



Title	α 7ニコチン性アセチルコリン受容体が骨芽細胞分化に及ぼす影響
Author(s)	盛林, 昭仁
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61676
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 盛 林 昭 仁 ）	
論文題名	α7ニコチン性アセチルコリン受容体が骨芽細胞分化に及ぼす影響
論文内容の要旨 【緒言】 抜歯後の高度な顎堤吸収はインプラント治療や補綴歯科治療による審美回復あるいは機能回復を困難にするため、歯槽骨の吸収を予防する技術の確立，ならびに失われた歯槽骨を再生する技術の確立は歯科補綴学にとって重要な課題である。近年、遺伝子欠損マウスを用いた研究から、骨代謝制御への α7 ニコチン性アセチルコリン受容体(α7-nAChR)の関与が報告された。α7-nAChR は主に大脳皮質や海馬などの中枢に存在するとされていたが、近年、末梢のマクロファージ上にも存在し、炎症反応を制御していることが明らかとなり、注目を集めている。我々の研究グループはこれまでに、マクロファージと関連性の深い破骨細胞における α7-nAChR の影響を検討し、α7-nAChR の特異的拮抗薬である methyllycaconitine (MLA) が破骨細胞分化を抑制することを明らかにしてきた。しかしながら、α7-nAChR が骨芽細胞分化および骨再生に及ぼす影響についてはいまだ明らかにされていない。 本研究の目的は骨芽細胞分化における α7-nAChR の関与を明らかにし、α7-nAChR が骨再生治療の新たな標的分子となり得るかを検討することである。 【方法】 本実験では、マウス骨芽細胞株（MC3T3-E1 細胞）およびラット骨髓由来間葉系幹細胞（Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cell : MSC）を用いた。α7-nAChR の特異的拮抗薬には MLA，特異的作動薬には PNU-282987（PNU）を用いた。MC3T3-E1 細胞および MSC を MLA 添加，PNU 添加，あるいは非添加で増殖培地中に 6 日間，あるいは骨芽細胞分化誘導培地中に 30 日間培養した。 1. α7-nAChR が MC3T3-E1 細胞および MSC に発現しているかを検討するため Western blotting 解析を行った。 2. MLA および PNU が MC3T3-E1 細胞および MSC の細胞増殖に及ぼす影響を WST-1 法で検討した。 3. MLA および PNU が MC3T3-E1 細胞の細胞外基質の石灰化に及ぼす影響を Alizalin Red 染色により評価し、骨芽細胞特異的遺伝子（Runx2, Osterix, Osteocalcin, BSP）の発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 解析により評価することで、MLA および PNU が MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。 4. MLA および PNU が MSC の細胞外基質の石灰化に及ぼす影響を Alizalin Red 染色により評価し、骨芽細胞特異的遺伝子（Runx2, Osterix, Osteocalcin）の発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 解析により評価することで、MLA および PNU が MSC の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。 5. MLA および PNU の添加濃度の差異による影響を検討するため、MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞特異的遺伝子（Osterix, Osteocalcin, BSP）の発現の経時的変化をリアルタイム RT-PCR 解析で、α7-nAChR の発現に及ぼす影響を Western blotting 解析で検討した。 6. MLA および PNU が骨再生に及ぼす影響を検討するため、MLA および PNU を含浸させたコラーゲンスポンジをラット頭蓋骨に形成した 5 mm の欠損部に填入し、3 週間にわたり 2, 3 日毎に MLA および PNU を局所注射した。3 週間後に頭蓋骨を摘出し、骨組織再生を組織切片観察（HE 染色）およびマイクロ CT 画像解析により評価した。なお、同様の術式で生理食塩水を用いたものを非投与群とした。 【結果】 1. Western blotting 解析により、骨芽細胞分化誘導前の MC3T3-E1 細胞および MSC とともに α7-nAChR の発現が確認され、骨芽細胞分化誘導後にはその発現量が増大していた。	

2. WST-1 細胞増殖試験により, 0.1-25 μM までの MLA および PNU は MC3T3-E1 細胞および MSC の細胞増殖に有意な影響を及ぼさなかった。
3. Alizarin Red 染色により, 0.1-25 μM の MLA および 1-25 μM の PNU は分化誘導 30 日目において MC3T3-E1 細胞の細胞外基質の石灰化を有意に促進した (ANOVA : $P<0.01$)。また, リアルタイム RT-PCR 解析により, 0.1-1 μM の MLA および 10-25 μM の PNU は分化誘導 28 日目において MC3T3-E1 細胞の *Runx2*, *Osterix*, *Osteocalcin*, *BSP* 遺伝子の発現を有意に促進した (ANOVA : $P<0.01$)。
4. Alizarin Red 染色により, 0.1 μM の MLA および 1-25 μM の PNU は分化誘導 21 日目において MSC の細胞外基質の石灰化を有意に促進した (ANOVA : $P<0.01$)。また, リアルタイム RT-PCR 解析により, 10 μM の MLA および 10-25 μM の PNU は分化誘導 21 日目において MSC の *Runx2*, *Osterix*, *Osteocalcin* 遺伝子の発現を有意に促進した (ANOVA : $P<0.01$)。
5. リアルタイム RT-PCR 解析により, MC3T3-E1 細胞において, MLA を添加した場合における骨芽細胞分化特異的遺伝子発現は, 処置時間に依存して増強され, 骨芽細胞分化特異的遺伝子発現の程度は低濃度の方がより強くなる傾向が認められた (分化誘導 21 日後で 0.1 μM の MLA が *Osteocalcin*, *BSP* 遺伝子の発現を有意に促進した : $P<0.05$)。また, PNU を添加した場合における骨芽細胞分化特異的遺伝子発現も, 処置時間に依存して増強されたが, MLA とは逆に骨芽細胞特異的遺伝子発現の程度は高濃度で強い傾向が認められた (分化誘導 21 日後では 10-25 μM の PNU が *Osterix*, *Osteocalcin*, *BSP* 遺伝子の発現を有意に促進した : $P<0.05$)。さらに, Western blotting 解析により, MLA 添加群の分化誘導 5 日目における $\alpha 7$ -nAChR の発現は, 10, 25 μM の MLA に比べ, 0.1, 1 μM の MLA で著明に高かった。一方, PNU 添加群の分化誘導 5 日目における $\alpha 7$ -nAChR の発現は, 0.1, 1, 10 μM の PNU と比べ, 25 μM の PNU でより著明に高かった。
6. ラット頭蓋骨欠損モデルの実験により, 術後 3 週間で MLA 投与群, PNU 投与群, および非投与群ともに新生骨の形成を認めたが, MLA および PNU 投与群により広範囲の新生骨の形成を認めた。また, マイクロ CT 画像解析にて骨体積および骨塩量を測定した結果, 500, 5,000 ng/site の MLA および PNU 投与群は, 非投与群と比較して有意な骨形成促進作用を認めた (ANOVA : $P<0.01$)。

【結論】

本研究の結果, MLA および PNU は, MC3T3-E1 細胞および MSC の骨芽細胞分化促進作用を有することが明らかとなり, 骨芽細胞分化機構における $\alpha 7$ -nAChR の関与が示唆された。また, ラット頭蓋骨欠損部位への MLA または PNU の投与は骨形成を促進することから, 骨再生治療の新たな標的分子として $\alpha 7$ -nAChR が有効である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (盛 林 昭 仁)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授 矢谷 博文
	副 査 大阪大学教授 田熊 一徹
	副 査 大阪大学准教授 北村 正博
	副 査 大阪大学講師 村上 智彦
論文審査の結果の要旨	
本研究の目的は、骨芽細胞分化における $\alpha 7$-nAChR の関与を明らかにし、$\alpha 7$-nAChR が骨再生治療の新たな標的分子となり得るかを検討することである。 その結果、MLA および PNU は、MC3T3-E1 細胞および MSC の骨芽細胞分化促進作用を有することが明らかとなり、骨芽細胞分化機構における $\alpha 7$-nAChR の関与が示唆された。また、ラット頭蓋骨欠損部位への MLA または PNU の投与は骨形成を促進することから、骨再生治療の新たな標的分子として $\alpha 7$-nAChR が有効である可能性が示唆された。 以上の研究成果は、$\alpha 7$-nAChR を標的とした新たな再生医療技術の発展に繋がるものと期待され、本研究は博士（歯学）の学位に値するものと認める。	