HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Osteoadherin serves roles in the regulation of apoptosis and growth in MC3T3-E1 osteoblast cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	浜谷, 絵里
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13878号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78223
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Eri_Hamaya_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　浜谷　絵里

学　位　論　文　題　名

Osteoadherin serves roles in the regulation of apoptosis and growth in MC3T3‐E1 osteoblast cells

（オステオアドヘリンはMC3T3-E1骨芽細胞においてアポトーシスと細胞増殖を制御する）

キーワード（５つ）　キーワード，　オステオアドヘリン，スモールロイシンリッチリピートプロテオグリカン，骨芽細胞,アポトーシス，Omd

スモールロイシンリッチプロテオグリカン(SLRP)は，分子量 36～42K と比較的小型のコアタンパク質を有し,コアタンパク質の中央部にロイシン残基に富んだ繰り返し配列を有するプロテオグリカンである。SLRP は哺乳類ではこれまで 18 種類知られ，その構造から 5 つのクラスに分類される。SLRP は細胞外マトリックスの構成成分の一つとして，コラーゲン分子との結合や細胞表面の種々の細胞増殖因子受容体との結合が知られ生理的機能を担っている。オステオアドヘリン(*Omd* 遺伝子産物)は，47kDa のケラタン硫酸鎖を有する SLRP クラス 2 の一つであり，牛の骨基質から同定され，骨や象牙質といった石灰化組織に特異的に存在することが報告されている。しかし，このオステオアドヘリンの骨芽細胞における発現の制御やその役割の詳細については明らかではない。そこで，本研究では，まず MC3T3-E1 細胞においてオステオアドヘリンの発現と骨芽細胞分化との関連を調べた。また，Omd 発現プラスミドや RNA 干渉を用い MC3T3-E1 細胞において Omd の過剰発現ならびにノックダウンを行い，それらの細胞の増殖やアポトーシスに及ぼす影響を調べ，骨におけるオステオアドヘリンの機能を明らかにすることを目的とした。

まず各種培養細胞株である MC3T3-E1 細胞（骨芽細胞），C2C12 細胞（筋芽細胞），3T3-L1 細胞（脂肪細胞），ST2 細胞（骨髄間質細胞）および bEnd.3 細胞（血管内皮細胞）を培養し，これらより全 RNA を抽出し，各種 SLRP の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。ビグリカンはいずれの細胞でも発現し，デコリン，フィブロモデュリンおよびルミカンは MC3T3-E1 細胞，C2C12 細胞および 3T3-L1 細胞での発現が認められた。一方，*Omd* は MC3T3-E1 細胞のみに発現していた。*Omd* の発現レベルと骨芽細胞分化過程との影響を調べるため，MC3T3-E1 細胞を分化培地で 3 週間培養し，Taqman プローブを用いたリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法を用い *Omd* の発現を調べた。*Omd* 発現レベルは 1 週間培養後から増加し 3 週間後には更に増加した。

Bone morphogenetic protein (BMP)2 は C2C12 細胞の骨芽細胞への分化を誘導することが知られている。そこで，C2C12 細胞における BMP2 添加による *Omd* の発現レベルを調べた。添加した BMP2 濃度に比例して *Omd* の発現レベルは増加し，200 ng/ml の BMP2 では 30 倍以上増加した。また，BMP2 添加後の経時変化を調べると，添加後 6 時間から増加し始め，添加後 24 時間までは時間に依存して発現レベルは増加した。BMP2 の細胞内シグナル経路では，リガンド依存的に BMP 受容体 II 型が転写調節因子 Smad1/5/8 の C 末端に位置する 2 つのセリン残基をリン酸化することで, Smad4 との複合体を形成し核へと移行して標的遺伝子の転写を活性化すると考えられている。そこで，*Omd* の BMP2 による発現調節について明らかにするために，マウス *Omd* 遺伝子のプロモーター領域 1.7kb をクローニングしルシフェラーゼレポーターpOmd-Luc を作成した。このレポータープラスミドを C2C12 細胞にトランスフェクトし，ルシフェラーゼアッセイを行い転写活性について解析した。BMP2 の添加および Smad1/4 発現プラスミドの導入によって， pOmd1.7-Luc のルシフェラーゼ活性が増加した。これらより，BMP2 の細胞内シグナル伝達を担う Smad シグナルが *Omd* の転写活性を制御していること，*Omd* 遺伝子の転写開始点上流に Smad1/4 応答領域の存在が考えられた。

近年，骨組織において骨芽細胞などが Neuropeptide Y を産生することと，その受容体である Y1 レセプターの存在が報告された。また，箭原らによって MC3T3-E1 細胞において Y1 レセプターを siRNA を用いてノックダウンすると *Runx2* および *osterix* の発現増加を介して骨芽細胞分化が誘導されることが報告されている。そこで，MC3T3-E1 細胞において Y1 レセプターの発現をノックダウンさせ，リアルタイム PCR 法を用いて *Omd* の発現を調べた。*Omd* の発現は Y1 レセプターの siRNA のトランスフェクションによって増加した。以上のことから，骨芽細胞分化と *Omd* の発現には関連があることが考えられた。

さらに，オステオアドヘリンの骨における役割を明らかにするために，*Omd* 過剰発現とノックダウンによる細胞増殖, アポトーシス誘導および骨芽細胞分化へ対する影響を調べた。*Omd* の発現プラスミドを作成し，これを MC3T3-E1 細胞にトランスフェクトしオステオアドヘリンを過剰発現させた。これにより，Cell counting kit-8 を用いた測定で生細胞数が増加し，caspase3/7Gro assay を用いた測定で caspase3/7 活性が低下した。一方，*Omd* siRNA のトランスフェクションによるオステオアドヘリンのノックダウンを行ったところ，caspase3/7 活性が増加した。オステオアドヘリンの過剰発現は，MC3T3-E1 細胞において骨芽細胞の分化の指標の一つとされるアルカリフォスファターゼ（ALP）およびオステオカルシンの mRNA 発現量には影響を及ぼさなかったが， CCN family 2 の発現量は低下していた。

本研究により，SLRP クラス 2 の一つであるオステオアドヘリンの発現が骨芽細胞分化と関連があること, このオステオアドヘリンは骨芽細胞に対してアポトーシス誘導を抑制することおよび細胞増殖を促進するといった新たな機能が明らかになった。