

学 位 論 文 題 名

Induction of Calcification in MC3T3-E1 Cells by Inorganic Polyphosphate

（ポリリン酸による MC3T3-E1細胞の石灰化促進効果に関する研究）

学位論文内容の要旨

ポリリン酸はリン酸が直鎖状に結合した高エネルギー化合物で、バクテリアから高等真核生物に至るまでほとんどすべての生体内および組織内に存在する生体高分子である。これまでに行われてきた研究より、微生物においては、ポリリン酸が ATP 合成のためのエネルギーリザーバー、ストレス応答遺伝子の発現調節因子等の生理機能を有していることがわかっている。バクテリアではポリリン酸キナーゼやポリリン酸分解酵素をはじめとした多数のポリリン酸代謝酵素が発見されているが、その中で注目されているのが、ポリリン酸をリン酸源とした各種リン酸化酵素である。そこで、ポリリン酸キナーゼとポリリン酸-AMP リン酸転移酵素の2つを用い、ポリリン酸をリン酸源として AMP（アデノシン1リン酸）からの ATP 再生系の構築を行った。この系を用いて効率的に ATP が再生できることから、工業レベルへの応用が期待されている。しかしながら高等真核生物におけるポリリン酸の役割については未だ不明な点が多く、真核生物でのポリリン酸の代謝についてもほとんどわかっていない。最近になって、真核生物を対象としたポリリン酸の生理機能に関する研究がはじまり、ポリリン酸が繊維芽細胞増殖因子（FGF）を安定化し、細胞増殖を促進する効果をもつことなどがわかってきた。ポリリン酸は FGF と結合してそのタンパクを安定化するだけでなく、FGF レセプターとの結合を強固にすることにより細胞増殖を促進していると考えられる。

また、ヒト骨芽細胞にはポリリン酸が多く含まれており、エクソ型及びエンド型のポリリン酸分解活性も骨芽細胞で高いことが報告され、骨分化とポリリン酸との関連が指摘されている。しかしながら、これまでポリリン酸が骨芽細胞の分化と機能に関与していることを直接報告した例はない。歯周組織内においても骨芽細胞は重要な役割を果たしており、骨芽細胞分化とポリリン酸との関連が明らかとなれば、先に述べたポリリン酸の繊維芽細胞増殖促進効果と合わせて、歯周組織再生にポリリン酸が積極的に関与している可能性を示すことができると考えられる。そこで私は、ポリリン酸が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について調べ、ポリリン酸を歯周組織再生へと利用できる可能性

について検索した。

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞の培養上清中に鎖長 40 から 60 程度のポリリン酸(終濃度 0.1mM、0.5 mM および 1mM)を添加し、細胞のアルカリホスファターゼ活性およびポリリン酸分解活性、各種骨分化マーカー遺伝子の発現量、細胞石灰化度について、無処理あるいはオルトリン酸処理した陰性対照群、 β -グリセロリン酸+アスコルビン酸処理陽性対照群と比較した。

アルカリホスファターゼ活性は細胞石灰化の際のリン酸供給に関与する酵素であり、石灰化の指標として用いられている。陰性対照群においてアルカリホスファターゼ活性は全く誘導されず、ポリリン酸処理によって誘導されたが、その効果は陽性対照群と比較すると低かった。この結果より、ポリリン酸はアルカリホスファターゼ活性誘導に関して積極的に働くことが示されたが、その効果が緩やかなものであったことから、細胞をポリリン酸で処理した場合にはアルカリホスファターゼだけでなく、別のリン酸供給経路が存在する可能性が示唆された。

オステオポンチンやオステオカルシンは細胞石灰化の際に特異的に発現する遺伝子である。各遺伝子の転写産物であるタンパクは細胞外へと分泌され、骨芽細胞と細胞外マトリックスとの結合に重要な役割を果たしていることがわかっている。定量 PCR 法を用いて骨分化マーカー遺伝子であるオステオポンチン、オステオカルシンの mRNA 発現量を調べたところ、両遺伝子の発現がポリリン酸により顕著に誘導され、それらの発現誘導効果が濃度依存的であることがわかった。オステオポンチン遺伝子はポリリン酸濃度 1 mM および 0.5 mM により発現誘導され、0.1 mM では効果はみられなかった。オステオポンチン遺伝子はポリリン酸処理開始直後から発現誘導され、処理後 10 日で発現量が最大となった。オステオカルシン遺伝子はポリリン酸濃度 0.1 mM および 0.5 mM で発現誘導され、1 mM では効果はみられなかった。オステオカルシン遺伝子はポリリン酸処理開始後約 20 日目から発現誘導され、処理後 28 日目で発現量が最大となった。それぞれの結果から、オステオポンチンでは 1 mM ポリリン酸により、オステオカルシンでは 0.1 mM ポリリン酸によりそれぞれの遺伝子発現誘導効果が最も高くなることがわかった。

次に、アリザリンレッド染色により処理開始後 31 日目における各種細胞の石灰化度を観察したところ、ポリリン酸処理を行った細胞で強染色像がみられ、陽対照群と比較して石灰化度は顕著に高いことがわかった。また、同様の処理を繊維芽細胞である Balb/c 3T3 細胞に対して行い、石灰化染色を行ったところ、ポリリン酸処理を行った場合でも染色像がみられなかったことから、この細胞石灰化は骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞に特異的なものであることが確かめられた。

さらに、各処理を行った細胞の粗抽出液を用いてポリリン酸分解活性を調べた結果、

ポリリン酸処理群においてエクソ型及びエンド型のポリリン酸分解活性が顕著に誘導されることがわかった。これらの活性はともに処理開始後 11 日目からみられ、その後 23 日目においても活性が見られた。ここで、エンド型ポリリン酸分解活性により産生される低分子物質は大腸菌由来エクソ型ポリリン酸分解酵素によりオルトリン酸に分解され、それらが鎖長 2 から 5 の短鎖ポリリン酸であることが確かめられた。またエクソ型ポリリン酸分解活性によりポリリン酸がオルトリン酸へと分解されることから、このポリリン酸分解活性がアルカリホスファターゼ活性と相補的に働くリン酸供給経路となる可能性が示唆された。また、細胞外のオルトリン酸濃度が高くなることによりオステオポンチン遺伝子の発現が誘導されることが報告されている。このことから、ポリリン酸処理群でオステオポンチン遺伝子の発現が顕著に誘導されるのは、ポリリン酸によってエクソ型及びエンド型ポリリン酸分解活性が上昇し、その結果オルトリン酸濃度が高められることに由来すると考えられる。これらの結果は、ポリリン酸が細胞石灰化の際のシグナル分子として働くだけでなく、ポリリン酸自身が分解されることによって石灰化のリン酸源となりうる可能性を示している。

上記の結果より、ポリリン酸が骨芽細胞の石灰化を顕著に誘導することが分子レベルで解明され、硬組織の再生にポリリン酸が積極的に関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Induction of Calcification in MC3T3-E1 Cells by Inorganic Polyphosphate

(ポリリン酸による MC3T3-E1細胞の石灰化促進効果に関する研究)

審査は、審査員全員が出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

最初に、申請者により学位論文に関する以下の説明がなされた。

ポリリン酸はリン酸が直鎖状に結合した高エネルギー化合物で、バクテリアから高等真核生物までほとんどすべての生体内および組織内に存在する生体高分子である。これまでに、微生物ではポリリン酸がエネルギーリザーバーなどの生理機能を有していることがわかっているが、高等真核生物における研究はまだほとんど行われておらず、ポリリン酸の役割は未だ不明な点が多い。

申請者はヒト骨芽細胞にポリリン酸が多く含まれていることに注目し、ポリリン酸の骨芽細胞に対する影響を調べた。マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞の培養上清中にポリリン酸を添加し、細胞のアルカリホスファターゼ活性およびポリリン酸分解活性、各種骨分化マーカー遺伝子の発現量、細胞石灰化度について検索した。その結果、ポリリン酸はアルカリホスファターゼ活性誘導に関して積極的に働くことが示されたが、その効果が緩やかなものであったことから、細胞をポリリン酸で処理した場合にはアルカリホスファターゼだけでなく、別のリン酸供給経路が存在する可能性が示唆された。定量 PCR 法を用いて骨分化マーカー遺伝子であるオステオポンチン、オステオカルシンの mRNA 発現量を調べたところ、両遺伝子の発現がポリリン酸により顕著に誘導され、アリザリンレッド染色により細胞の石灰化度を観察したところ、ポリリン酸処理を

行った細胞で石灰化度は顕著に高いことがわかった。さらに、各処理を行った細胞の粗抽出液を用いてポリリン酸分解活性を調べた結果、ポリリン酸処理群においてエクソ型及びエンド型のポリリン酸分解活性が顕著に誘導され、このポリリン酸分解活性がアルカリホスファターゼ活性と相補的に働くリン酸供給経路となる可能性が示唆された。これらの結果は、ポリリン酸が細胞石灰化の際のシグナル分子として働くだけでなく、ポリリン酸自身が分解されることによって石灰化のリン酸源となりうる可能性を示している。

上記の結果より、ポリリン酸が骨芽細胞の石灰化を顕著に誘導することが分子レベルで解明され、硬組織の再生にポリリン酸が積極的に関与していることが示唆された。

引き続き、審査担当者からの質問が行われた。主な質問項目は、

1. ポリリン酸によるエネルギー合成はあるのか。
2. ポリリン酸のエネルギー結合について
3. FGF の安定化はどのような機構でおこるのか、さらに生物学的メカニズムは？
4. FGF の安定化とポリリン酸の濃度との関係
5. 細胞増殖におよぼすポリリン酸の影響について
6. アポトーシスとの関連性について 等であった。

いずれの質問に対しても、申請者から明確な回答を得られ、さらに関連分野に対する幅広い知識を有していることが示された。申請者から、今後の研究への展望も示され、学位取得後も研究を発展させていく可能性が高いことが明らかになり、学位授与に値するものと考えられた。