HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨芽細胞の増殖，分化と石灰化におけるNa, K-ATPaseの役割 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山田, 淳一
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第11252号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/56150
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Junichi_Yamada_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　山　田　淳　一

	主査　教授	八 若 保 孝
審 査 担 当 者	副査　教授	鈴 木 邦 明
	副査　教授	網 塚 憲 生

学　位　論　文　題　名

骨芽細胞の増殖，分化と石灰化における Na,K-ATPase の役割

審査は主査、副査が申請者に対して提出論文の内容とそれに関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。

審査論文の概要は以下の通りである。

骨芽細胞による石灰化局所への Ca^{2+}の供給におけるイオントランスポーターの関与が知られているが、Na,K-ATPase の機能については解明されていない。Na,K-ATPase の骨芽細胞の増殖、分化および石灰化における役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。

細胞は MC3T3-E1（E1）細胞を用い、Na,K-ATPase 活性の変化を検討した。次に Na,K-ATPase の特異的阻害薬である ouabain（1-500 μM）を作用させ、細胞増殖能、アルカリフォスファターゼ（ALP）活性および石灰化について検討した。さらに、ouabain あるいは siRNA を用いて Na,K-ATPase を阻害して、BMP-2 による石灰化誘導に対する影響を調べた。また、マーカー遺伝子 mRNA の発現を Real-time RCR 法により、さらに Smad1/5/8（Ser463/465）、Smad1（Ser206）、MAPK ならびに Src のリン酸化に対する影響をウエスタンブロット法により検討した。

E1 細胞の Na,K-ATPase 活性は、confluence 以前に最も高く、以降減少し、confluence 後 18 日目に一過性に増加した。confluence 以前に ouabain を作用させると、その濃度依存的に細胞増殖の抑制が認められた。500 μM ouabain においても細胞数の減少は認められず、細胞死は生じていないものと推測された。以上より、Na,K-ATPase は E1 細胞の増殖制御に関与していることが示唆された。

次に、confluence 後 18 日目に認められる Na,K-ATPase 活性の一過性の増加が、ALP 活性の上昇に関連するのではないかと推測し、E1 細胞に confluence 後 16 日目から 22 日目に ouabain を作用させ、ALP 活性の変化を検討した。その結果、ouabain を作用している間は、ALP 活性が濃度依存的に抑制された。一方、作用を中止すると ALP 活性の回復が認められた。このような可逆

的な変化を示すことから、骨芽細胞の分化開始に、Na,K-ATPase が機能していることが示唆された。

次に、ouabain あるいは Na,K-ATPase α1 サブユニットノックダウンにより Na,K-ATPase を阻害すると、BMP-2 による骨芽細胞マーカー遺伝子（Runx2, ALP, Ⅰ型コラーゲン, オステオカルシン）mRNA の発現誘導は抑制され、石灰化も抑制された。

次に、BMP-2 で E1 細胞を刺激すると Smad1/5/8 の Ser463 ならびに Ser465 のリン酸化は促進されたが、ouabain 存在下でもリン酸化はほとんど変化しなかった。一方、ouabain を作用させると、Smad 1 のリンカー部位に存在する Ser206 のリン酸化が誘導された。さらに、ouabain 存在下で、E1 細胞に BMP-2 を作用させると、ERK, p38 のリン酸化誘導が増強された。一方、JNK のリン酸化は抑制された。これらの結果から、Na,K-ATPase 阻害により活性化した ERK あるいは p38 が Smad 1 の Ser206 のリン酸化に関与し、この部位のリン酸化が Smad1/5/8 と Smad 4 の複合体の核への移行を抑制し、Runx2 mRNA の発現が抑制されることが示唆された。

また、500 μM ouabain を作用させても Src のリン酸化は誘導されず、Na,K-ATPase 阻害による ERK や p38 の活性化は、Src を介していないことが示された。

以上のことから、骨芽細胞において、Na,K-ATPase は細胞増殖とともに、MAPK を介して石灰化の制御にも関与していることが示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

(1) Na,K-ATPase に関する一般的な知識

(2) Na,K-ATPase 活性測定法について

(3) E1 細胞における Na,K-ATPase 活性の経時的変化の所見

(4) 前骨芽細胞と骨芽細胞のどちらに、Na,K-ATPase は強く関与しているかの考察について

(5) 細胞内のイオンの動き、他のイオントランスポーターとの関連性について

(6) MAPK に変化がみられた要因について

(7) 骨関連細胞(破骨細胞)と Na,K-ATPase の関連性について

(8) 今後の研究の展望について

などであった。

以上の質問に対して申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答をとおして、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展・今後の研究が期待された。

以上のことから、審査担当者全員が本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与される十分な学識・資質を有しているものと認めた。