

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	室積 博
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
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			
論文審査担当者			
主査	教授	寺山 隆司	印
審査委員	教授	太田 耕司	
審査委員	准教授	飛梅 圭	
〔論文審査の結果の要旨〕			
緒言			
<p>Melatonin(MEL)は松果体より分泌されるホルモンであり，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様々な働きを有する。また，未分化間葉細胞の分化や骨芽前駆細胞の分化を促進し骨形成に重要な役割を担う。さらに <i>in vitro</i> にてマウス骨芽細胞の石灰化能の亢進に関与し，インプラント周囲の新生骨形成やオッセオインテグレーションの促進に関与する。Runx2 は骨芽細胞分化に必須な転写因子であり，骨芽細胞分化を促進することにより骨形成を促進させることができる。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すると報告されているが，MEL により誘導される Runx2 発現や石灰化の促進と 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解明されていない。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。しかしながら，MEL によって誘導される miRNA が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響は未だ明らかではない。さらに，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 を IP-CHA 内に導入することにより，IP-CHA 内で培養した骨芽細胞の石灰化能がより促進される可能性が考えられる。そのため本研究では，ヒト顎骨由来骨芽細胞(hOB 細胞)を用いて，MEL による Runx2 発現誘導メカニズムを明らかとし，さらに MEL により誘導される miRNA の役割について探索した。さらに MEL 徐放能を有する IP-CHA を作製し，IP-CHA 内で培養した hOB 細胞の石灰化能について検討を行った。</p>			
<p>結果1：MEL/ TGF-βが hOB 細胞の Runx2 発現および石灰化能に及ぼす影響ならびに MAPK-ERK シグナル伝達経路との関係</p> <p>hOB 細胞における TGF-β1による ALP 活性および石灰化への影響を検討した。ALP mRNA 発現および ALP 活性は TGF-β1存在下で Control と比較して有意に低下した。さらに TGF-β1 によって低下した ALP mRNA および ALP 活性は，TGF-β Inhibitor により有意に増加した。また，アリザリンレッド染色から TGF-βにより抑制された石灰化能は TGF-β Inhibitor により Control のレベルまで増加した。次に MEL による Runx2 発現誘導について検討を行った。MEL により Runx2 mRNA 発現および蛋白質発現は有意に増加し，TGF-βにより減少した。さらに TGF-β Inhibitor の添加により減少した Runx2 発現は有意に増加した。さらに Runx2 の発現を蛍光免疫染色にて検討したところ，MEL 存在下で確認された Runx2 の核内での発現は，TGF-βにより減少した。続いて TGF-βと Smad 非依存性シグナル伝達経路との関係を明らかとするため，TGF-β存在下での ERK リン酸化について検討を行ったところ，ERK リン酸化レベルは TGF-βにより有意に増加した。また，MEL 存在下で TGF-βにより抑</p>			

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、TGF- β により抑制された石灰化は、ERK Inhibitor の添加により有意に促進した。

結果 2 : MEL により誘導される 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 を明らかとするため、miRNA の網羅的発現解析を行った。その結果、MEL 存在下で Control と比較して 2 倍以上発現が増加した miRNA を 17 種類、0.5 倍以下に発現が減少した miRNA を 13 種類同定した。その中で miR-181c-5p は 4.57 倍と高い発現増加を認めた。続いて、miR-181c-5p が hOB 細胞の Runx2 発現に及ぼす影響について検討した。miR-181c-5p 過剰発現細胞では、Control 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 ノックダウン細胞は Runx2 mRNA 発現の有意な減少を認めた。さらに石灰化への影響について検討を行った。miR-181c-5p 過剰発現細胞では、Control と比較して石灰化が有意に促進されたが miR-181c-5p ノックダウン細胞では MEL による石灰化の促進は認められなかった。miR-181c-5p の標的遺伝子を明らかとするためターゲットスキャンを用いて検討を行ったところ、Notch2 が相補的な塩基配列を有することが明らかとなった。miR-181c-5p 過剰発現細胞では、Control と比較して Notch2 mRNA 発現の有意な減少を認め、さらに Notch2 蛋白質発現においても有意な減少を認めた。続けて Notch2 ノックダウン hOB 細胞における Runx2 発現および石灰化能について検討を行ったところ、Runx2 発現および蛋白質発現は有意に増加した。また、Notch2 ノックダウンにより石灰化は有意に促進された。

結果 3 : MEL 含有 IP-CHA の作製

MEL 含有 IP-CHA 内で培養した hOB 細胞の石灰化能を明らかとするため、1 μ M および 10 μ M MEL 含有 IP-CHA を作製し、その MEL 徐放能を検討した。1 μ M MEL 含有 IP-CHA について MEL 徐放能を測定したところ、4 日では 31.5ng/ml、8 日では 32.8ng/ml、12 日では 6.2ng/ml、16 日では 1.5ng/ml の MEL の徐放が確認された。次に、10 μ M MEL 含有 IP-CHA について、MEL 徐放能を測定したところ、1 μ M MEL 含有 IP-CHA と比べて高濃度の MEL が 28 日まで長期間徐放された。作製した MEL 含有 IP-CHA 内へ hOB 細胞が導入されたことを走査電子顕微鏡にて確認した後、MEL 含有 IP-CHA で培養した hOB 細胞の石灰化能について、アリザリンレッド染色にて検討したところ、1 μ M および 10 μ M MEL 含有 IP-CHA 内で培養した hOB 細胞は Control と比較して石灰化能が有意に増加した。

考察と結語

MEL により誘導される Runx2 発現および石灰化能の促進は、TGF- β 1による ERK リン酸化を介して抑制されることが示唆された。また、MEL により誘導される miR-181c-5p は Notch2 の転写を抑制し、その結果 Runx2 発現の増加および石灰化促進に作用すると考えられた。MEL 含有 IP-CHA は hOB 細胞の石灰化能を有意に促進することが示唆された。今回の研究から、hOB 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。

以上の結果から、本論文は MEL 徐放能を有する IP-CHA を用いて、hOB 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を詳細に検討したものである。TGF- β や miR-181c-5p が関連する細胞内シグナル伝達など論文に示されたデータは結論を導くために十分であると考えられ、また MEL 徐放能を有する IP-CHA は臨床応用への可能性が期待できる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。