μ M MEL 含有 IP-CHA および 10 μ M MEL 含有 IP-CHA の OD 値は, MEL 非含有 IP-CHA と比較して有意に高かった(図 4B).

5. TGF- β 1 が MEL により誘導される石灰化能および Runx2 発現に及ぼす影響

hOB 細胞における TGF- β 1 による ALP 活性および石灰化への影響について検討したところ, ALP mRNA 発現および ALP 活性は, TGF- β 1 存在下でコントロールと比較して有意に低下した(図 5A, 5B). さらに, TGF- β 1 によって低下した ALP mRNA 及び ALP 活性は TGF- β inhibitor により有意に増加した(図 5A, 5B). MEL 存在下で, TGF- β 1 により抑制された石灰化能は, TGF- β inhibitor により増加した(図 5C, 5D). 続いて, 1 μ M 濃度の MEL 溶液に浸漬した IP-CHA

内で培養した hOB 細胞において、蛍光免疫染色を用いて Runx2 発現を検討したところ、気孔内に存在する hOB 細胞の核内において Runx2 発現が確認された(図 6A). さらに、MEL により誘導された Runx2 発現は、TGF- β 1により減弱し、TGF- β inhibitor により発現増加が確認された(図 6B). また、MEL による Runx2 発現誘導について検討したところ、MEL により Runx2 mRNA 発現およびタンパク質発現は有意に増加し、TGF- β 1により有意に減少した. さらに、TGF- β inhibitor を添加したところ、TGF- β 1により減少した Runx2 mRNA 発現およびタンパク質発現は増加した(図 7A, 7B).

6. TGF- β 1が SMAD シグナル伝達経路に及ぼす影響

hOB 細胞において、TGF- β 1が Smad2/3 に及ぼす影響について検討した. 24時間 TGF- β 1で処理後、Smad2/3 のリン酸化レベルは増加した(図 8A, 8B, 8C). Smad2/3 のノックダウン hOB 細胞において、Runx2 mRNA 発現および石灰化能を検討したところ、有意な変化は認めなかった(図 9A, 9B).

7. TGF- β 1が ERK シグナル伝達経路に及ぼす影響

hOB 細胞において、24 時間 TGF- β 1で処理後、ERK のリン酸化レベルは有意に増加した(図 10A, 10B, 10C). また、MEL 存在下で、TGF- β 1によって抑制された Runx2 発現は、ERK inhibitor の添加により有意に増加した. さらに、MEL 存在下で TGF- β 1によって抑制された石灰化能は、ERK inhibitor の添加により有意に促進された(図 11A, 11B, 11C, 11D).

8. miR-181c-5p が Runx2 発現および石灰化能に及ぼす影響

MEL により誘導される miRNA の網羅的発現解析を行なったところ、2 倍以

上発現が増加した miRNA を 17 種, 0.5 倍以下に発現が減少した miRNA を 13 種同定した(表 2, 表 3). その中で miR-181c-5p はコントロールと比較して 4.57 倍と最も高い発現を認めた(表 2). 続いて, miR-181c-5p が hOB 細胞の Runx2 発現に及ぼす影響を検討したところ, miR-181c-5p 過剰発現細胞では, コントロールと比較して Runx2 mRNA 発現の有意な増加を認めた. 一方で, miR-181c-5p ノックダウン細胞では, コントロールと比較して Runx2 mRNA 発現の有意な減少を認めた(図 12A, 12B). さらに石灰化能への影響について検討したところ, miR-181c-5p 過剰発現細胞ではコントロールと比較して, 7 日間で石灰化が有意に促進された. 一方で, miR-181c-5p ノックダウン細胞では, コントロールと比較して, MEL による石灰化の促進は認めなかった (図 13A, 13B, 13C, 13D).

9. miR-181c-5p の標的遺伝子の検討

miR-181c-5p の標的遺伝子を検討するため, TargetScan v7.0(targetscan.org) を用いて解析を行なったところ, Notch2 が miR-181c-5p と相補的な塩基配列を有することが明らかとなった(図 14A). miR-181c-5p 過剰発現細胞では, コントロールと比較して Notch2 mRNA 発現の有意な減少を認め, さらに Notch2 タンパク質発現は, miR-181c-5p 過剰発現細胞において有意な減少を認めた(図 14B, 14C, 14D). 続いて, Notch2 siRNA ノックダウン細胞における Runx2 発現および石灰化能について検討したところ, Notch2 siRNA ノックダウンにより Runx2 mRNA およびタンパク質発現は有意に増加し, hOB 細胞の石灰化能は Notch2 ノックダウンにより有意に促進された (図 15A, 15B, 15C, 15D, 15E).

IV. 考 察

MEL は前骨芽細胞や間葉系細胞の骨細胞への分化を促進し BMP/ERK/Wnt シグナル伝達経路を介して骨芽細胞の石灰化を促進する(2,3,9). 今回の研究結果から、ヒト顎骨由来骨芽細胞において、MEL は miR-181c-5p の発現増加を介して、Runx2 の発現を誘導することにより、骨芽細胞の石灰化を促進することが明らかとなった. miRNA は、分化や発生の調節に重要な役割を担っており、骨芽細胞の分化を調節する働きをもつことがこれまで報告されてきた. そのなかでも、miR-210 はマウス間葉系細胞の骨分化を促進し、miR-125b は分化の抑制に関与する (10, 11). また、マウス骨芽細胞では、BMP2 によって誘導された骨芽細胞の分化は、miR-208 による Ets1 の転写抑制を介して抑制される(12). さらに、miR-590-5p は Runx2 の発現を制御することにより、マウス間葉系細胞の骨分化に関与する (13). これまで、miR-181c-5p が癌細胞の化学療法抵抗性やアルツハイマー病および認知機能障害に関与することが報告されている(14,15). しかしながら、miR-181c-5p がヒト骨芽細胞の分化に関するとの報告はこれまでない. 今回の研究から、miR-181c-5p 過剰発現骨芽細胞は、コントロール細胞と比較して有意な石灰化能を示した. さらに、miR-181c-5p 過剰発現骨芽細胞は、MEL 存在下で培養した骨芽細胞や Notch2 ノックダウン骨芽細胞と比較しても、有意な石灰化能を示したことから、miR-181c-5p はヒト骨芽細胞の石灰化を促進する働きをもつ miRNA であると考えられる.

Notch シグナル伝達経路は様々な分化過程において重要な役割を担っており、Notch 受容体がりガンドである Jagged により活性化されることにより、Notch の細胞内ドメインが核内に移行し、遺伝子発現の制御を行う(16).

Notch シグナル伝達経路は骨芽細胞の分化の調節にも関与していると考えられており、Notch2 は骨分化および骨形成の抑制に重要な役割を担う(17,18).

Notch2 と miRNA との関係については、miR-758 が歯根膜幹細胞における Notch2 の発現を抑えることにより、骨関連遺伝子の発現を制御することが報告されている(19). 今回、ヒト骨芽細胞において miR-181c-5p が Notch2 発現を減少させることにより、Runx2 の発現が誘導され、骨分化が促進される可能性が示唆された. 今後は、miR-181c-5p 過剰発現細胞において Notch2 の転写活性について検討する必要があるが、今回の結果から、miR-181c-5p は Notch シグナル伝達経路を抑制することにより、ヒト骨芽細胞の骨分化を促進すると考えられた.

これまでの TGF- β の骨芽細胞に及ぼす影響を検討した研究では、TGF- β が骨芽細胞の分化や骨形成を促進あるいは抑制するといった異なる報告がされている(20,21,22). その理由として、実験に用いられた TGF- β の濃度の違いや、骨芽細胞の分化の程度が影響を与えたものと考えられる. TGF- β -Smad シグナル伝達経路は、骨芽前駆細胞の増殖や走化性および初期分化を促進する(6). 一方で、TGF- β -Smad シグナル伝達経路は、骨芽細胞の分化や骨細胞への分化を誘導する(6). 今回の研究より、MEL により誘導された Runx2 発現は、TGF- β -Smad シグナル伝達経路によって影響を受けなかった. 一方で、TGF- β 1により ERK のリン酸化が生じ、ERK inhibitor によって TGF- β 1により抑制された Runx2 発現は有意に増加したことから、ERK が MEL により誘導された骨分化を抑えることが示唆された. マウス骨芽細胞においても同様に、TGF- β 1が MAPK - ERK シグナル伝達経路を活性化することにより、骨芽細胞の分化を抑制している(23). 以上より、MAPK - ERK シグナル伝達経路はヒト顎骨由来骨芽細胞の分化における重要な抑制経路のひとつであることが

示唆された。

連通多孔体ハイドロキシアパタイトはすぐれた骨伝導能を有しており(5), MELなどの骨形成に関係する因子をIP-CHA内に導入することにより, さらに石灰化能が促進される可能性があると予測される。今回, MEL含有IP-CHAを作製した結果, 数週間にわたり高濃度のMELが徐放されることを確認した。MELの生体内での濃度については, 成人では夜間の血中濃度が約60pg/mlであると報告されている(24)。今回作成した10uM MEL含有連通多孔体ハイドロキシアパタイトの徐放濃度は, 最大で500ng/ml以上で, MEL含有IP-CHAからは, 成人の血中濃度と比較して高い濃度のMELが生体内に放出されると予測される。今後は, MEL含有IP-CHAブロックが生体組織に及ぼす影響を明らかにするため, *in vivo*にて詳細に検討を行う必要がある。MEL含有IP-CHAブロックの臨床への応用が可能となれば, 患者の顎骨由来骨芽細胞を導入したMEL含有IP-CHAブロックを, 顎骨欠損部位へ移植することにより, 骨欠損部位における速やかな骨再生が可能になると考える。

V. 結論

今回の研究から, ヒト顎骨由来骨芽細胞において, MELにより誘導されるmiR-181c-5pはNotch2を標的遺伝子とし, Notch2の転写を抑制することによりRunx2の発現を促進し, その結果としてヒト顎骨由来骨芽細胞の分化が促進されると考えられた。以上より, ヒト顎骨由来骨芽細胞におけるMELによるRunx2発現および石灰化誘導メカニズムが明らかとなった。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました、国立感染症研究所 薬剤耐性学 菅井基之客員教授、広島大学大学院医系科学研究科 歯科矯正学 谷本幸太郎教授、広島大学大学院医系科学研究科 顎顔面解剖学 寺山隆司教授、広島大学大学院医系科学研究科 公衆口腔保健学 太田耕司教授、広島大学大学院医系科学研究科 粘膜免疫学教室 飛梅圭准教授、広島大学大学院医系科学研究科 口腔外科学教室 武知正晃准教授に深謝いたします。

また、本研究遂行のためにご指導頂きました、公衆口腔保健学教室 重石英生講師、口腔外科学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を陰で支えてくれた両親および家族に心より感謝します。

VII. 参考文献

1. Liu C, Fukuhara C, Wessel JH 3rd, Iuvone PM, Tosini G: Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina: melatonin synthesis by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell Tissue Res* 315: 197-201, 2004.
2. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI: Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 274: 22041-22047, 1999.
3. Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen CT, Wei YH, Jockers R, Witt-Enderby PA: Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. *J Pineal Res* 49: 222-238, 2010.

4. Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M: Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *J Mater Sci Mater Med* 19: 2949-2952, 2008.
5. Rahman MZ, Shigeishi H, Sasaki K, Ota A, Ohta K, Takechi M: Combined effects of melatonin and FGF-2 on mouse preosteoblast behavior within interconnected porous hydroxyapatite ceramics - in vitro analysis. *J Appl Oral Sci* 24: 153-161, 2016.
6. Wu M, Chen G, Li YP: TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 26: 16009, 2016.
7. He L, Hannon GJ: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5: 522-531, 2004.
8. Narayanan A, Srinaath N, Rohini M, Selvamurugan N: Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation. *Life Sci* 232: 116676, 2019.
9. Park KH, Kang JW, Lee EM, Kim JS, Rhee YH, Kim M, Jeong SJ, Park YG, Kim SH: Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. *J Pineal Res* 51: 187-194, 2011.
10. Mizuno Y, Tokuzawa Y, Yatsuka-Kanesaki Y, Okazaki Y: miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett* 583: 2263-2268, 2009
11. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro

- H, Okazaki Y: miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 368:267-272, 2008.
12. Itoh T, Takeda S, Akao Y: MicroRNA-208 modulates BMP-2-stimulated mouse preosteoblast differentiation by directly targeting V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1. *J Biol Chem* 285:27745-27752, 2010.
 13. Narayanan A, Srinaath N, Rohini M, Selvamurugan N: Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation. *Life Sci* 232: 116676, 2019.
 14. Gao ZQ, Wang JF, Chen DH, Ma XS, Yang W, Zhe T, Dang XW: Long non-coding RNA GAS5 antagonizes the chemoresistance of pancreatic cancer cells through down-regulation of miR-181c-5p. *Biomed Pharmacother* 97: 809-817, 2018.
 15. Siedlecki-Wullich D, Català-Solsona J, Fábregas C, Hernández I, Clarimon J, Lleó A, Boada M, Saura CA, Rodríguez-Álvarez J, Miñano-Molina AJ: Altered microRNAs related to synaptic function as potential plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 11:46, 2019.
 16. Tu X, Chen J, Lim J, Karner CM, Lee SY, Heisig J, Wiese C, Surendran K, Kopan R, Gessler M, Long F: Physiological notch signaling maintains bone homeostasis via RBPjk and Hey upstream of NFATc1. *PLoS Genet* 8: e1002577, 2012.

17. Regan J, Long F: Notch signaling and bone remodeling. *Curr Osteoporos Rep* 11: 126-129 2013.
18. Yu W, Jiang D, Yu S, Fu J, Li Z, Wu Y, Wang Y: SALL4 promotes osteoblast differentiation by deactivating NOTCH2 signaling. *Biomed Pharmacother* 98: 9-17, 2018.
19. Peng W, Deng W, Zhang J, Pei G, Rong Q, Zhu S: Long noncoding RNA ANCR suppresses bone formation of periodontal ligament stem cells via sponging miRNA-758. *Biochem Biophys Res Commun* 503:815-821, 2018.
20. Zhang H, Ahmad M, Gronowicz G: Effects of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials. *Biomaterials* 24: 2013-2020, 2003.
21. Alliston T, Choy L, Ducey P, Karsenty G, Derynck R: TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 20: 2254-2272, 2001.
22. Kaji H, Naito J, Sowa H, Sugimoto T, Chihara K: Smad3 differently affects osteoblast differentiation depending upon its differentiation stage. *Horm Metab Res* 38: 740-745, 2006.
23. Sun X, Xie Z, Ma Y, Pan X, Wang J, Chen Z, Shi P: TGF- β inhibits osteogenesis by upregulating the expression of ubiquitin ligase SMURF1 via MAPK-ERK signaling. *J Cell Physiol* 233: 596-606, 2018.

24. 金子 誉, 里 誠, 佐々山 竜一, 小林信光, 佐久間 雅史, 佐宗 真由美,
佐相 万里子, 田口和之. 医学科学生における食生活の実態と 夜間摂食症
候群. 山梨医大紀要 第 18 卷, 7-10, 2001.

Ⅷ. 付図説明

図1. ヒト顎骨由来骨芽細胞(hOB細胞)の樹立

- (A) 小骨片周囲において増殖する骨芽細胞様細胞
- (B) 位相差顕微鏡像
- (C) hOB細胞におけるAlizarin red 染色像

図2. MEL含有IP-CHAのMEL徐放能の検討

- (A) 1 μ M MEL含有IP-CHAのMEL徐放能
- (B) 10 μ M MEL含有IP-CHAのMEL徐放能

図3. SEMによるhOB細胞の形態観察

- (A) MEL非含有IP-CHA内におけるhOB細胞
- (B) 1 μ M MEL含有IP-CHA内におけるhOB細胞
- (C) 10 μ M MEL含有IP-CHA内におけるhOB細胞

図4. MEL含有IP-CHA内で培養したhOB細胞の石灰化能の検討

- (A) MEL含有IP-CHAの水平断面でのAlizarin red 染色像
- (B) 比色定量法によるAlizarin red 染色の定量

図5. hOB細胞におけるTGF- β 1によるALP活性および石灰化への影響

- (A) ALP mRNA発現
- (B) ALP活性
- (C) Alizarin red 染色像
- (D) 比色定量法によるAlizarin red 染色の定量

図6. hOB細胞におけるTGF- β 1によるRunx2発現への影響 (蛍光免疫染色像)

- (A) 1 μ M MEL含有IP-CHA内で培養したhOB細胞におけるRunx2発現
- (B) hOB細胞におけるRunx2発現

図7. hOB細胞におけるTGF- β 1によるRunx2発現への影響

- (A) Runx2 mRNA発現

- (B) Runx2タンパク質発現
- (C) Runx2タンパク質発現レベルの検討

図8. TGF- β 1がSmad2/3のリン酸化に及ぼす影響

- (A) TGF- β 1によるSmad2/3のリン酸化
- (B) Smad2のリン酸化レベルの検討
- (C) Smad3のリン酸化レベルの検討

図9. MEL/TGF- β 1存在下でのSmad2/3ノックダウンhOB細胞におけるRunx2発現

- (A) Smad2/3ノックダウンhOB細胞におけるRunx2 mRNA発現
- (B) Smad2/3ノックダウンhOB細胞におけるAlizarin red 染色の定量

図10. TGF- β 1がERKのリン酸化に及ぼす影響

- (A) TGF- β 1存在下でのERK1/2のリン酸化
- (B) TGF- β 1存在下でのERK1のリン酸化レベルの検討
- (B) TGF- β 1存在下でのERK2のリン酸化レベルの検討

図11. TGF- β 1により抑制されたRunx2発現のERK inhibitorによる影響

- (A) TGF- β 1/ERK inhibitor存在下でのRunx2タンパク質発現
- (B) TGF- β 1/ERK inhibitor存在下でのRunx2タンパク質発現レベルの検討
- (C) TGF- β 1/ERK inhibitor存在下でのAlizarin red 染色像
- (D) 比色定量法によるAlizarin red 染色の定量

図12. MELにより誘導されたmiRNAの網羅的発現解析

- (A) miR-181c-5p過剰発現hOB細胞におけるRunx2 mRNA発現
- (B) miR-181c-5pノックダウンhOB細胞におけるRunx2 mRNA発現

図13. miR-181c-5pによるhOB細胞の石灰化への影響

- (A) miR-181c-5p過剰発現hOB細胞におけるAlizarin red 染色
- (B) 比色定量法によるAlizarin red 染色の定量
- (C) miR-181c-5pノックダウンhOB細胞におけるAlizarin red 染色

(D) 比色定量法によるAlizarin red 染色の定量

図14. miR-181c-5pの標的遺伝子の検討

- (A) miR-181c-5pとNotch2の相補的塩基配列
- (B) miR-181c-5p過剰発現hOB細胞におけるNotch2 mRNA発現
- (C) miR-181c-5p過剰発現hOB細胞におけるNotch2タンパク質発現
- (D) Notch2タンパク質発現レベルの検討

図15. Notch2 siRNAノックダウン細胞におけるRunx2 mRNA発現および石灰化能の検討

- (A) Notch2 siRNAノックダウンhOB細胞におけるRunx2 mRNA発現
- (B) Notch2 siRNAノックダウンhOB細胞におけるRunx2タンパク質発現
- (C) Runx2タンパク質発現レベルの検討
- (D) Notch2 siRNAノックダウンhOB細胞におけるAlizarin red 染色像
- (E) 比色定量法によるAlizarin red 染色の定量

图1

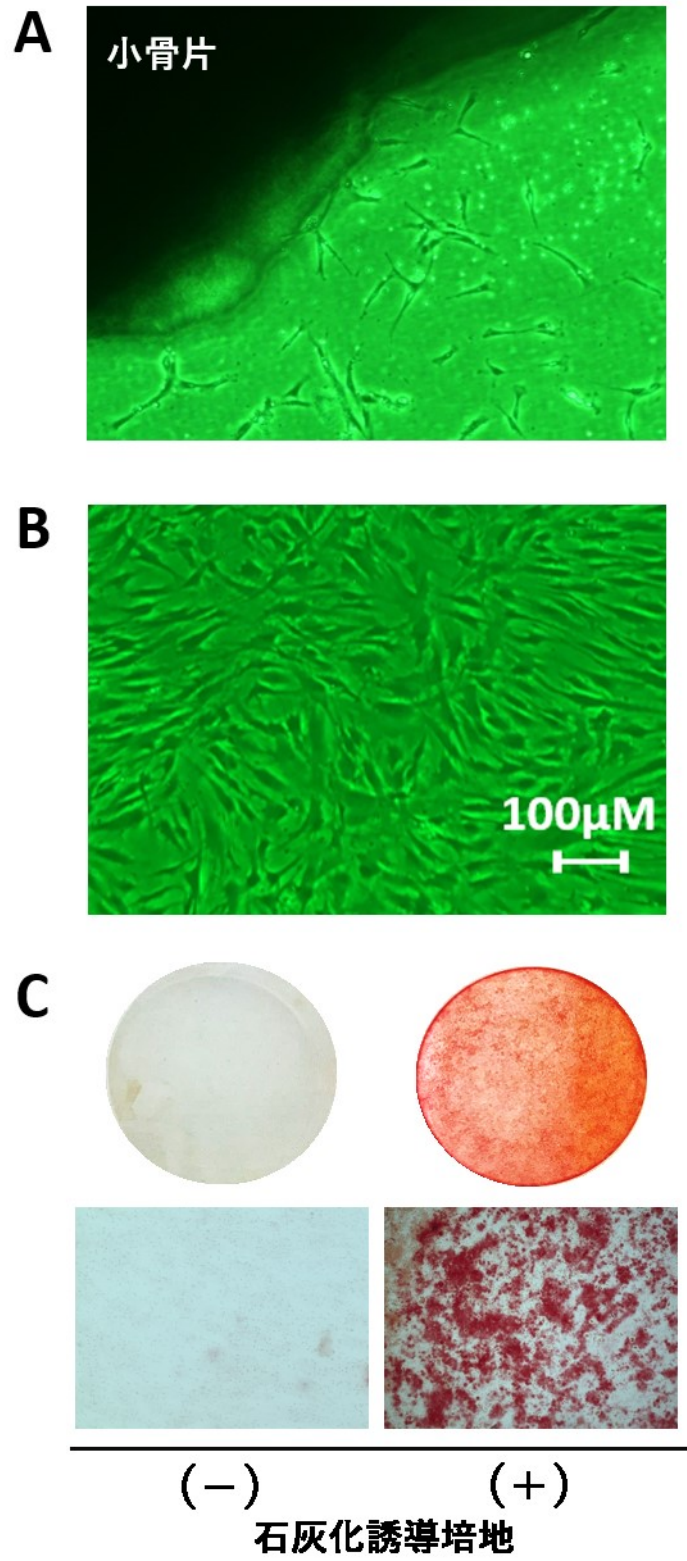


図2

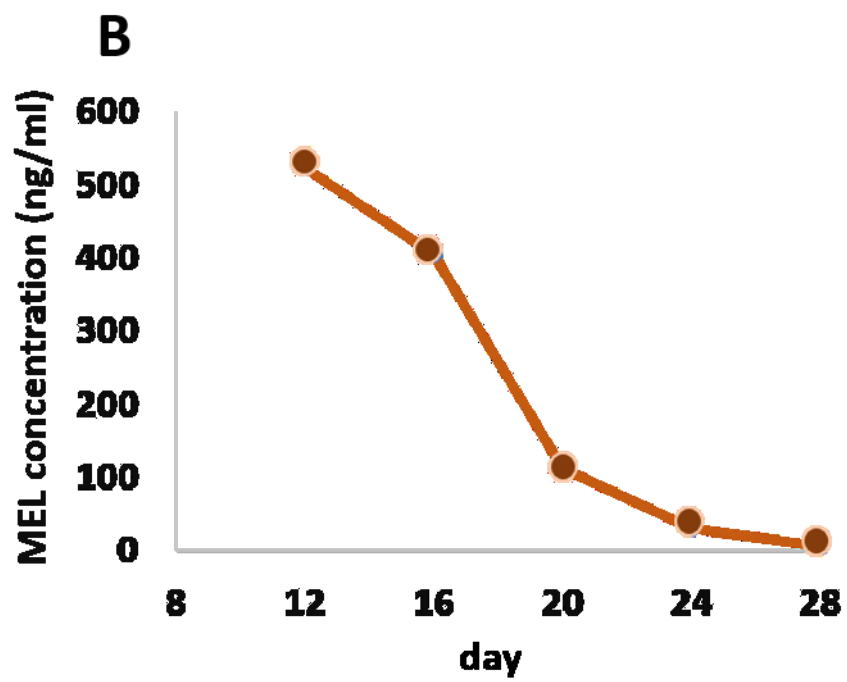
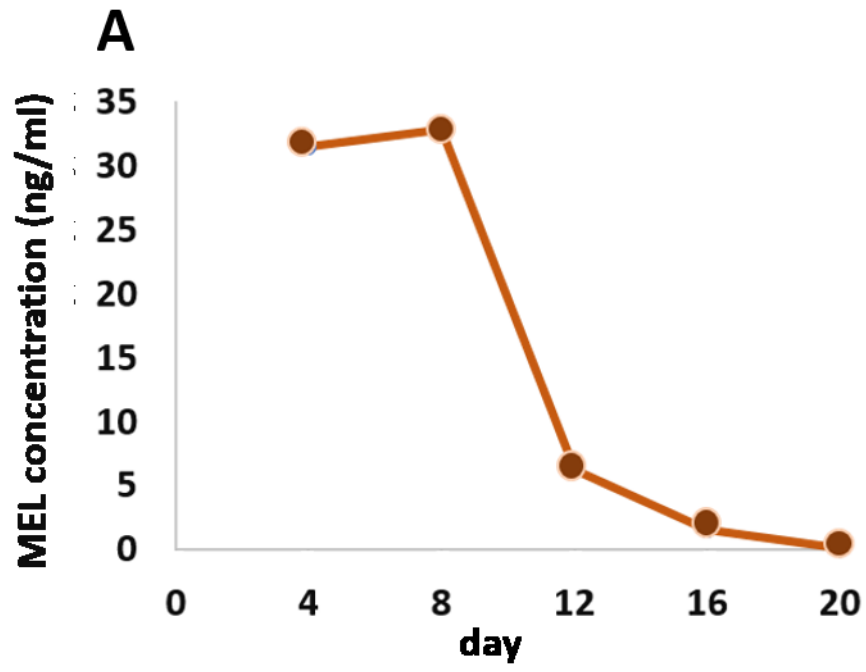
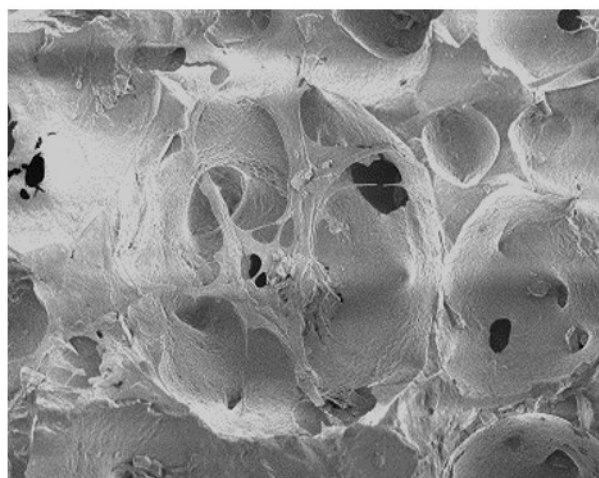
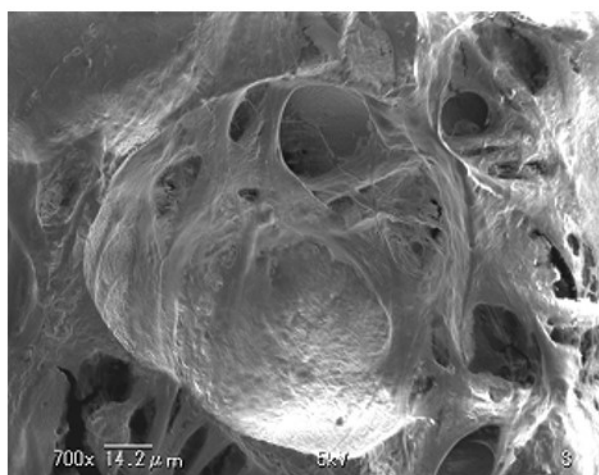


図3

A



B



C

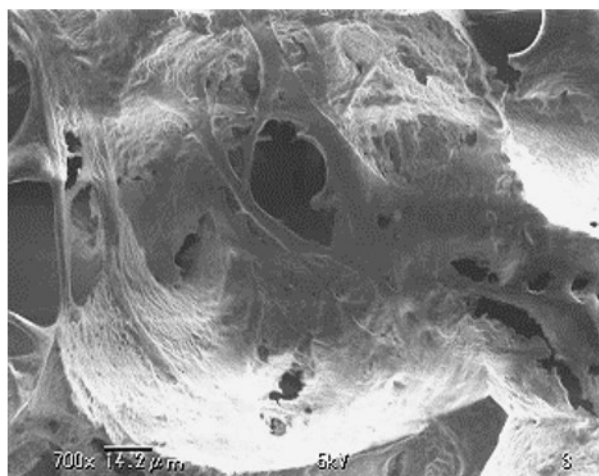
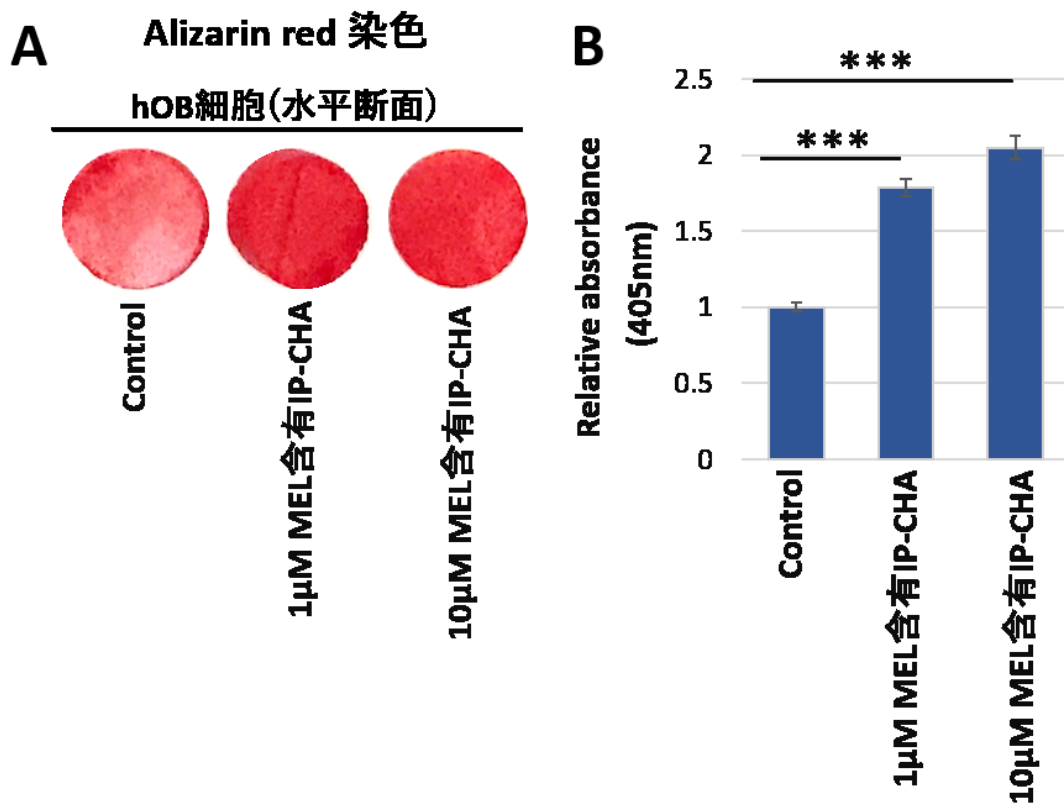
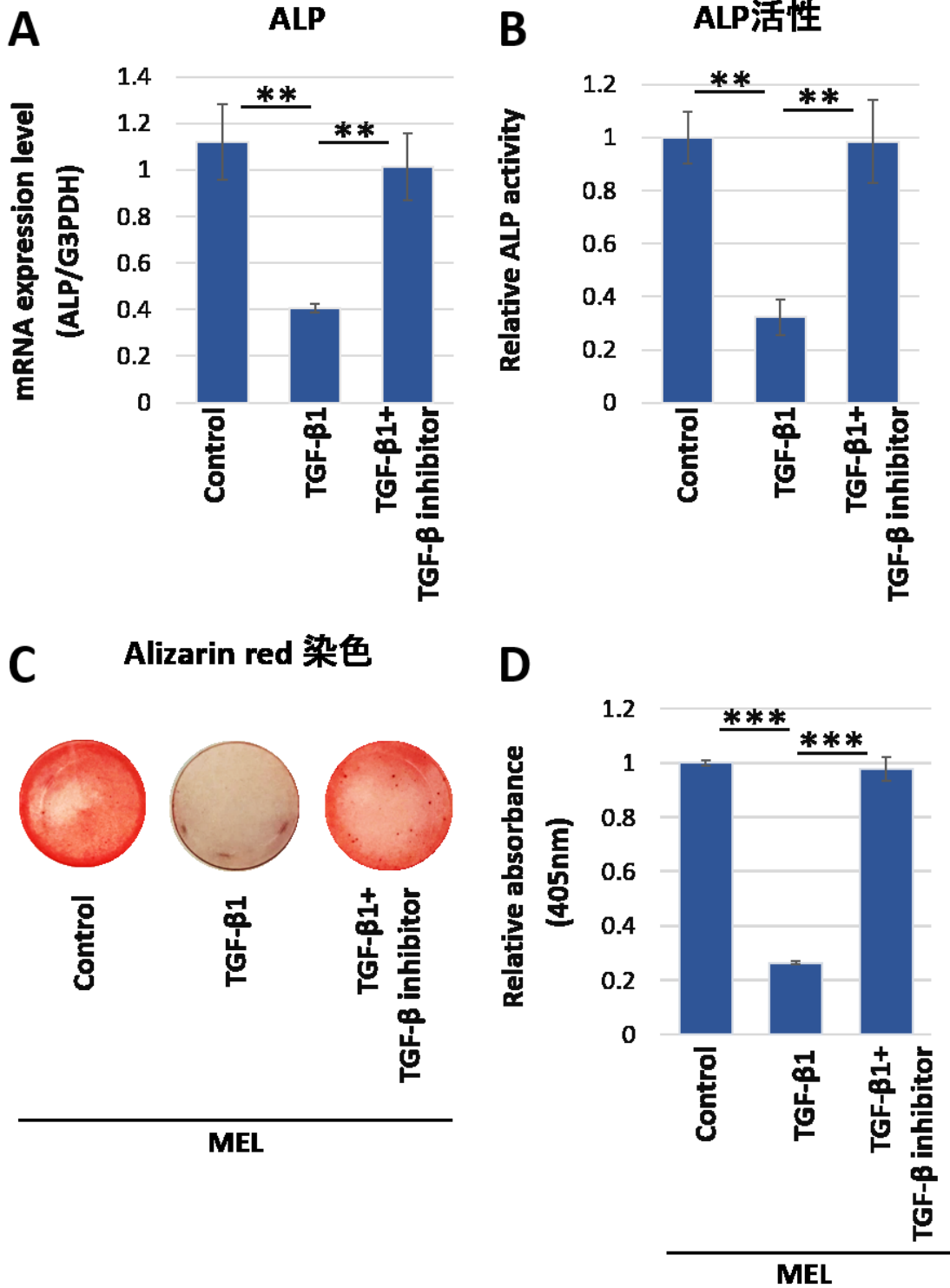


図4



(***;P<0.001)

图5



(** ;P<0.01 ***,P<0.001)

图6

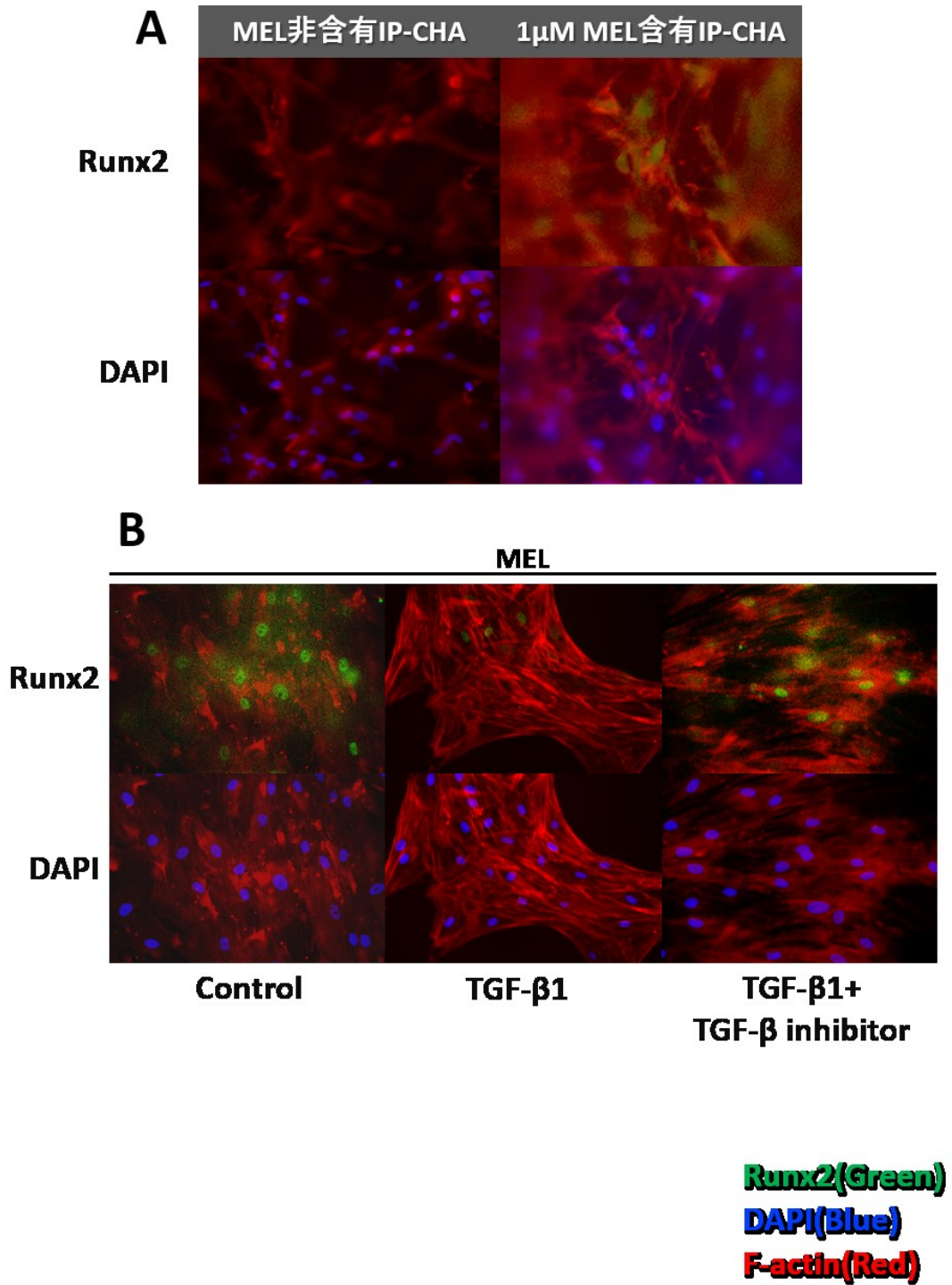
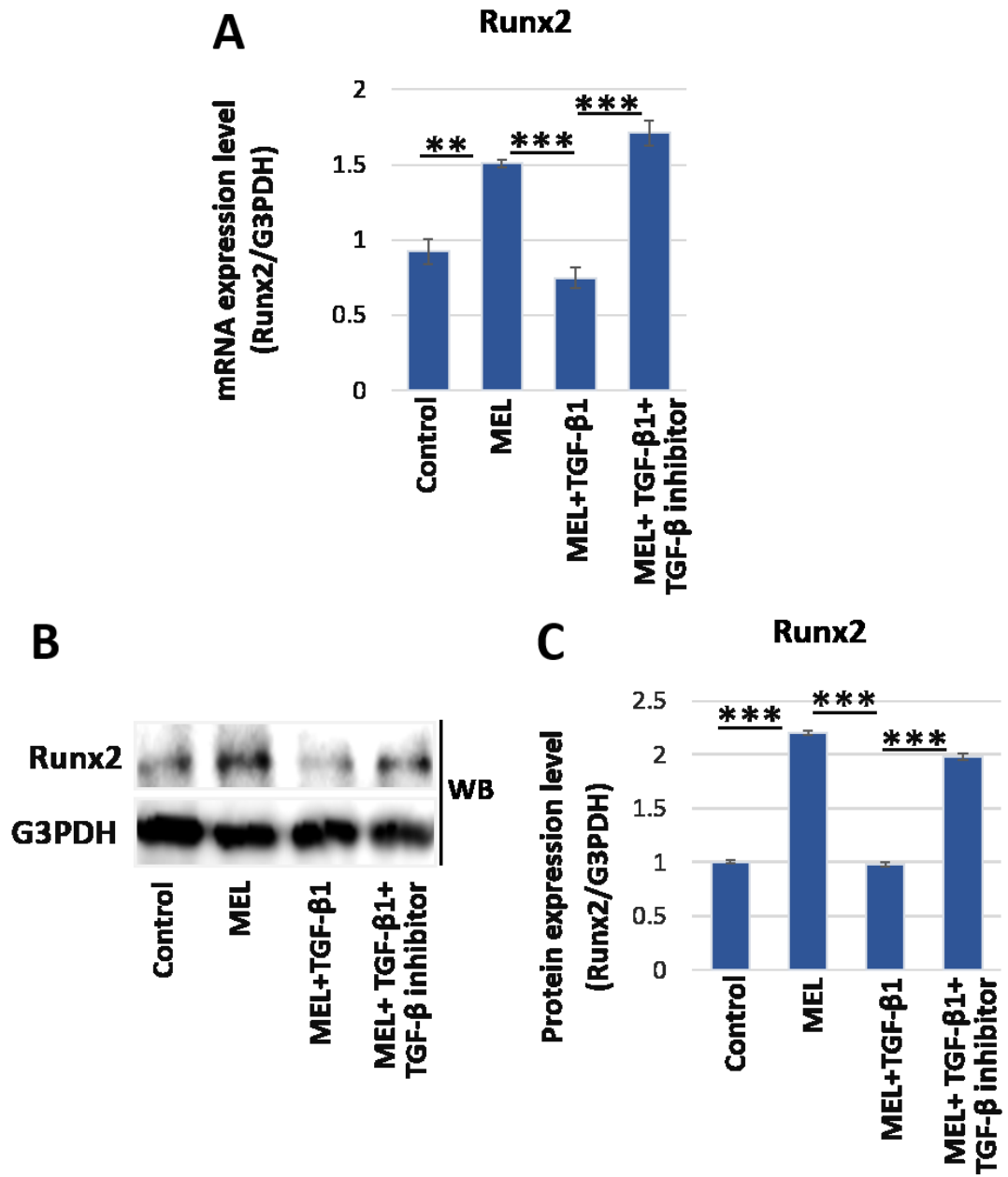
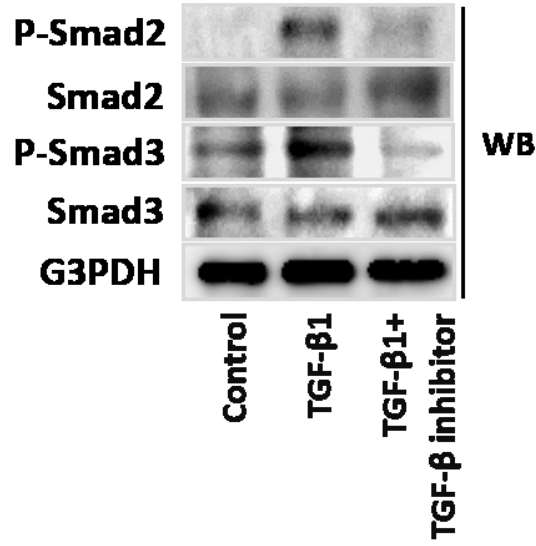


图7



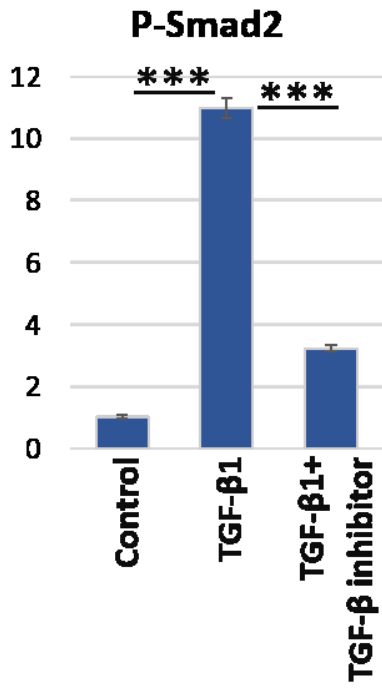
(** ;P<0.01 ***;P<0.001)

A



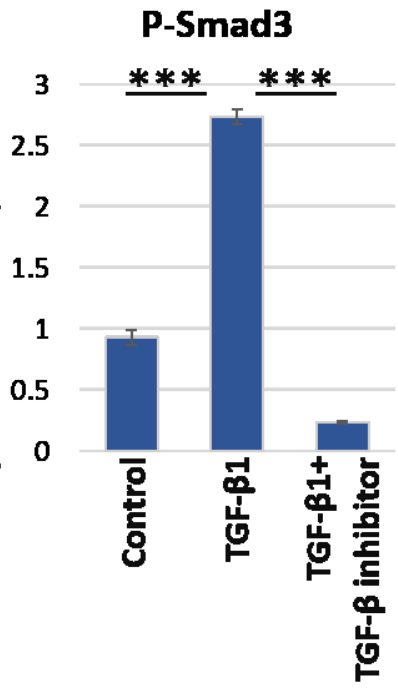
B

Protein expression level
(P-Smad2/Smad2)



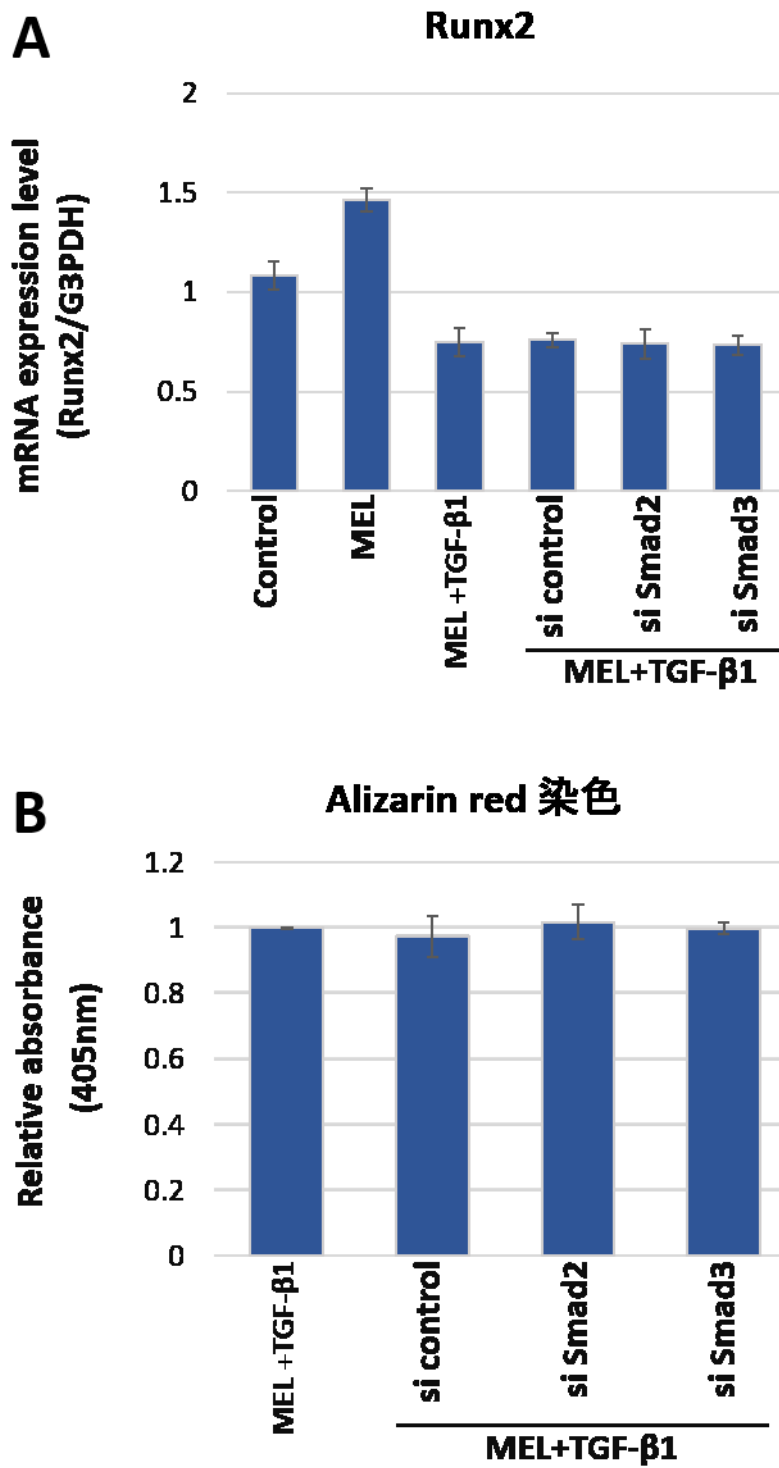
C

Protein expression level
(P-Smad3/Smad3)



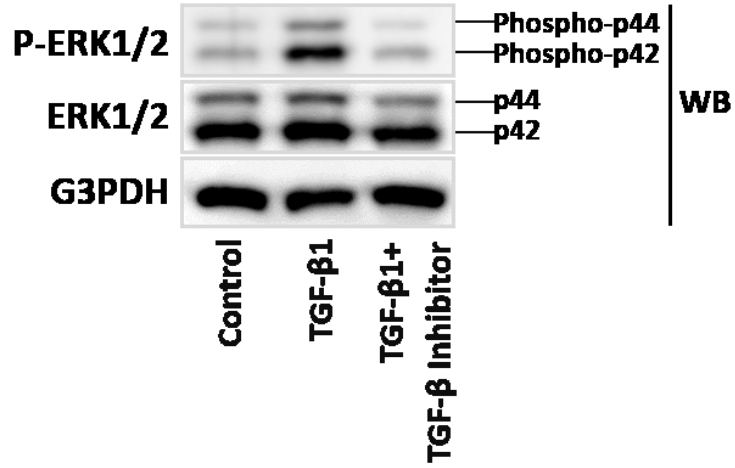
(***;P<0.001)

图9



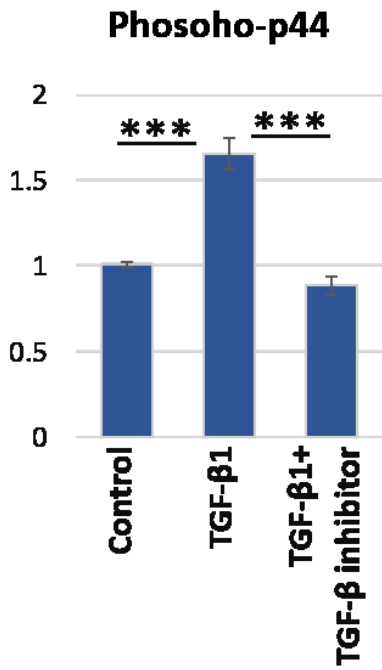
10

A



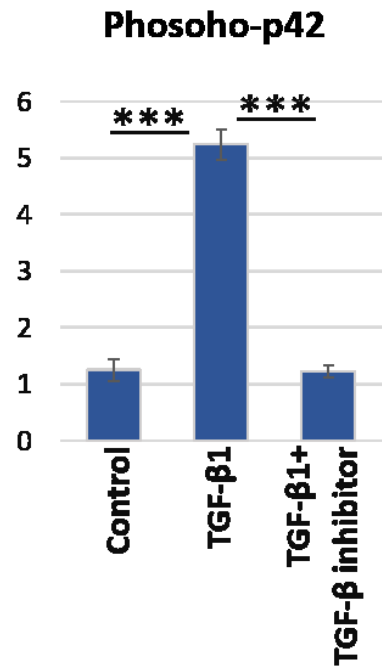
B

Protein expression level
(Phosoho-p44/p44)



C

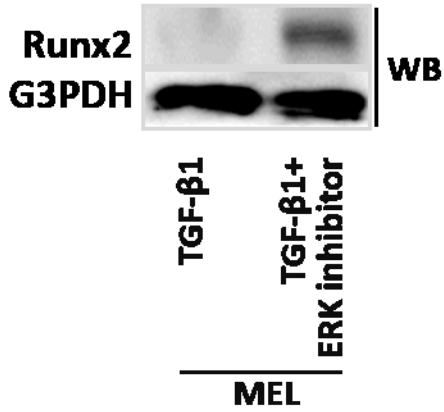
Protein expression level
(Phosoho-p42/p42)



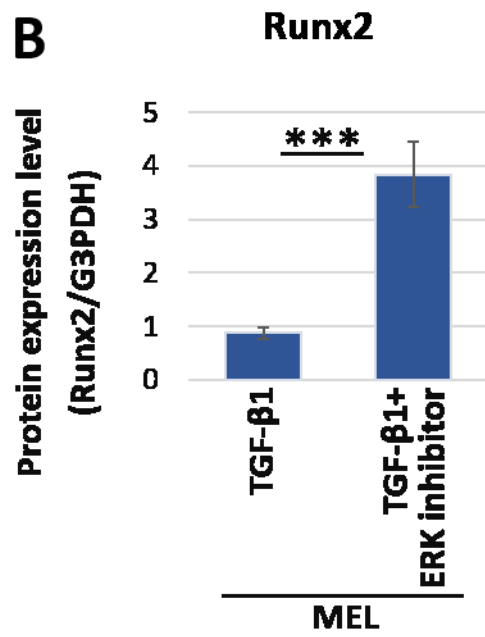
(***;P<0.001)

图11

A

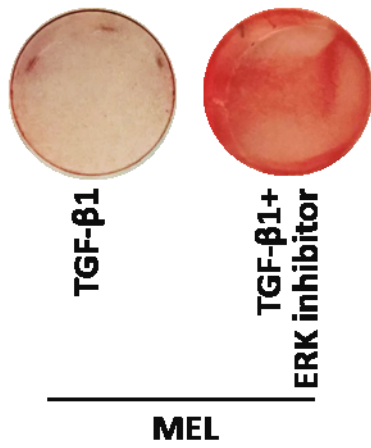


B

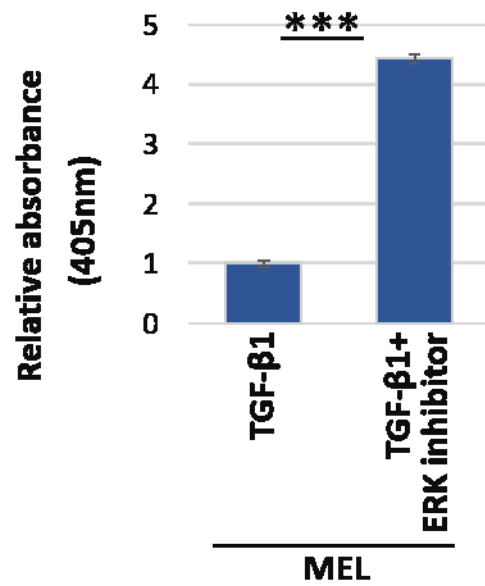


C

Alizarin red 染色

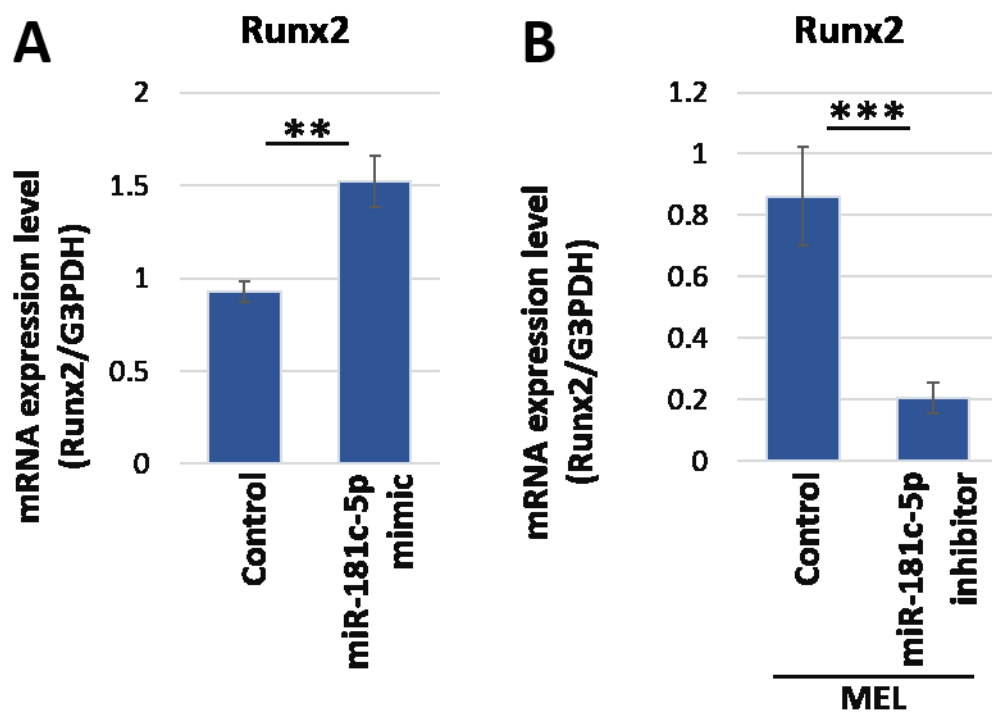


D



(***, P<0.001)

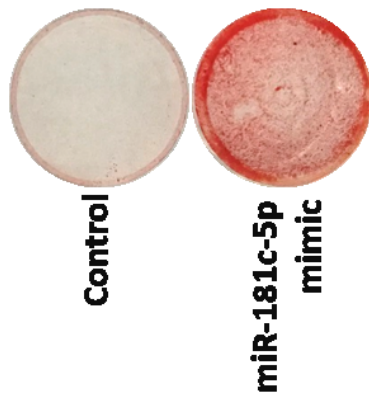
图12



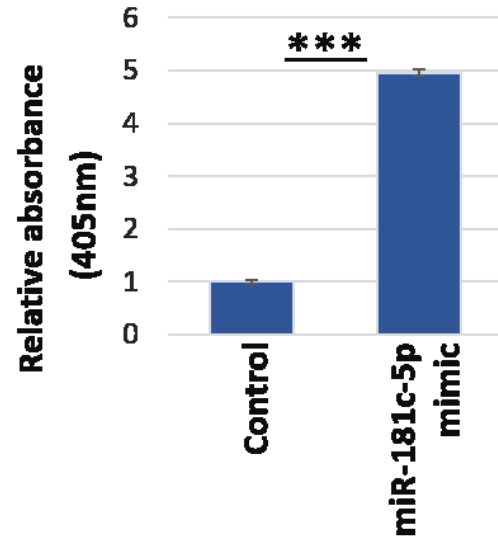
(** ;P<0.01 ***;P<0.001)

图13

A Alizarin red 染色



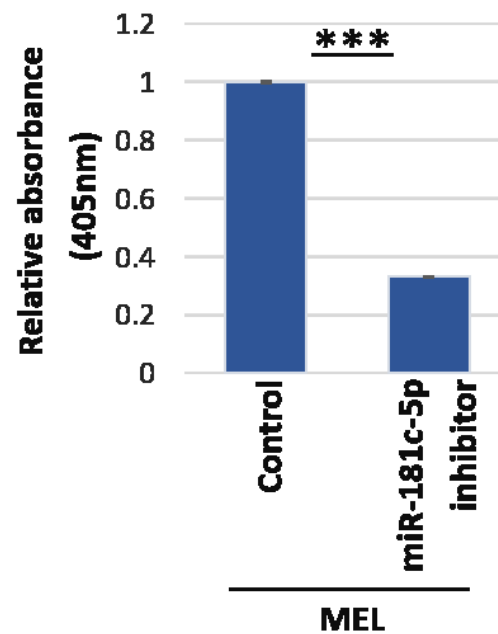
B



C Alizarin red 染色



D

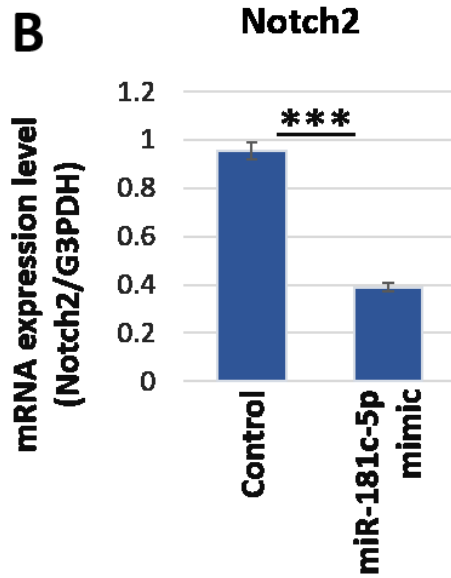


(***;P<0.001)

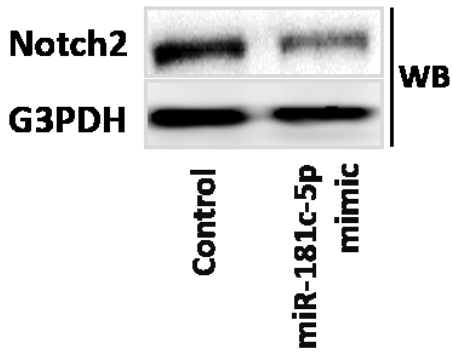
14

A

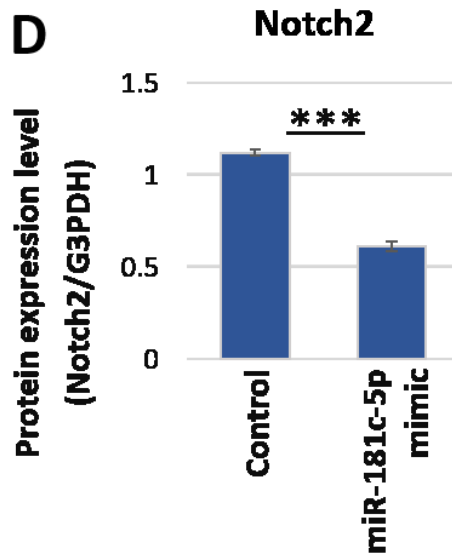
5' ...CCCUAACCAUACAUGAAUGUA... Position 2967-2974 of **Notch2** 3' UTR
 | | | | | | | |
3' UGAGUGGCUGUCCAACUUACAA hsa-miR-181c-5p



C



D



(***; P<0.001)

图 15

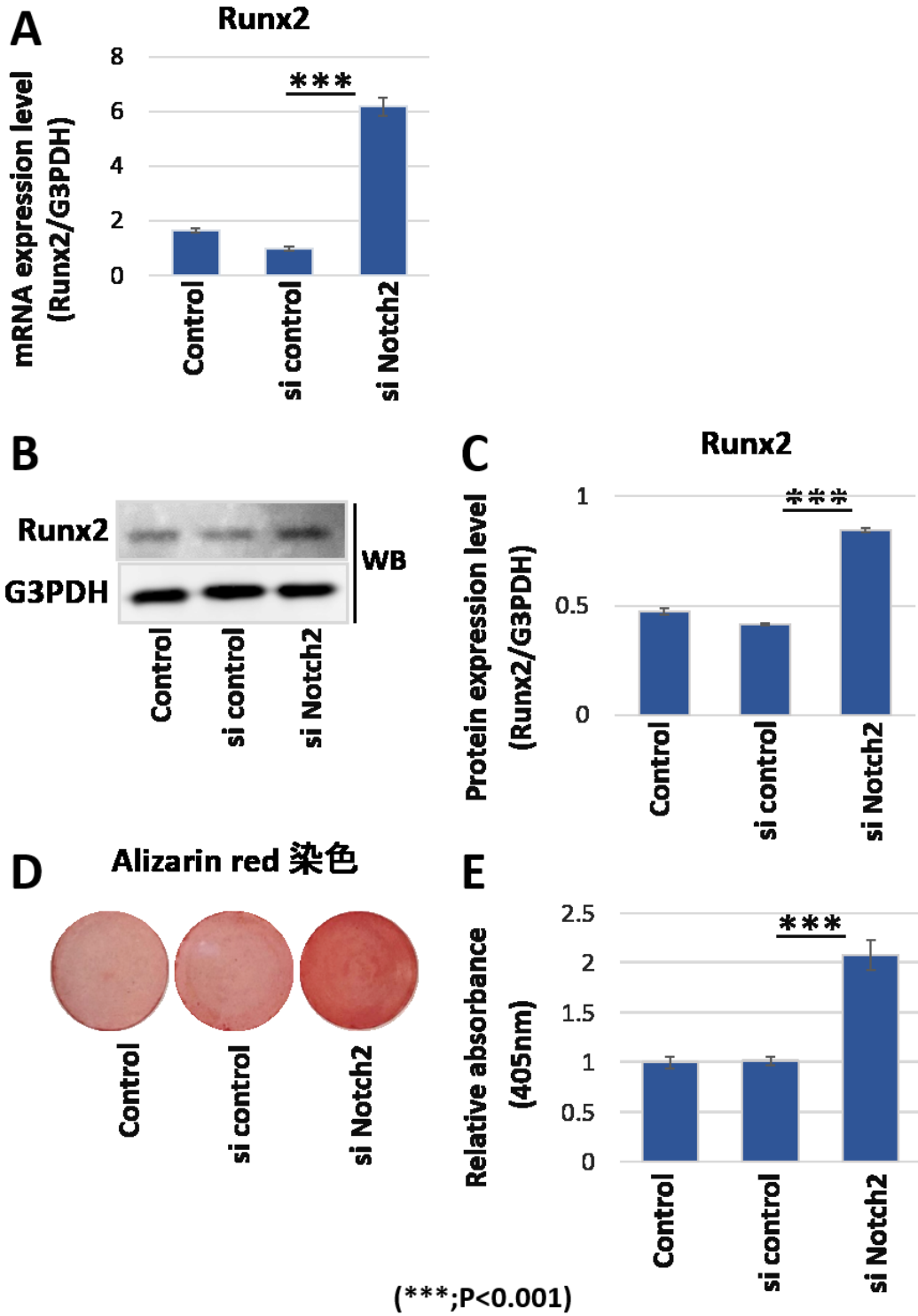


表 1. Primerの塩基配列

Target mRNA	Primer sequences
ALP	5'- ACTGCAGACATTCTCAAAGC-3' (sense) 5'- GAGTGAGTGAGTGAGCAAGG -3' (antisense)
Runx2	5'- ATGCTTCATTCGCCTCAC -3' (sense) 5'- ACTGCTTGCAGCCTTAAAT -3' (antisense)
Notch2	5'- CCCTGGGCTACACTGGGAAAACTG -3' (sense) 5'- GGCAGGGGTTGGACGCACACTCA -3' (antisense)
G3PDH	5'- GTGAACCATGAGAAGTATGACAA -3' (sense) 5'- ATGAGTCCTTCCACGATACC -3' (antisense)

表 2. 2倍以上発現が増加したmiRNA

miRNA	Fold change (MEL/control)
hsa-miR-181c-5p	4.57
hsa-miR-1973	3.99
hsa-miR-501-3p	3.64
hsa-miR-4788	3.25
hsa-miR-654-3p	2.92
hsa-miR642a-3p	2.77
hsa-miR-5195-3p	2.68
hsa-miR-4800-5p	2.61
hsa-miR-188-5p	2.54
hsa-miR-3195	2.39
hsa-miR-8089	2.33
hsa-miR-30a-3p	2.3
hsa-miR-4743-5p	2.19
hsa-miR-3135b	2.12
hsa-miR-3651	2.04
hsa-miR-505-3p	2.02
hsa-miR-30d-5p	2.01

表 3. 0.5倍以下に発現が減少したmiRNA

miRNA	Fold change (MEL/control)
hsa-miR-4663	0.235
hsa-miR-3148	0.291
hsa-miR-6740-5p	0.308
hsa-miR-5189-5p	0.332
hsa-miR-548x-3p	0.363
hsa-miR-181a-2-3p	0.383
hsa-miR-3180-3p	0.401
hsa-miR-16-2-3p	0.415
hsa-miR-21-3p	0.465
hsa-miR-1281	0.483
hsa-miR-1247-3p	0.489
hsa-miR-212-3p	0.499
hsa-miR-6782-5p	0.499