

論文内容要旨

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)

【緒言】

これまで我々は、FGF-2 及び Melatonin がマウス骨芽細胞 (MC3T3-E1) の石灰化能の亢進に
関与することを明らかとした。しかしながら、Melatonin がヒト顎骨由来骨芽細胞の石灰化能に
及ぼす影響はいまだ十分に解明されていない。本研究では、ヒト顎骨由来骨芽細胞を用いて、
Melatonin による Runx2 の発現誘導メカニズムを検討するため以下の研究を行った。さらに、
Melatonin 徐放能を有する連通多孔体ハイドロキシアパタイト (IP-CHA) を作製し、ヒト顎骨由
来骨芽細胞の石灰化能に及ぼす影響について検討した。

【材料・方法】

当科において手術の際に採取したヒト顎骨の小骨片を用いて、ヒト顎骨由来骨芽細胞 (hOB
細胞) を樹立した。hOB 細胞における石灰化能は、石灰化誘導培地にて細胞を培養後、アリザ
リンレッド染色法を用いて確認した。また、hOB 細胞における Melatonin 存在下での骨関連
遺伝子の発現および石灰化能について、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法、アリザ
リンレッド染色法を用いて検討した。また、TGF- β 1 が hOB 細胞における骨関連遺伝子の発現
および石灰化能に及ぼす影響について検討した。また、Melatonin により誘導される miRNA 発
現を検討するため、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行なった。さらに、Melatonin
徐放能を有する連通多孔体ハイドロキシアパタイト (IP-CHA) を作製した。

【結果】

① Melatonin が hOB 細胞の石灰化能に及ぼす影響について

hOB 細胞における ALP の mRNA 発現および ALP 活性は Melatonin により有意に増加した。
また、Melatonin により hOB 細胞の石灰化能は有意に促進された。

② TGF- β 1 が hOB 細胞の石灰化能に及ぼす影響について

TGF- β 1 により hOB 細胞の ALP mRNA 発現および ALP 活性は有意に低下した。さらに、TGF- β 1
によって減少した ALP mRNA 発現および ALP 活性は TGF- β inhibitor によって有意に増加し
た。また、TGF- β 1 により抑制された hOB 細胞の石灰化は、TGF- β inhibitor により促進され
た。

③ Melatonin が hOB 細胞の Runx2 発現に及ぼす影響について

Melatonin によって誘導された Runx2 mRNA 発現およびタンパク質発現は、TGF- β 1 の添加に
より抑制された。蛍光免疫染色によって、Melatonin 存在下での Runx2 の核内発現を確認した。
Runx2 の核内発現は TGF- β 1 により減少した。さらに、TGF- β 1 により ERK のリン酸化レベル
は増加し、TGF- β 1 により抑制された Runx2 の発現および石灰化は、ERK inhibitor の添加に
より有意に増加した。

④ Melatonin により誘導される miRNA 発現の解析

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果、Melatonin 存在下では、miR-181c-5p は

Control と比較して約 4.6 倍の高発現を認めた。

⑤miR-181c-5p が hOB 細胞の石灰化能に及ぼす影響について

miR-181c-5p の過剰発現により Runx2 の発現は有意に増加し、石灰化も促進された。Melatonin 存在下で、miR-181c-5p のノックダウンを行ったところ、Runx2 の発現は有意に低下し、石灰化も有意に抑制された。また、miR-181c-5p の標的遺伝子を、ターゲットスキャンを用いて解析したところ、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。さらに、miR-181c-5p の過剰発現により、Notch2 mRNA 発現およびタンパク質発現は有意に低下した。また、Notch2 ノックダウン hOB 細胞では、Runx2 mRNA 発現およびタンパク質発現は有意に増加し、石灰化も有意に促進された。

⑥Melatonin 徐放性連通多孔体ハイドロキシアパタイト(IP-CHA)が hOB 細胞の石灰化能に及ぼす影響について

10 μ M の Melatonin 溶液に IP-CHA を浸漬させ、Melatonin 徐放性連通多孔体ハイドロキシアパタイト(IP-CHA)を作製した。Melatonin 徐放性 IP-CHA を用いて培養した hOB 細胞では、石灰化が促進されることが明らかとなった。

【考察】

以上の結果から、ヒト顎骨由来骨芽細胞において、Melatonin により誘導された miR-181c-5p は Notch2 の発現を抑制することにより Runx2 の発現を増加させ、その結果、ヒト顎骨由来骨芽細胞の石灰化が促進されることが明らかとなった。さらに Melatonin 徐放性 IP-CHA は、ヒト顎骨由来骨芽細胞の有用な scaffold であることが示唆された。