

審査の結果の要旨

氏名 岡本 剛明

本研究は骨芽細胞分化過程において重要な役割を演じていると考えられる無機リンの影響を明らかにするため、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を BMP2 にて分化誘導する系にて、分化特異的な活性を示す DNA 発現の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. リンが骨芽細胞の ROS 産生に対する影響を検討するため、リン濃度を 0 mM から 5 mM まで変えたリン溶液を添加した培養液中で骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞と正常ラット骨芽細胞を培養し ROS 産生への影響を調べたところ、添加リン濃度が 0 mM、1 mM、3 mM、5 mM と上昇するにつれて ROS 産生も有意に増加していた。従ってリンは、骨芽細胞様細胞において ROS 産生を促進することが明らかとなった。Foscarnet によりこのリンの効果は抑制され、またネガティブコントロールに Na₂SO₄ 溶液を使用した方が、こちらでは ROS 産生の増加は認めず、ROS 産生促進はリンに特異的であることが明らかとなった。
2. リン負荷による ROS 産生の促進が、どの経路によって媒介されているかを調べるために、それぞれの経路に特異的な阻害剤をリンと同時に添加した。NADPH の特異的な阻害剤である DPI と apocynin をリン負荷と同時に添加することによって、高リン負荷時の ROS 産生が有意に抑制された。一方 xanthine oxidase 阻害剤である oxypurinol やミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤である rotenone を添加しても、リン負荷時の ROS 産生の抑制は認められなかった。以上より、リンによる ROS 産生の亢進は主として NADPH oxidase を介して行われることが考えられた。
3. NADPH oxidase 発現を siRNA で抑制して、リンによる ROS 産生の亢進が低下するかを検討した。Nox1 と Nox4 を siRNA で抑制したところ ROS 産生の抑制が認められ、リンによる ROS 産生は NADPH oxidase を介して行われているものと考えられた。
4. リン濃度が 5 mM の溶液を負荷したところ、Western blot で 30 分後に ERK (p-ERK 1/2) のリン酸化が惹起されることが明らかとなった。従ってリンは、ROS 産生に加え、ERK のリン酸化を介してもシグナルを伝達できるものと考えられた。

5. リン負荷による骨芽細胞分化への影響を調べるために、MC3T3-E1 を BMP2 やリンの添加された培養液中で培養し、アルカリホスファターゼ活性を測定した。BMP2 と同時にリン溶液を加えた群ではアルカリホスファターゼ活性が有意に低下しており、また foscarnet 添加によってアルカリホスファターゼ活性抑制が回復することより、リンによって BMP が誘導する骨芽細胞分化が抑えられることが明らかとなった。一方 Na₂SO₄ によっては ALP 活性の抑制は認められなかった。従ってリンによる BMP2 誘導性骨芽細胞分化抑制は、リンに特異的なものと考えられた。

6. リンが、初期骨芽細胞分化マーカーである Runx2、後期骨芽細胞分化マーカーである OC、および ALP の発現に及ぼす影響をリアルタイム PCR で検討したところ、リンにより Runx2、ALP、および OC の発現が低下することが明らかとなった。従ってリンは、骨芽細胞分化には抑制的に作用するものと考えられた。

7. H₂O₂ の 13 時間負荷により、MC3T3-E1 細胞の BMP2 誘導性 ALP 活性は有意に抑制された。一方この H₂O₂ 負荷は、MC3T3-E1 細胞の蛋白量を減少させなかったことから、非特異的な細胞障害によるものではないものと考えられた。従って MC3T3-E1 細胞における ROS 産生促進が、本細胞の分化抑制に関与する可能性が考えられた。

8. リンの BMP2 誘導性 ALP 活性抑制に及ぼす NADPH oxidase 阻害剤の効果を検討した結果、apocynin は BMP2 誘導性 ALP 活性に影響を及ぼさないのに対し、リン負荷によるアルカリホスファターゼ活性の低下を抑制することが明らかとなった。従ってリンは、少なくとも一部は NADPH oxidase を介した ROS 産生の亢進により、MC3T3-E1 細胞の分化に抑制的に作用するものと考えられた。

9. MAPK/ERK kinase (MEK) 阻害剤である PD98059 が ALP 活性促進作用を示し、またリンによる ALP 活性抑制作用は PD98059 により完全には回復しないことが明らかとなった。したがって、リンによる ERK のリン酸化は、リンによる骨芽細胞分化抑制作用の少なくとも主要な経路ではないものと考えられた。

以上、本論文はマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 において、分化特異的に働く遺伝子発現の解析から、分化抑制的に働く無機リンの影響を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、分化過程に働くと考えられる、無機リンによる酸化ストレスを介したシグナル伝達系の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。