

Title	レチノイン酸（RA）による未分化間葉系細胞の分化制御メカニズム
Author(s)	久田, 邦博
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46409
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	ひさ だ くに ひる 久 田 邦 博
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 20219 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	レチノイン酸 (RA) による未分化間葉系細胞の分化制御メカニズム
論文審査委員	(主査) 教 授 米田 俊之 (副査) 教 授 矢谷 博文 助教授 米原 典史 助教授 山城 隆

論 文 内 容 の 要 旨

〈目的〉

骨芽細胞と脂肪細胞は、未分化間葉系細胞を起源とする。骨粗鬆症では、骨量の減少つまり骨芽細胞分化の低下に並行して脂肪細胞が著しく増加することが報告されている。したがって、このような骨芽細胞と脂肪細胞の分化バランスを調節するメカニズムの解明は、骨形成をコントロールする上で貴重な手がかりになると期待される。近年、ビタミン A の誘導体であるレチノイン酸 (RA) が、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することが報告されている。しかしながら、その分子作用メカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究では、RA による骨芽細胞の分化促進メカニズムの解明と骨形成において中心の役割を演じる BMP の細胞シグナルと、RA シグナルとの相互関連を検討した。また、脂肪細胞分化において重要な役割を担う転写因子、C/EBP ファミリーおよび PPAR γ に対する RA の作用を明らかにし、RA による脂肪細胞分化抑制の分子メカニズムについても検討を加えた。

〈実験方法〉

1. 未分化間葉系細胞の骨芽細胞および脂肪細胞分化の検討

BMP2 刺激により骨芽細胞あるいは脂肪細胞へと分化誘導される未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 および 3T3-F442A 細胞を用いて実験を行った。骨芽細胞への分化はアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、脂肪細胞への分化はオイルレッド O 染色を指標に評価した。

2. 骨芽細胞の石灰化の検討

3 日齢 DDY マウス頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞および 4 週齢マウス大腿骨より採取した骨髓細胞を用いて、アリザリンレッド染色を指標に評価した。

3. Smad の転写制御に対する検討

Smad 結合配列 (BRE) を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を用いて Smad の転写活性を検討した。

〈結果〉

1. 骨芽細胞分化における RA の作用

①骨芽細胞分化に対する RA の効果

3T3-F442A 細胞に RA を作用させると、ALP 活性陽性の骨芽細胞への分化が誘導された。この RA の骨芽細

胞分化誘導作用は、未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2、C2C12 においても認められた。

②骨芽細胞分化過程における RA と BMP2 シグナルの相互関係

3T3-F442A 細胞に BMP2 を添加すると、ALP 活性陽性の骨芽細胞への分化が誘導された。その効果は RA 添加によりさらに増強された。この増強作用は未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2、C2C12 においても認められた。また、RA は Smad の転写活性をさらに強めた。

③骨芽細胞分化過程における RA と Runx2 の相互関係

アデノウイルスを用いてドミナントネガティブ型 Runx2 を 3T3-F442A 細胞に過剰発現させても、RA による骨芽細胞分化誘導効果に変化は認められなかった。さらに Runx2(-/-) 細胞に RA を作用させた場合でも、ALP 活性陽性の骨芽細胞への分化が誘導された。

④骨芽細胞石灰化に対する RA の効果

BMP2 は初代培養骨芽細胞の、石灰化を促進したが、RA はその効果を抑制した。骨髄細胞においても RA はアスコルビン酸および β -グリセロリン酸による石灰化誘導促進効果を抑制した。さらに初代培養骨芽細胞にドミナントネガティブ型 RAR を強制発現させたところ、石灰化誘導が促進された。

2. 脂肪細胞分化における RA の作用

①脂肪細胞分化過程における PPAR γ の作用に対する RA の効果

アデノウイルスシステムを用いて、PPAR γ を 3T3-F442A 細胞に過剰発現させると、オイルレッド O 染色陽性脂肪細胞への分化が誘導されたが、RA は PPAR γ による脂肪細胞分化誘導を抑制した。

②脂肪細胞分化過程における PPAR γ の発現に対する RA の効果

3T3-442A 細胞にインシュリンを添加、あるいは C/EBP β と C/EBP δ を過剰発現させると、PPAR γ の発現とオイルレッド O 染色陽性の脂肪細胞への分化が誘導された。RA は PPAR γ の発現および脂肪細胞分化の誘導を強く阻害した。

(結論・考察)

本研究結果により、RA は未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を促進し、その効果は BMP シグナル、特に Smad と協調的であることが明らかとなった。また RA は Runx2 と協調的に骨芽細胞分化を誘導する一方で、Runx2 が関与しない、メカニズムを介しても骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。骨芽細胞の石灰化に対しては、RA は抑制作用を示したが、促進すると結果も報告されており、さらに詳細な検討が必要である。脂肪細胞分化においては、RA は PPAR γ の発現と機能を阻害することにより分化を抑制することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨形成に重要な役割を演じる未分化間葉系細胞の骨芽細胞、ならびに脂肪細胞への分化に対するレチノイン酸の影響について検討を行ったものである。

その結果、レチノイン酸は、骨形成促進因子 BMP のシグナルと協調して、また、骨形成に必須の転写因子 Runx2 への依存の有無にかかわらず、未分化間葉系細胞の骨芽細胞分化を誘導し、一方、脂肪細胞分化に対しては抑制作用を示すことが明らかとなった。

以上の結果は、骨芽細胞による骨形成の分子メカニズムに関する新たな知見を提供し、骨形成が低下するさまざまな骨疾患の病態の解明、ならびに新規の治療法開発の指針となるものであり、博士(歯学)を授与するに値すると認める。