

氏名	稲熊尚広
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第 1863号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1のメカニカルストレスに対する応答性—神経栄養因子の役割—
論文審査委員	教授 山本敏男 教授 山本照子 教授 杉本朋貞

学位論文内容の要旨

緒言

骨組織中の細胞は常に重力や静水圧などのメカニカルストレスを受けている。一方、矯正的な歯の移動では歯周組織、特に骨では圧迫側および牽引側が生じ骨リモデリングが起こっている。このような骨組織内でのメカニカルストレスを受けている状態を再現すべく、*in vitro*や*in vivo*で、細胞や組織にメカニカルストレスを付与する研究が行われてきた。

神経栄養因子は、神経細胞の生存、維持において重要な神経栄養活性をもつタンパク質で、Nerve growth factor(NGF), brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3(NT-3), neurotrophin-4/5(NT-4/5)が明らかにされている。その受容体としてTrkファミリータンパク質TrkA,TrkB,TrkCが見い出された。最近、神経栄養因子およびそのレセプターは神経由来の細胞のみならず、骨由来細胞である骨髄細胞や骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1で神経栄養因子とそのレセプターが発現していることが明らかにされている。しかし、骨組織における神経栄養因子の働きについては不明な点が多く、特に骨系細胞で神経栄養因子およびそのレセプターとメカニカルストレスの関わりについての報告はいまだない。そこで、本研究では、骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞がメカニカルストレスに応答する際、神経栄養因子とそのレセプターの関わりを明らかにするため、MC3T3-E1細胞に伸展刺激を与え、神経栄養因子とそのレセプターの発現をmRNAレベルとタンパクレベルで検討した。

【材料および方法】

7週齢SD系ラットをPBにて還流後、頭蓋冠を採取細切しホモジナイズした後、総RNAを抽出した。その後、RT-PCR法により逆転写および増幅反応を行い、神経栄養因子およびそのレセプターのmRNAの発現を調べた。MC3T3-E1細胞は、2%非働化ウシ胎仔血清含有アルファ変法Eagle培地を用いて 8×10^3 cells/cm²で播種したのち、37℃、5%炭酸ガス培養器中で培養した。2.5日後、ほぼサブコンフルエント60~70%に達した時点で、培養細胞伸展装置(Flexer Cell Unit System)により最大伸展率を3%,6%,12%,18%,24%とし、細胞伸展周期3サイクル/分(10秒 on 10秒 off)の条件の下で12時間メカニカルストレスを与えた。その後、37℃,5%CO₂中で24時間培養し総RNAを抽出しRT-PCR

法により逆転写および増幅反応を行った。各プライマーは、NGF, BDNF, NT-3, *trkB*(TK-), *trkC*, *trkC* K14, ALP とした。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動し、各遺伝子の発現量をビデオデンストメーターを用いて比較した。免疫組織化学染色は、MC3T3-E1細胞を酢酸アルコールで室温にて30分間固定し、抗TrkB(TK-), Cペプチド抗体を一次抗体として通法に従って発色した。

【結果】

- 1, ラット頭蓋冠で神経栄養因子NGF, BDNF, NT-3とそのレセプターP75, *trkB* T2(TK-), *trkC*, *trkC* K14のmRNAの発現が認められ、MC3T3-E1細胞では、神経栄養因子NGF, BDNF, NT-3とそのレセプター*trkB* T1(TK-), *trkC*, *trkC* K14のmRNAの発現が認められた。
- 2, MC3T3-E1細胞を播種培養して2.5日後、最大伸展率18%、細胞伸展周期3サイクル/分の条件の下で42時間メカニカルストレスを付与させても細胞形態の変化は認められなかった。さらに、20時間、最大伸展率24%、細胞伸展周期3サイクル/分の条件下でメカニカルストレスを付与させると、細胞形態が細長くなった。
- 3, MC3T3-E1細胞に細胞伸展周期3サイクル/分で最大伸展率3%, 6%, 12%, 18%, 24%のメカニカルストレスを12時間付与させるとALP mRNAが約3%で約13倍, 6%で約8倍, 18%で約13倍、24%で約12倍に上昇した。
- 4, 3と同様に、細胞伸展周期3サイクル/分の条件下で最大伸展率3%, 6%, 12%, 18%, 24%のメカニカルストレスを付与させるとNT-3 mRNAが、最大伸展率3%で約7倍, 6%で約3倍, 12%で約4倍, 18%で約3倍, 24%で約2倍に上昇した。一方、*trkB* T1 mRNAは最大伸展率3%で約11倍に, 6%で約4倍に, 12%で約5倍, 18%で約4倍, 24%で約2倍に上昇した。その他の神経栄養因子NGF, BDNFおよびそのレセプター*trkC*, *trkC* K14のmRNAではどの伸展力でもストレス細胞群と対照群に差は認められなかった。
- 5, MC3T3-E1細胞を播種培養して2.5日後、最大伸展率18%、細胞伸展周期3サイクル/分の条件下で12時間メカニカルストレスを付与すると、抗TrkB抗体を用いたストレス細胞群は対照群と比較して強染したが、抗TrkCペプチド抗体ではストレス細胞群と対照群に変化はなかった。

【結論】

1. MC3T3-E1細胞にメカニカルストレスを付与すると細胞形態が細長くなった。
2. MC3T3-E1細胞はメカニカルストレスに応答してALP mRNAが上昇した。したがって、メカニカルストレスを付与すると分化機能が亢進することが示唆された。
3. MC3T3-E1細胞にメカニカルストレスを付与するとNT-3と*trkB* T1(TK-)のmRNAが上昇した。したがって、MC3T3-E1細胞のメカニカルストレスに対する応答性には、NT-3と*trkB* T1(TK-)が関与していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究では、骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞がメカニカルストレスに応答する際、神経栄養因子とそのレセプターの関わりを明らかにするため、MC3T3-E1細胞に伸展刺激を与え、神経栄養因子とそのレセプターの発現をmRNAレベルとタンパクレベルで検討したものである。その結果、MC3T3-E1細胞にメカニカルストレスを付与するとNT-3と*trkBT1*(TK-)のmRNAが上昇し、免疫組織化学染色でも抗TrkBペプチド抗体でストレス細胞群で強染した。したがって、MC3T3-E1細胞のメカニカルストレスに対する応答性には、NT-3と*trkBT1*(TK-)が関与していることが示唆された。また、MC3T3-E1細胞にメカニカルストレスを付与するとALPmRNAが上昇したことから、分化機能が亢進することが示唆された。ラット頭蓋冠でも神経栄養因子NGF,BDNF,NT-3とそのレセプターP75,*trkBT2*(TK-),*trkC*,*trkCK14*のmRNAの発現が認められた。本研究において、MC3T3-E1細胞自らに神経栄養因子とそのレセプターのmRNAの発現があり、メカニカルストレスの付与により神経栄養因子とそのレセプターのmRNAの発現が増加したことより、骨組織内でも骨系細胞は自らの細胞、また、神経細胞に神経栄養因子のシグナルを送っていることが推察された。すなわち、骨組織内で正常な成長発育過程の骨新生や歯の移動中での骨リモデリング時に神経栄養因子が関わっていることが十分考えられる。また、本実験で用いたメカニカルストレスでALPmRNAの発現が増加したことにより、細胞に付与したメカニカルストレスが歯科矯正臨床的な観点での生理的な力の範囲であると考えられる。したがって、歯科矯正学の基礎的な研究として意義があると思われる。

よって本研究者は博士（歯学）の学位授与に値するものとする。