

学 位 論 文 題 名

低カルシウム環境が骨形成に及ぼす効果の分子的メカニズム

－ *c-fos* 遺伝子発現に伴うインターロイキン 1 β による
アルカリ性ホスファターゼの制御について－

学位論文内容の要旨

【緒言】

著者の属する研究グループは *In vivo* および *In vitro* 実験系で、低カルシウム（Ca）環境が骨および骨形成細胞に及ぼす影響を調べ、低Ca環境を生ずる骨形成抑制の機構の解明を試みている。すでに得られている結果では、低Ca環境の影響は細胞内情報伝達系から最終的に遺伝子に及ぶことを明らかにした。

一方、骨形成を抑制する大きな因子としてインターロイキン 1（IL-1）や腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor: TNF）などが報告されている。特にIL-1 β の骨芽細胞に対する作用は骨形成抑制機構において重要であると考えられるが、IL-1 β が低Ca環境下で培養されたマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞（E1細胞）のALP活性あるいは*c-fos*遺伝子の動向にどのように影響するかについては、これまでに報告されていない。そこで本研究では、低Ca環境下培養において見られる石灰化結節形成抑制の機構を解明することを目的として、IL-1 β で刺激したE1細胞の各成長過程におけるALP活性ならびに*c-fos*遺伝子発現に対する低Ca環境の影響を調べた。

【材料と方法】

細胞はマウス頭蓋冠由来のE1細胞を用い、通法に従い培養した。培養液のCa濃度は、正常環境（対照群）では1.87mM、低Ca環境（低Ca群）では0.34mMとした。

培養3日目の、confluence時を増殖期、confluence後11日目を分化期、confluence後30日目を石灰化期として、各時期まで培養した。

まず細胞の組織学的所見を位相差顕微鏡を用いて観察した。両群の細胞を各時期まで培養後、1%FBS含有 α MEMに交換し、さらに毎日3日間マウスIL-1 β （100U/ml）を投与した。その後、蔗糖溶液で細胞を回収し、パラニトロフェニルリン酸を基質として、ALP活性、酸性ホスファターゼ（ACP）活性を測定し、Lowry法にて測定した蛋白質質量を用い、ALP、ACPの比活性を算出した。

次に細胞を10%FBS含有 α MEMで通法に従い、各時期まで培養後、培養液を、正常、低Ca、それぞれの無血清培養液に交換し、さらに24時間培養した。刺激していないものを0分とし、以下、15、30、60分間、100 (U/ml) の濃度のマウスIL-1 β で刺激した。刺激後、AGPC法にて全RNAを抽出し、Northern blot分析法にて*c-fos*、*c-jun*遺伝子のmRNAの発現の違いについて検討した。それらの発現量はデンストメーターを用いて数値化し、G3PDHで補正、低Ca群と対照群の発現量の比率を求めた。

【結果】

1. 対照群ならびに低Ca群のE1細胞は、サイズ、細胞突起、形態が類似していた。また、石灰化期において、対照群では石灰化結節の形成が認められ、その一塊の結節の周囲には密に細胞が観察された。これに対して低Ca群では全体的に石灰化結節が形成されにくい傾向が示された。
2. ALP活性はIL-1 β で処理をすると、増殖期では低Ca群で低下し、分化期でも低Ca群で低下する傾向が示された。石灰化期ではIL-1 β 処理で対照群、低Ca群のALP活性値が有意に低下し、その低下の程度は低Ca群で大きい傾向が見られた。また、ACP活性はいずれの時期においても対照群、低Ca群ともにIL-1 β の影響はほとんど認められなかった。
3. *c-fos*遺伝子の発現はいずれの時期も対照群に比べて低Ca群の方が強かった。その程度はE1細胞の成長が進行するにつれ大きくなり、その差も著明になった。一方、*c-jun*遺伝子の発現はいずれの時期においても対照群に比べて低Ca群の方が強かったが、その程度は*c-fos*遺伝子の場合と異なり増殖期で顕著で、その後、石灰化期に向かって低下した。
4. 以上の事実から、低Ca環境における*c-fos*遺伝子発現増強に伴うIL-1 β によるALP活性抑制効果の増強が低Ca環境におかれたE1細胞の石灰化結節形成抑制に深く関わっていることが示唆された。

【考察】

1. IL-1 β 処理E1細胞におけるALP活性と低Ca環境について

対照群、低Ca群のE1細胞のALP活性に対するIL-1 β の作用を各時期で比較すると、増殖期では対照群のALP活性値はIL-1 β 処理によって有意に高値を示したが、低Ca群ではほぼ半分にまで活性が低下した。分化期においては、IL-1 β 処理するとALP活性は対照群、低Ca群ともに低値を示した。石灰化期においては、対照群、低Ca群ともにIL-1 β 非存在下のALP活性は増殖期および分化期に比べて高値を示した。さらにIL-1 β で処理すると対照群、低Ca群ともにALP活性は有意に低下し、その低下の程度は低Ca群でより大きい傾向を示した。一方、ACP活性においては、IL-1 β 処理の有無による顕著な活性の変化は見られなかった。

これらのことから、低Ca環境はIL-1 β によるALP活性抑制効果を増強することにより、石灰化結節形成抑制を促進する可能性が示唆された。

2. IL-1 β 処理E1細胞におけるc-fos、c-jun遺伝子発現と低Ca環境について

IL-1 β 処理によって観察されたALP活性低下と低Ca環境によるその作用の増強は、遺伝子発現レベルにおける変化を伴っている可能性がある。そこで、E1細胞をIL-1 β で刺激してc-fos遺伝子の発現を調べたところ、増殖期、分化期および石灰化期のいずれの時期においても15分あるいは30分で最も発現が増強していた。初期発現遺伝子といわれるc-fos遺伝子は、30分前後で一過性に発現が増強することが以前より報告されており、今回の結果はそれらと一致する。

また、c-fos遺伝子の発現量は各時期とも対照群に比べ、低Ca群でより強いことが認められた。c-fos遺伝子発現の低Ca群／対照群の比率を比較すると、細胞の成長が進むに連れ、その値は増加した。これらのことから、IL-1 β で刺激されたE1細胞において低Ca環境はc-fos遺伝子の発現を増加させることが示唆された。

次にc-jun遺伝子のmRNA発現は、増殖期、分化期、石灰化期のいずれの時期においても低Ca環境で増強していることも示された。c-jun遺伝子発現の低Ca群／対照群の比率は増殖期で最も大きな値を示し、分化期、石灰化期と漸減した。これは、c-fos遺伝子発現と逆の傾向である。このc-jun遺伝子発現の漸減的低下が低Ca環境下IL-1 β 処理E1細胞の石灰化結節形成抑制に関与している可能性も考えられる。

3. IL-1 β 処理E1細胞における細胞内情報伝達系と低Ca環境について

骨代謝における病的な状況のモデルとして、E1細胞を低Ca環境という特異的な細胞環境においたところ、石灰化結節形成抑制、IL-1 β によって誘導されるALP活性抑制の増強と同時にc-fos遺伝子の発現の増強が認められた。IL-1 β が細胞膜の受容体に結合した後の情報伝達経路については、MAPキナーゼカスケード経路のc-fos遺伝子の発現増加が報告されている。IL-1 β の刺激が、MAPキナーゼカスケードを介してc-fos遺伝子の発現増加を引き起こし、その産物であるFosタンパク質がALP遺伝子のAP-1認識配列に結合してALPの産生を抑制し、結果としてE1細胞のALP活性が低下するという情報伝達が想定される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博

副 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

低カルシウム環境が骨形成に及ぼす効果の分子的メカニズム

－ *c-fos* 遺伝子発現に伴うインターロイキン 1 β による アルカリ性ホスファターゼの制御について－

審査は審査担当者が全員一堂に会して行われた。まず、論文提出者に研究内容の説明を求めた。研究の概要は以下の通りである。

低カルシウム (Ca) 環境が骨および骨形成細胞に及ぼす影響を調べ、低Ca環境を生ずる骨形成抑制の機構の解明を試みている。既に得られている結果では、低Ca環境の影響は細胞内情報伝達系から最終的に遺伝子に及ぶことを明らかにした。一方、骨形成を抑制する大きな因子としてインターロイキン 1 (IL-1) や腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor:TNF)などが報告されている。特にIL-1 β の骨芽細胞に対する作用は骨形成抑制機構において重要であると考えられるが、IL-1 β が低Ca環境下で培養されたE1細胞のALP活性あるいは*c-fos*遺伝子の動向にどのように影響するかについては、これまでに報告されていない。

本研究では、低Ca環境下培養において見られる石灰化結節形成抑制の機構を解明することを目的として、IL-1 β で刺激したE1細胞の各成長過程におけるALP活性ならびに*c-fos*遺伝子発現に対する低Ca環境の影響を調べた。

【方法】

通常の α MEM (Ca濃度1.87mM) を用いて通法により培養したE1細胞を対照群、培養液中のCa濃度を0.34mMとして培養した細胞を低Ca群とした。そして、両群を培養 3 日目のコンフルエンス時 (増殖期)、コンフルエンス後11日目 (分化期)、コンフルエンス後30日目 (石灰化期) に分け各時期において 3 日間、IL-1 β (100U/ml) を作用させた後ALP活性、酸性ホスファターゼ (ACP) 活性、

蛋白量の測定を行った。さらに、対照群、低Ca群の増殖期、分化期および石灰化期の各時期において0、15、30、60分間、IL-1 β （100U/ml）で処理し、ノーザンブロット分析法にて*c-fos*、*c-jun*遺伝子の発現を比較した。

【結果】

- 1.ALP活性はIL-1 β で処理をすると石灰化期ではIL-1 β 処理で対照群、低Ca群とも有意にALP活性の値が低下し、その程度は低Ca群で大きい傾向が見られた。
- 2.ACP活性は増殖期、分化期、石灰化期のいずれの時期においてもIL-1 β の影響は殆ど認められなかった。
- 3.*c-fos*遺伝子の発現はいずれの時期も対照群に比べて低Ca群の方が強かった。そして、その差はE1細胞の成長が進行するにつれ著明になった。
- 4.*c-jun*遺伝子の発現は*c-fos*遺伝子の場合と同様、いずれの時期においても対照群に比べて低Ca群の方が強かったが増殖期で顕著であった。

【結論】

以上の事実から、低Ca環境による*c-fos*遺伝子発現増強を伴うIL-1 β によるALP活性抑制効果の増強が、低Ca環境におかれたE1細胞の石灰化結節形成抑制に深く関わっていることが示唆された。

続いて、口頭による試問が行われた。研究方法とその結果について種々質問された。特に、低Ca群ではマトリックス様のものはできているようだが、なぜ石灰化しないのか？石灰化に必要なものは何か？が中心的话题になった。これについて論議している中で、本研究の問題点と研究の発展性についても明らかにされた。その後、久保木副査により論述試験が行われたが、ここでも概ね良好な成績を示した。論文提出者が本研究ならびにその関連領域を十分理解していることが認められると同時に、本研究が今後の発展性を持った興味深く意義深いものであると判断された。

以上より、本論文提出者は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定された。