

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御学領域顎口腔腫瘍病態学教育研究分野 氏名 伊藤 良平
(論文題目) Periosteum-derived cells respond to mechanical stretch and activate Wnt and BMP signaling pathways (骨膜由来細胞は力学的伸展刺激に応答し Wnt と BMP の signaling pathway を活性化する)	
(内容の要旨) <u>目的・背景</u> 骨膜は、骨代謝において栄養と骨芽細胞の供給源として働き、骨形成促進能を持つとされるが、骨リモデリングにおける骨膜の機能はほとんど不明である。我々は、骨膜がメカニカルストレスを感知し骨リモデリングにおけるメカノセンサー機能を有するという仮説を立て、ヒト顎骨骨膜由来細胞 (Human Jaw Bone Periosteum Cells、以下 HJBPCs) に対して進展刺激を加え、骨代謝関連遺伝子の変動について検討した。 <u>材料・方法</u> 研究協力者の下顎大臼歯部より骨膜組織を採取し、HJBPCs を分離、培養した。対照としてヒト正常歯肉線維芽細胞 (Human Gingival Fibroblasts、以下 HGFs) を用い、以下の実験を行った。研究に際しては、本学倫理委員会の承認を得、被験者の同意の下に行った。 1) HJBPCs の特性を確認するため骨芽細胞マーカーである ALP 染色を施行した。 2) 進展刺激装置 STB-140 (STREX、大阪) を用い、HJBPCs に持続的一軸方向伸展刺激 (伸展率 10%、24 時間) を加え、網羅的遺伝子解析 (マイクロアレイ) 及びパスウェイ解析を施行し、その中から 20 の遺伝子を抽出した。 3) 20 の遺伝子について、伸展刺激した HJBPCs における変動を RT-qPCR を用いて解析し、同一条件で伸展刺激した HGFs との違いを比較検討した。 <u>結果</u> 1) HJBPCs には ALP 陽性細胞を認めた (陽性率 55.5%)。HBJPCs には線維芽細胞と骨芽細胞様細胞がそれぞれ半数程度ずつ混在していると考えられた。 2) マイクロアレイ及びパスウェイ解析で HJBPCs の伸展刺激により、Wingless-type MMTV integration site family (Wnt) pathway、Bone morphogenetic protein (BMP) pathway、炎症性サイトカイン及び Insulin-like growth factor (IGF) に属する遺伝子群が変動した。その中から 20 の骨代謝関連遺伝子; Wnt-5a、Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP-5)、Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR-2)、Dickkopf homolog 1 (DKK-1)、Secreted frizzled-related protein 1,2 (SFRP-1,-2)、BMP-2,-4,-6、Distal-less homeobox 5 (DLX-5)、Chordin-like 1 (CHDRL-1)、Sonic hedgehog (SHH)、IL-1 $\beta$ ,-6,-11,-16,-34、Leukemia inhibitory factor (LIF)、IGF-1,-2 を抽出した。 3) 20 遺伝子について RT-qPCR を施行した結果、伸展刺激した HJBPCs で Wnt pathway の Wnt-5a、LRP-5 及び ROR-2 の発現が亢進し、抑制因子である DKK-1、SFRP-1,-2 の発現は抑制された。BMP pathway では BMP-2,-4 の発現は亢進し、BMP の下流の DLX-5 の発現も亢進した。一方、BMP-6 の発現は抑制され、BMP と Wnt の上流の SHH の発現が亢進した。炎症性サイトカインに属するものでは IL-1 $\beta$ 、-6 の発現は抑制され、IL-34、LIF の発現は亢進した。IL-11、-16 は有意な変化は確認できなかった。IGF-1、-2 は伸展刺激した HGFs と HJBPCs の両方で有意な上昇を認めた。	

## 考察

本研究の結果、HJBPCs に対する伸展刺激により Wnt pathway と BMP pathway の活性化と各種サイトカインの発現変動が認められたが、骨リモデリングに関与する各々の因子については、以下のように考察される。

Wnt pathway は共受容体の違いによりいくつかの経路を持ち、共受容体 LPR-5 からは  $\beta$ -カテニン依存経路、共受容体 ROR-2 からは  $\beta$ -カテニン非依存経路が活性化される。前者では骨芽細胞分化が誘導され、後者では破骨細胞分化や細胞骨格再構成が誘導される。本研究では HJBPCs の伸展刺激で両経路とも活性化されたが、HGFs の伸展刺激では有意な変化が起こらないことから、HJBPCs はメカニカルストレスを感知し、Wnt pathway が活性化され骨リモデリングに関与することが示唆された。

BMP pathway に関しては、HJBPCs の伸展刺激により骨形成促進能を有する BMP-2, -4 の発現亢進が誘導され、その下流の DLX-5 の発現も上昇することから、メカニカルストレスは BMP pathway を活性化し骨芽細胞分化を誘導すると考えられた。一方、BMP-6 は骨形成を促進すると共に IL-1 $\beta$  と IL-6 の発現を誘導し、破骨細胞の分化誘導による骨吸収にも関するという報告がある。本研究では BMP-6 の発現抑制に伴い IL-1 $\beta$ , -6 の発現量が有意に減少しており、これと一致した結果であった。また、LIF は炎症環境下では骨吸収に働くが、生理的骨代謝環境下では BMP-2, -4 と協調して働き骨芽細胞分化に働くとされることから、メカニカルストレスによる LIF の発現亢進は、BMP-2, -4 と協調して骨形成を促進することが示唆される。従って、BMP pathway における BMP-2, -4 と LIF の発現亢進、BMP-6 と IL-1 $\beta$ , -6 の発現抑制は、メカニカルストレスで誘導される骨リモデリングにおいて特有の現象であり、相互に連動しているものと思われた。

また、IL-34 は破骨細胞分化因子の M-CSF とレセプターを共有するが、M-CSF は炎症性・病的骨吸収に強く関与し、IL-34 は生理的骨吸収に強く関与するとされる。HJBPCs の伸展刺激で IL-34 の発現が亢進したことは、メカニカルストレスで誘導される IL-34 を介した破骨細胞の分化促進機構が存在する可能性を示唆する。一方、IGF は骨芽細胞の機能を促進するが同時に破骨細胞の分化も誘導する。IGF は骨基質に蓄積し、破骨細胞が骨基質を分解することで放出されるとされているが、その詳細は不明である。伸展刺激により IGF-1, -2 の発現が亢進することは、メカニカルストレスを感知した骨膜組織が IGF-1, -2 の供給源として作用し、骨リモデリングを調節する可能性を示唆する。

以上、本研究の結果、HJBPCs では伸展刺激に応答して Wnt pathway と BMP pathway の活性化と各種サイトカインの発現変動が起こり、これらが協調して骨リモデリングにおけるシグナル伝達機構に関与していると推察された。

## 結語

単層培養での持続伸展刺激という限られた実験系ではあるが、HJBPCs は伸展刺激を感知し Wnt /BMP signaling pathways を介して骨芽細胞分化や骨形成の調節に関与していることが示唆され、「骨膜がメカノセンサーとしての機能を持つ」という我々の仮説を支持するものと思われた。また、LIF の発現亢進や IL-1 $\beta$ , -6 の抑制、IL-34 および IGF-1, -2 の発現亢進といった遺伝子群変動の結果から、骨周囲組織である骨膜は、メカニカルストレスに応じた強度の骨を形成するために「骨にとって最適な代謝環境を維持する役割」を担っているのではないかと推察された。