

学 位 論 文 題 名

Mechanical stress up-regulates RANKL expression via VEGF autocrine in osteoblastic MC3T3-E1 cells

(メカニカルストレスは VEGF autocrine を介し
骨芽細胞様細胞の RANKL の発現を増強する)

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯科矯正治療において歯を移動するためには、矯正力の負荷による骨のリモデリングが必要である。このような骨のリモデリングにおいて血管新生と骨吸収は密接な関係にあり組織学的な研究においても血管の進入と、破骨細胞の出現が同時期に認められることが知られている。さらに破骨細胞は造血幹細胞由来であるため、血管の存在は骨のリモデリングに関して重要な要素と考えられる。

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は脈管形成および血管新生に関与する一群の糖タンパク質である。VEGF-A はそのレセプターである VEGFR-1 (Flt-1) および VEGFR-2 (Flk-1) に結合することが報告されている。血管内皮細胞に存在する VEGFR-2 は血管新生に関与し、単球・マクロファージに存在する VEGFR-1 は単球・マクロファージの分化・成熟や細胞遊走を刺激する働きをもつ一方、破骨細胞による骨吸収において M-CSF と類似した機能を持ち単球・マクロファージの活性化にも関与することが報告されている。したがって VEGF-A は血管新生と破骨細胞誘導をとともに促進する因子であるため、骨芽細胞から産生される VEGF-A は骨のリモデリングにおいて重要な要素と考えられる。しかし、骨芽細胞にメカニカルストレス (MS) を作用した場合、VEGF および VEGFR が骨形成・骨吸収にどのような影響を与えるかについての報告はほとんどない。そこで本研究では骨芽細胞に MS を与えた際の VEGF および VEGFR 発現と骨形成・骨吸収関連因子の発現について検討した。

【材料と方法】

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を、I 型コラーゲンコートした Bio Flex プレートに播種し、Flexer cell tension system を用いて 30 cycles/分、伸展率 10% で MS を 6、12、24、48 時間作用させた。MS を作用させた後、培養上清と細胞を回収し VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR-2、M-CSF、RANKL、I 型コラーゲン、オステオプロテグリン (OPG)、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) およびマトリックスメタプロテナーゼ-13 (MMP-13) の遺伝子発現動態を RT-PCR 法により検討した。さらに培養上清中の VEGF 量および M-CSF 量を ELISA 法にて測定した。また VEGF 中和抗体の添加が遺伝子発現動態にどのような影響を与えるか検討した。

【結果】

・骨芽細胞に対する MS が遺伝子発現動態に与える影響

VEGFR-2 mRNA 発現は MS 群および control 群共に認められなかった。MS 群は control 群に対し 6 時間

から 48 時間のすべてで VEGF-A および RANKL mRNA 発現が上昇し、VEGFR-1 および OPG mRNA 発現は 24 時間以降で上昇した。ALP mRNA 発現は 24 時間以降で減少した。MMP-13 mRNA 発現は 48 時間でやや増加傾向を認めた。M-CSF と I 型コラーゲン mRNA 発現に差は認められなかった。

・培養上清中の VEGF 量および M-CSF 量

MS 群の VEGF 量は control 群に対し 6 時間から 48 時間までのすべての時間帯で増加した。MS 群の M-CSF 量は control 群に対し 12 時間から 48 時間でやや減少傾向を認めた。

・VEGF 中和抗体添加が骨芽細胞の遺伝子発現動態に与える影響

抗体添加 MS 群では非添加 MS 群と比較して VEGF-A 遺伝子発現が 48 時間で 53%にまで抑制され、VEGFR-1 遺伝子発現の増加は control level まで完全に抑制された。さらに RANKL 遺伝子発現が 48 時間で 56%にまで抑制された。48 時間で認められた MMP-13 遺伝子発現の増加が抑制された。またその他の遺伝子発現に抗体添加の影響は認められなかった。

【考察】

MS に応答して VEGF-A 遺伝子の発現が増加し培養上清中の VEGF 量が増加することが示された。また VEGF-A の受容体である VEGFR-1 遺伝子の発現も増強されたことから VEGF-A は autocrine 的に作用する可能性が示唆された。さらに RANKL 遺伝子、OPG 遺伝子、MMP-13 遺伝子は MS により発現が増強され、ALP 遺伝子は MS により発現が抑制された。すなわち MS は VEGF-A および RANKL 発現の増強とともに破骨細胞を分化誘導し、骨吸収を促進する可能性が示された。さらに骨形成関連因子を抑制し、骨吸収をサポートしている可能性も示唆された。

そこで MS に応答し VEGF-A が autocrine 的に作用しているか否かと、もし VEGF autocrine が存在するなら、その他の遺伝子発現に VEGF autocrine が影響を与えるのかを検索するため VEGF 中和抗体を MS 群および control 群共に添加し、比較検討した。その結果 VEGF-A 遺伝子発現が 53%にまで抑制され、VEGFR-1 遺伝子発現の増加は control level まで完全に抑制されたため VEGF-A は autocrine 的に作用することが示された。さらに VEGF autocrine は RANKL 遺伝子および MMP-13 遺伝子発現を修飾する可能性が示された。

VEGF-A は血管内皮細胞の VEGFR-2 と結合することで血管新生に関与し、骨芽細胞の VEGFR-1 と結合することで骨芽細胞の分化・成熟を刺激すると報告されている。また、造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系前駆細胞が破骨細胞へ分化する最終決定を行っているのは骨芽細胞が発現する破骨細胞分化誘導因子 RANKL であると報告されている。今回は M-CSF 遺伝子の発現には差がなかったものの、VEGF-A は VEGF autocrine を介した RANKL 遺伝子発現増強と血管新生の促進との二つの点で、骨のリモデリングに重要な役割を果たす可能性が示された。一方、中和抗体によって VEGF autocrine を阻害しても VEGF-A および RANKL 遺伝子発現が control level まで抑制されなかった。骨芽細胞には MS に応答し VEGF-A 遺伝子発現や RANKL 遺伝子発現を増強するチャンネルが存在すると報告されている。したがって MS に応答し骨吸収関連因子の発現を修飾するこれらのチャンネルの関与あるいはそれ以外の経路が存在する可能性も示された。

MMP-13 は骨基質蛋白の 90%を占める I 型コラーゲン線維を直接断片化する蛋白分解酵素コラゲナーゼである。MMP-13 は骨基質を活性に合成分泌している骨芽細胞には認められず、破骨細胞直下の骨基質表面に局在していると報告されており、骨芽細胞が分泌した MMP-13 により断片化された I 型コラーゲンが破骨細胞由来のゼラチナーゼ MMP-9 によりさらに分解されると考えられている。すなわち MS は VEGF autocrine を介し RANKL 遺伝子発現を増強することで破骨細胞を活性化すると同時に MMP-13 遺伝子発現を増強することで骨吸収を促進する可能性が示された。

【結論】

骨芽細胞にメカニカルストレスを作用した際 VEGF-A/VEGFR-1 発現が増強し VEGF-A が autocrine 的に作用していることが示唆された。メカニカルストレスは VEGF autocrine を介し RANKL や MMP-13 発現を増強することで、骨吸収を促進する可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Mechanical stress up-regulates RANKL expression via VEGF autocrine in osteoblastic MC3T3-E1 cells

(メカニカルストレスは VEGF autocrine を介し
骨芽細胞様細胞の RANKL の発現を増強する)

審査は審査員全員出席の下で行った。まず申請者に提出論文要旨の説明を求めるとともに、適宜提出論文の内容と関連分野に関する説明を求め、その後、口頭試問の形式でその内容および関連分野について試問した。まず申請者から以下の説明がなされた。

【緒言】 骨のリモデリングにおいて血管新生と骨吸収は密接な関係にあることが知られている。一方、VEGF-A は血管内皮細胞の VEGFR-2 と結合することで血管新生に関与するとともに、骨芽細胞の VEGFR-1 と結合することで骨芽細胞の分化・成熟を刺激することも報告されている。また、VEGF-A は破骨細胞による骨吸収において M-CSF と類似した機能を持つことも報告されている。しかし骨芽細胞にメカニカルストレス (MS) を加えた場合、VEGF-A および VEGFR が骨形成・骨吸収にどのような影響を与えるかについての報告はほとんどない。そこで本研究では骨芽細胞に MS を作用させた際の VEGF-A および VEGFR 発現と骨形成・骨吸収関連因子の発現について検討した。

【材料と方法】 マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に対し Flexer cell tension system を用いて MS を作用させた。刺激開始 6 時間から 48 時間後に細胞を回収し、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR-2、M-CSF、RANKL、I 型コラーゲン、OPG、ALP、MMP-13 の遺伝子発現動態を RT-PCR 法により検討し、さらに培養上清中の VEGF 量および M-CSF 量を ELISA 法にて測定した。また VEGF 中和抗体の添加が遺伝子発現動態にどのような影響を与えるのか検討した。

【結果】

・骨芽細胞に対する MS が遺伝子発現動態に与える影響

MS 群では control 群に対し 6 時間から 48 時間のすべてで VEGF-A および RANKL mRNA 発現が上昇し、VEGFR-1 および OPG mRNA 発現は 24 時間以降で上昇した。

ALP mRNA 発現は 24 時間以降で減少した。MMP-13 mRNA 発現は 48 時間でやや増加傾向を認めた。M-CSF と I 型コラーゲン mRNA 発現に差は認められなかった。

・培養上清中の VEGF 量および M-CSF 量

MS 群の VEGF 量は control 群に対し 6 時間から 48 時間までのすべての時間帯で増加した。MS 群の M-CSF 量は control 群に対し 12 時間から 48 時間でやや減少傾向を認めた。

・VEGF 中和抗体添加が骨芽細胞の遺伝子発現動態に与える影響

抗体添加 MS 群では非添加 MS 群と比較して VEGF-A 遺伝子発現が 48 時間で 53% にまで抑制され、VEGFR-1 遺伝子発現の増加は control level まで完全に抑制された。さらに RANKL 遺伝子発現が 48 時間で 56% にまで抑制された。48 時間で認められた MMP-13 遺伝子発現の増加が抑制された。またその他の遺伝子発現に抗体添加の影響は認められなかった。

【考察】マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞は MS に応答し VEGF-A が autocrine 的に作用することが明らかとなった。破骨細胞前駆細胞が破骨細胞へ分化する最終決定を行っているのは RANKL であると報告されており、M-CSF 遺伝子の発現には差がなかったものの、VEGF-A は VEGF autocrine を介した RANKL 遺伝子発現増強と血管新生の促進との二つの点で、骨のリモデリングに重要な役割を果たす可能性が示された。MMP-13 は骨基質蛋白の 90%を占める I 型コラーゲンを直接断片化する酵素であり、VEGF autocrine を介して骨吸収を促進する可能性が示された。

以上の論述に引き続き、以下の項目を中心に口頭試問を行った。

1. 明らかとなった VEGF autocrine をコントロールする機構について
2. 骨代謝における血管新生の役割について
3. M-CSF と VEGF のそれぞれが破骨細胞分化へ寄与する程度について
4. 今後の研究の展望について

これまでに、破骨細胞の出現に VEGF が関与することは知られていたが、本研究では、骨芽細胞様細胞を用いて矯正力などの機械的刺激による VEGF の産生と骨吸収の機構について検討した。その成果、機械的刺激によって VEGF の産生が増加し、autocrine 的な機構により骨吸収に関与する物質の遺伝子発現を増加していることを明らかにした。この成果は歯科医学に留まらず、広く医学の発展に寄与するものであり高く評価できる。加えて、試問に対する申請者の回答は適切なものであり、本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野における基礎的、臨床的な広い学識を申請者が有していること、さらに今後の研究の展望についても評価された。よって審査担当者は、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。