



Title	Expression dynamics of podoplanin in the mineralization of cultured osteoblasts with mechanostress [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	竹縄, 智紘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13041号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70458
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Takenawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 竹 縄 智 紘

学 位 論 文 題 名

Expression dynamics of podoplanin in the mineralization of cultured osteoblasts with mechanostress

(機械的ストレスを負荷した培養骨芽細胞の石灰化におけるポドプラニンの発現動態)

矯正歯科治療患者の高齢化により歯の後戻りと動揺が問題になっている。骨芽細胞が産生する podoplanin (PDPN) はラット腎糸球体の podocyte で同定されたシアル酸結合型のムチン型タンパクで、骨の強度を維持すること、また、血小板膜蛋白 C-type lectin-like receptor2 のリガンドとして血小板を凝集することが報告されている。PDPN は様々な部位で発現しており、骨・骨芽細胞の他に唾液腺筋上皮、眼球、脳室脈絡叢、グリア細胞、I 型肺胞上皮、腎糸球体上皮およびリンパ管内皮などで認められる。さらに、PDPN は細胞骨格に関与し、細胞突起の伸張や運動を制御することで、例えば口腔癌の転移やリンパ節腫大に関与するとされている。

骨組織における研究では、PDPN は分化初期の骨細胞マーカーと考えられているが、骨代謝における役割は十分には解明されていない。骨芽細胞の初代培養では、PDPN の発現はみられないが、石灰化物形成とともに樹状突起上の PDPN 発現量が増加するため、石灰化への関与が考えられている。マウス長骨骨細胞様 MLO-Y4 細胞は、流体力学的せん断ストレス環境下で樹状突起の伸長と同時に PDPN の増加が起るため、PDPN は機械的ストレス負荷環境で何らかの役割を有するものと考えられる。

機械的ストレス環境下において骨芽細胞が PDPN 産生を促進し、骨形成も促進するならば、その特性を利用した PDPN 標品を矯正歯科治療に応用することで、矯正歯科治療後の歯の後戻りや動揺の予防に適応することが可能であると考えられる。さらに、PDPN はその特性から、顎骨骨折や抜歯窩における骨の補強材および血餅形成による治癒促進にも適用可能ではないかとも考えられ、歯科領域全般に貢献する可能性を有していると考えられる。

本研究では、マウス骨髄由来骨芽細胞 (Cosmo Bio Co., LTD) を用いて、機械的ストレス負荷環境下の PDPN および骨関連タンパクである osteopontin (OPN) と osteocalcin (OC) の産生、また、PDPN の石灰化における役割を明らかにすることを目的とした。

まず、骨芽細胞をコラーゲンコートされた Bio Flex plate にて培養後、FX-3000™ Flexcell Strain Unit を使用し、頻度 2 往復/1 分間、5% 伸展率で機械的ストレスを 5 日間負荷させた。本装置は、6-well の Bio Flex plate と台座の間をコンピュータ制御された陰圧によってシリコン膜を伸展させ、シリコン膜上の細胞に対し機械的刺激を与える装置である。機械的ストレス非負荷と負荷後の骨芽細胞に、免疫組織化学染色を施し、PDPN、OPN および OC 発現の比較検討を行った。また、遺伝子発現を Real-time PCR 法で定量し、PDPN のタンパク発現量を Western blot 法と ELISA 法で解析した。

その結果、免疫組織化学染色では PDPN、OPN および OC それぞれのタンパクが赤く染色され、機械的ストレス負荷とともに各染色領域が拡大した。さらに、機械的ストレス負荷前後でその染色領域量を ImageJ を用いて定量的に比較した結果、PDPN、OPN、OC 全ての産生量が機械的ストレス負荷によって有意に増加したことが確認された。Real-time PCR の結果からは、骨芽細胞の PDPN mRNA と OC mRNA は、機械的ストレス負荷環境下において負荷 3 日目まで発現が有意に増加し、OPN mRNA は、負荷 2 日目まで有意に増加した後、それぞれ減少した。機械的ストレスの負荷により骨芽細胞は OPN および OC の産生を増加するとともに、PDPN の産生も増加したことから、PDPN は OPN および OC と関連して骨形成に働く可能性があるものと考えられた。さらに、培地の条件および機械的ストレスの有無を変化させた際の mRNA 発現の変化の結果から、骨芽細胞での PDPN の発現は、OPN や OC と異なり、機械的ストレス負荷が、強い発現誘導因子となっていることが示唆された。

また、機械的ストレス負荷環境下で培養した骨芽細胞を用い、免疫沈降したタンパク質を Western blot 法で解析した結果、PDPN タンパク質の分子量である 37 kDa~50 kDa の領域のバンド強度が、負荷期間と共に増加した。化学発光させたバンド強度も機械的ストレスの負荷期間と共に増加したことが確認された。さらに、PDPN タンパク質の産生量を調べるために ELISA 法で検討した結果、産生量は機械的ストレス負荷期間と共に増加し、3 日以内にプラトーに達した。この結果は、Real-time PCR の結果とほぼ一致した。

次に、骨形成培地で培養した骨芽細胞に、抗 PDPN 抗体を培地に添加し、骨芽細胞の石灰化過程に与える影響を検討した。同様に、抗 OPN 抗体と抗 OC 抗体をポジティブコントロール、抗 Actin 抗体と isotype 抗体をネガティブコントロールとして、それぞれの特異抗体を培地に添加し、骨芽細胞の石灰化過程にどのような影響を与えるか検討した。すなわち、骨芽細胞を 2 日間増殖用培地で培養後、それぞれの特異抗体を添加した骨形成培地に交換して 20 日間培養を行なった。骨芽細胞の石灰化評価には、アリザリンレッド染色液と 5% ギ酸石灰化結節溶解液 (PG リサーチ) を用いて、リン酸カルシウムに結合した色素の溶出液を吸光度測定した。また、水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 を発色試薬とした Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて、本実験の交絡バイアスとな

る抗体による細胞増殖の有無を評価した。細胞増殖評価は、抗体添加濃度(1 および $2\mu\text{g/ml}$) と培養日数(10 日および 20 日間)を変えて行い、培地は 2 日おきに交換した。

その結果、抗 PDPN 特異抗体を添加した骨形成培地で 20 日間培養した骨芽細胞は、細胞死することなく石灰化物産生を抑制することが確認された。抗 OPN 特異抗体と抗 OC 特異抗体を添加した場合も同様であった。

以上の結果より、本研究で用いた機械的ストレス負荷は、マウス骨髄由来骨芽細胞の PDPN 産生量を増大させ、また、抗 PDPN 特異抗体は、マウス骨髄由来骨芽細胞の石灰化を抑制することが明らかになった。これらのことより、機械的ストレス負荷は、PDPN 産生の促進因子であり、PDPN は、マウス骨髄由来骨芽細胞による石灰化に寄与することが示唆された。