

博士（歯学）出山文子

学位論文題名

A Low Calcium Environment Enhances AP-1
Transcription Factor-Mediated Gene Expression
in the Development of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells

（低カルシウム環境下で培養された骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞石灰化過程
における AP-1 転写因子活性化及びそれに制御される関連遺伝子発現について）

学位論文内容の要旨

Introduction

ラットを低カルシウム (Ca) 食で飼育すると骨粗鬆症および骨萎縮が認められ、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性が上昇する。新生仔ラット大腿骨を低 Ca 環境で培養すると、1) 骨頭部および軟骨板の肥大、2) 培養初期における ALP 活性及びコンドロイチン硫酸合成能の増加、3) コラーゲン合成能の低下が認められる。また、ラット胎仔頭蓋冠由来骨形成系細胞を低 Ca 環境で培養すると、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性、ホスファチジルイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) および細胞内遊離 Ca ($[Ca^{2+}]_i$) の減少が認められた。これらのことから、低 Ca 環境が正常な骨形成・骨吸収のメカニズムに抑制的に働く因子の一つであると推測し実験を開始した。

Materials and Methods

細胞培養：マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様 E1 細胞は、10% FBS および 50 mg / 1 アスコルビン酸含有の α -MEM で通法に従い培養し、培養液は 3 日毎に交換した。低 Ca 濃度の培養液を 0.34 mM (低 Ca 群)、正常 Ca 濃度の培養液を 1.87 mM (対照群) とした。100 mm のディッシュに 5×10^3 cells / cm² の濃度で細胞を播種した。各時期の細胞を回収し、c-fos、c-jun、OC mRNA の発現、ALP 活性を調べた。EGF (100 ng / ml) 处理の細胞は、EGF 处理前に 24 時間 FBS free にし、EGF で処理後細胞を回収した。

E1 細胞の成長：E1 細胞は培養開始 (0 日目) 後すぐに増殖を開始し、約 4 日目で confluent になりその後も増殖を続ける (増殖期)。7 日目頃から多層化し基質を分泌する (分化期)。20 日目頃には結節を形成し、その結節にミネラル沈着が生じて、30 日目頃には石灰化結節を形成する (石灰化期)。

von Kossa 染色：石灰化結節の有無を von Kossa 染色により調べた。von Kossa 染色は通法通り行った。

ALP 活性：培養液中の ALP 活性は、p-nitrophenyl phosphate を基質 (10 mM) とし pH 10.35 で Bessey Lowry 法の変法により 3 日毎に測定した。

total RNA 抽出：total RNA は AGPC 法にて分離した。

mRNA 発現の分析：c-fos、c-jun は Northern blot 分析で、OC は RT-PCR 法にて分析した。シグナルは G3PDH で補正後、Image 1.44, NIH で測定した。

核蛋白分析：各時期の細胞を EGF で一定時間処理し、核蛋白を Schreiber らの方法で抽出し、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で AP-1 DNA 結合活性を分析した。

Results

E1細胞は分化して基質を分泌し30日程で石灰化結節を形成する。培養開始後44日目の細胞をvon Kossa染色したところ、低Ca群で石灰化結節を形成していないことが確認された。

骨芽細胞の分化マーカーであるALP活性は、6-9日目では低Ca群の方が正常群よりも高く有意差が認められた($p<0.01$)。正常群では細胞播種後12日目以降で顕著に増加していたが、低Ca群では増加しなかった。

骨芽細胞の石灰化マーカーであるOC mRNA発現は両群で時間依存的に増加し、27日目でも増加を続けていた。発現開始は対照群で10日目に対し、低Ca群では13日目と遅れていた。しかしその後27日目においては対照群よりも低Ca群の方が高発現していた。

対照群で、*c-fos* mRNA発現はすべての培養期間を通じてほとんど検出されなかつたが、*c-jun* mRNAは常に発現していた。低Ca群では、培養開始後27日目で*c-fos* mRNAは高発現し、*c-jun* mRNAは13日目以前で対照群よりも弱く、20日目以降では強く発現していた。

EGFは血清中に含まれており、細胞の成長調節因子としてよく知られている。EGF処理した細胞において、細胞内伝達機構が低Ca環境によって影響を受けているのではないかと推測し、低Ca環境下で*c-fos*, *c-jun*のmRNAの発現およびAP-1転写因子の結合活性がどのように変化しているかを調べた。

培養開始後3、14、30日目で0、30、60分間細胞をEGF処理し、それぞれtotal RNAを分離し、*c-fos*, *c-jun*のmRNAの発現を調べた。EGFでE1細胞を処理すると、すべての時期において*c-fos*, *c-jun* mRNAは速やかに、かつ一過性に誘導された。両群とも、*c-fos* mRNAは30分でピークとなり60分でほぼ消失し、*c-jun* mRNAは緩やかに誘導された。*c-fos*, *c-jun* mRNA発現の度合いは対照群よりも低Ca群の方が高く、3つの時期では、30日目が最も高く発現していた。このことより、EGF処理したE1細胞において低Ca環境が*c-fos*, *c-jun* mRNAの発現を強めていると思われた。

c-fos と *c-jun* ファミリー産物であるAP-1はc-Fos と c-Junの形成するダイマーで、その結合により様々な遺伝子の転写が調節されることが知られている。そこで、低Ca群における核蛋白のAP-1結合活性を分析した。

AP-1結合活性に特異的な標識したオリゴヌクレオチドと非標識のオリゴヌクレオチドを用いて、競合実験を行った。細胞は30分間EGF処理した後、核蛋白を抽出し、非標識のオリゴヌクレオチドを競合物として100倍加えると、AP-1結合活性は抑制された。

E1細胞を各時期で0, 15, 30, 60, 120分間EGF(100 ng/ml)で処理後、EMSAによって核蛋白を抽出した。EGFを加えた後、AP-1結合活性は一過性に増加した。核蛋白のAP-1結合活性は、対照群に比べ低Ca群では3日目で1.2倍、14日目で2.2倍、30日目で2.4倍増加していた。

AP-1オリゴヌクレオチドで作られたDNA-蛋白複合体中に含まれているc-Fosとc-Jun蛋白の量を測定するために、c-Fosとc-Jun蛋白に対して反応する抗血清を用いてimmunodepletion /supershift assayを行った。

30分間EGF処理したE1細胞の核蛋白は、抗c-Fos抗体または抗c-Jun抗体を入れてブレインキュベート後、放射線でラベルしたヌクレオチドでインキュベートした。DNA-蛋白抗体複合体が存在すると、高い分子量の新しいバンドが検出される。抗c-Jun抗体では全結合活性の77%がシフトした。抗c-Fos抗体で前処理すると、シグナルは減少しなかった。すべての時期において同様の結果が得られた。

Discussion

ALP活性は、対照群では分化期で顕著に増加していたが、低Ca群の変化はわずかであった。これより低Ca環境では細胞の分化が抑制されていることが示唆された。

OCを過剰発現させると石灰化が抑制されると報告されている。低Ca群において、OC mRNAは高発現していたことより、低Ca環境におけるOC mRNAの高発現

が石灰化結節の形成を抑制している可能性が示唆された。

最近の研究では*c-fos*遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは骨の形成抑制が生じ、*c-fos*遺伝子の欠損マウスでは大理石病が生じると報告されている。また、細胞死の時に*c-fos*と*c-jun* mRNAが高発現することが認められている。低Ca環境において*c-fos*と*c-jun* mRNAが27日目で高発現していたことから、低Ca群の細胞が対照群よりも早期に細胞死に陥っていることが示唆された。

細胞は常に血清中の成分の一つであるEGFに刺激を受けているため、EGF処理による*c-fos*と*c-jun* mRNAの発現を調べた。両群とも石灰化期で最も強く分化期で最も弱く発現しており、さらに発現の度合いはすべての時期において低Ca群の方が強かった。このことから、低Ca環境は特に骨芽細胞の分化期および石灰化期におけるEGFの感受性に影響を与えていていることが推測された。

E1細胞をEGF処理すると、AP-1 転写因子のDNA-結合活性は増加した。対照群に比べ低Ca群で経時的に増加していたことより、EGFの感受性に対する低Ca環境の影響は、骨芽細胞のdevelopmentの進行に従って増大していることが示唆された。

c-Jun のスーパーシフトバンドは検出されたが、*c-Fos*は検出されなかった。このことは、EGF刺激により誘導されるAP-1複合体要素は、*Fos*よりも*Jun*ファミリーであることを示唆している。

この研究では、骨芽細胞の発育やEGF反応に関連している転写因子関連遺伝子の発現が、低Ca環境で培養した骨芽細胞において上昇していることが認められ、これらが低Ca環境で骨芽細胞の石灰化結節形成抑制が生じる一因と推測された。今後さらに、細胞・基質間の相互作用を明らかにしていくことが、骨芽細胞の分化や機能の制御機構の解明に重要なと思われる。

学位論文審査の要旨

主査教授 戸塚 靖則

副査教授 松本 章

副査教授 久保木 芳徳

学位論文題名

A Low Calcium Environment Enhances AP-1 Transcription Factor-Mediated Gene Expression in the Development of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells

(低カルシウム環境下で培養された骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞石灰化過程における AP-1 転写因子活性化及びそれに制御される関連遺伝子発現について)

審査は、提出論文とそれに関連した学科目について、申請者に対して各審査員が個別に口頭試問により行い、各審査員の報告をもとに主査がその結果をまとめた。審査論文の要旨は、以下の通りである。

本研究は、骨形成メカニズムを解明する目的で、骨芽細胞様細胞の石灰化過程における低Ca環境の影響を検討したものである。実験には、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様E1細胞を用いた。低Ca群では培養液のCa濃度を0.34mM、対照群では正常Ca濃度範囲内の1.87mMとし、その他の条件は通法に従って培養した。まず、ディッシュに 5×10^3 cells/cm²の濃度で細胞を播種し、石灰化結節の有無を調べた。また、各時期の細胞を回収して、c-fos、c-jun、osteocalcin(OC) mRNAの発現、ALP活性を調べた。培養液中のALP活性は、p-nitrophenyl phosphateを基質(10mM)としてpH10.35でBessey Lowry法の変法により3日毎に測定した。total RNAはAGPC法にて分離した。c-fos、c-junはNorthern blot分析で、OCはRT-PCR法にて分析した。シグナルはG3PDHで補正後、Image 1.44, NIHで測定した。次いで、各時期の細胞をEGFで一定時間処理し、c-fos、c-jun mRNAの発現を調べ、また核蛋白をSchreiberらの方法で抽出し、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を用いて、AP-1 DNA結合活性を分析した。EGF(100ng/ml)処理の細胞は、EGF処理前に24時間FBS freeにし、EGFで処理後細胞を回収した。さらにAP-1オリゴヌクレオチドで作られたDNA-蛋白複合体中に含まれているc-Fosとc-Jun蛋白の量を測定するために、c-Fosとc-Jun蛋白に対して反応する抗血清を用いてimmunodepletion/supershift assayを行った。

培養開始後44日目の細胞をvon Kossa染色したところ、対照群では石灰化結節の形成が認められたが、低Ca群では石灰化結節の形成はみられなかった。ALP活性は、対照群では10-20日目ならびに30日目以降に顕著に増加していた。一方、低Ca群では、6-9日目には正常群よりも高値を示したが、10日目以降増加は認められなかった。この結果は低Ca環境において細胞の分化が抑制されていることを示している。

OC mRNAの発現は両群とも時間依存的に増加した。発現開始時期は対照群で10日目に対し、低Ca群では13日目とやや遅延していたが、増加の度合いは低Ca群で高く、27日目では約3倍高発現していた。OCは骨芽細胞の石灰化マーカーであるが、その一方で過剰発現により石灰化が抑制されるとの報告もあり、低Ca環境における

OC mRNAの高発現が石灰化結節の形成抑制に何らかの関わりを持っているものと考えられた。

対照群において、*c-jun* mRNAは常に発現していたが、*c-fos* mRNAは培養全期間を通じてほとんど発現していなかった。一方、低Ca群においては、*c-jun* mRNAは13日目以前では対照群よりも弱く、20日目以降では強く発現しており、また*c-fos* mRNAは27日目で著しく高発現していた。トランスジェニックマウスを用いた研究から*c-fos*遺伝子は骨の形成抑制あるいは改造と深く関わっていることが知られており、低Ca環境における*c-fos* mRNAの高発現が石灰化結節の形成抑制に何らかの関わりを持っているものと考えられた。また、低Ca環境において*c-fos*と*c-jun* mRNAが27日目で高発現していたことから、低Ca群の細胞は対照群に比べて早期に細胞死に陥っているものと考えられた。

EGF処理により、すべての時期において*c-fos*、*c-jun* mRNAは速やかに、かつ一過性に誘導され、その発現の程度は対照群よりも低Ca群で高く、時期では30日目が最も高かった。この結果は、低Ca環境が骨芽細胞の、特にその石灰化期において、EGF感受性に影響を与えていていることを示している。核蛋白のAP-1結合活性も、EGF処理により一過性に増加した。結合活性の程度は対照群に比べ低Ca群で高く、経時的に増加していたことより、EGFの感受性に対する低Ca環境の影響は、骨芽細胞の分化の進行に従って増大していることが示唆された。Immunodepletion/supershift assayの結果は、測定したすべての時期において、抗*c-Jun*抗体では全結合活性の約80%がシフトしたが、抗*c-Fos*抗体で前処理した場合にはシグナルは減少しなかった。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について、主査および副査より質問が行われた。また久保木審査員からは論述試験が行われた。いずれの質問についても、論文申請者からほぼ満足すべき回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、低Ca環境による細胞の分化の抑制、ならびにその結果としての骨形成機能の抑制が、低Ca環境における骨芽細胞様細胞の石灰化結節形成抑制の一因であることを明らかにしたことが高く評価された。また、その成果を英文でまとめ、Mineral and Electrolyte Metabolismに採択されたことも、本研究の質の高さを示すものとして評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。