

Title	Akt Activation is Required for TGF- β 1-Induced Osteoblast Differentiation of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts
Author(s)	鈴木, 瑛一
Journal	歯科学報, 117(6): 502-503
URL	http://hdl.handle.net/10130/4428
Right	
Description	

氏名(本籍)	すずき えい いち (東京都) 鈴木 瑛 一
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2122 号(甲第 1327 号)
学位授与の日付	平成28年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Akt Activation is Required for TGF- β 1-Induced Osteoblast Differentiation of MC 3 T 3-E 1 Pre-Osteoblasts
掲載雑誌名	PLoS One 2014年 doi : 10.1371/journal.pone.0112566
論文審査委員	(主査) 新谷 誠康教授 (副査) 齋藤 淳教授 東 俊文教授 阿部 伸一教授 山本 仁教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

骨形成に必須である骨芽細胞の分化には、様々な成長因子やサイトカインが影響している。歯周炎など局所の炎症下で産生されるサイトカインの一つである TGF- β 1 は骨芽細胞分化において、促進と抑制という二相性の作用を示すことが報告されている。PI 3 K シグナル伝達経路は様々な成長因子で活性化され、細胞増殖と細胞死を制御する中心的な役割を担っている。PI 3 K とその下流にある Akt は、骨芽細胞の分化調節にも深く関わっているが、現在 TGF- β 1 による骨芽細胞分化調節において PI 3 K/Akt 経路との関係は詳しくは解明されていない。本研究の目的は、TGF- β 1 による骨芽細胞分化調節において、PI 3 K 下流の主要なシグナル伝達物質である Akt の機能を解明することである。

2. 研究方法

マウス前骨芽細胞(MC 3 T 3-E 1)を使用し、細胞播種24時間後に血清無添加の骨芽細胞分化誘導培地(OBM)に交換、72時間培養後回収し、酵素組織化学、Alkaline phosphatase(ALP)活性測定、Real-time RT-PCRによる骨芽細胞分化マーカー解析にて評価を行った。また長期培養における影響を見るために、培養14日後にアリザリンレッド染色にて石灰化度の評価を行った。TGF- β 1 複数回投与条件では、OBM に交換後12時間毎に TGF- β 1 0.1 ng/ml 含有分化誘導培地にて交換を行った。次に Akt の役割を検討するため、レトロウイルスベクターを使用し、恒常的活性型 Akt 遺伝子と優性阻害型 Akt 遺伝子を MC 3 T 3-E 1 細胞に強制発現させ、同様の条件下にて実験を行った。Akt 活性時の TGF- β 1 関連シグナル(MAPK, Smad pathway)への影響を検討するため、ウエスタンブロット法にてタンパク解析を行った。

3. 研究成績および結論

MC 3 T 3-E 1 細胞において、OBM 単独培養と比較して TGF- β 1 複数回投与による ALP 活性、骨芽細胞分化マーカー mRNA (*Alp*, *Osteocalcin*, *Bone sialoprotein*) の有意な減少が見られた。恒常的活性型 Akt 導入細胞では、TGF- β 1 複数回投与時に ALP 活性の有意な増加がみられた。恒常的活性型 Akt 導入細胞では、MC 3 T 3-E 1 と比較しすべての培養条件において *Osteocalcin* mRNA 発現量の有意な上昇がみられた一方で、複数回の TGF- β 1 投与により、投与回数依存性の mRNA 発現量の減弱が認められた。石灰化度に関しても、Akt 活性状態において、MC 3 T 3-E 1 と比較しすべての培養条件でアリザリンレッド染色強度の上昇がみられた。

が、TGF- β 1 複数回投与により僅かな染色強度の低下が認められた。これら TGF- β 1 と Akt との関係は、優性阻害型 Akt 遺伝子導入実験においても裏付けされた。TGF- β 1 複数回投与時にも Akt 活性化状態では、Erk 1/2, Smad 3 のリン酸化は上昇しており、Akt の活性化が MAPK, Smad 経路に影響を与えていることが示された。

以上の結果より、Akt の活性化は TGF- β 1 による骨芽細胞の分化調節において、主に ALP が発現する分化前期に必須な因子であり TGF- β 1 による ALP の活性化を相加的に増強することが示唆された。TGF- β 1 過剰増殖となる歯周炎などの炎症下において、Akt の活性化は骨組織再生に有効となる可能性がある。

論文審査の要旨

TGF- β 1 による骨芽細胞分化調節において、PI 3 K 下流の主要なシグナル伝達物質である Akt の機能を解明することを目的に研究を行った。その結果、Akt の活性化は TGF- β 1 による骨芽細胞の分化調節において、主に Alkaline phosphatase (ALP) が発現する分化前期に必須な因子であり MAPK, Smad 経路の活性を促し、TGF- β 1 による ALP の活性化を相加的に増強することが示唆された。

本審査委員会では、1. 高濃度の PI 3 K inhibitor が細胞に及ぼす影響について、2. TGF- β 1 の複数回投与により IGF-1 の遺伝子発現に有意差がなかった理由について、3. TGF- β 1 が細胞の分化に影響を及ぼす上で、促進と抑制の境界値となるような濃度はあるのか、4. BMP 投与における PI 3 /Akt の関与について、5. TGF- β 1 が上皮および間葉系に及ぼす影響の違いはどのようなものか、といった質問および指摘があった。これらに対して、1. 予備実験では、使用した LY294002 の濃度において、細胞増殖試験 (MTT assay) では有意な影響は認められなかった、2. TGF- β 1 の 6 回投与時には IGF-1 発現量の有意な減少がみられた。また 3 回投与時にも減少傾向はみられた、3. 過去の報告では、0.1-0.2ng/ml を境界値とするものがみられる、4. BMP により促進される骨芽細胞分化マーカーは Akt の不活性化により減少するため、BMP も PI 3 K/Akt 経路を介して骨芽細胞分化調節を行っている、5. TGF- β 1 は間葉系のマーカー発現を誘導するという報告があり、上皮細胞は一般的に抑制し、間葉系組織には促進作用を示すと思われ、上皮細胞から間葉系細胞への形態変化 (上皮間葉移行) において TGF- β 1 の関与が考えられている、と概ね妥当な回答が得られた。さらに略語の使用、考察の構成、図説の内容についての指摘があり、修正論文が再度確認された。

本研究で得られた結果は今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。