

氏 名	堀切 優
学 位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4726号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	骨折治癒過程における Focal adhesion kinase を介した Sonic hedgehog の役割
学位論文審査委員	飯田 征二 教授 久保田 聡 准教授 佐々木 朗 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

顎顔面領域において骨折は、比較的頻度の高い疾患の一つである。骨折治癒過程は、炎症期、細胞増殖期、仮骨形成期、リモデリング期からなり、それぞれの時期が重なり合う。各段階においてさまざまな細胞、サイトカイン、増殖因子が関わっているとされているが、その詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。

Focal adhesion kinase (FAK)は125kDの非受容体型チロシンキナーゼで、インテグリンの集積する細胞接着斑(focal adhesion)に存在し、細胞接着斑の形成にはインテグリン刺激からのFAKの397番目のチロシン残基(pFAK-Tyr³⁹⁷)のリン酸化が重要であるとされている。骨芽細胞においては、骨基質中のI型コラーゲンがFAKおよびその下流シグナルを介して細胞分化を促進し、細胞形態を維持することが報告されている。また、多くの器官形成に関与していると言われているSonic hedgehog (SHH)も、骨形成過程で重要な役割を担っていることが報告されている。これらのことより、FAK、SHHは骨折治癒過程においても骨改造現象に関与することが推察される。

そこで本研究では、骨折治癒過程におけるFAKとSHHの発現、それらの骨芽細胞における役割について検討した。

【材料ならびに方法】

ICRマウス雄8週齢、第8肋骨骨折モデルを作製した。骨折後3, 5, 14, 28日目の骨折部におけるFAK、SHHの発現を免疫組織染色で検討した。また、FAK遺伝子の異なった5領域に対して作製したレンチウイルス short hairpin RNA FAK (shFAK)を前骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1 (RIKEN Cell Bankより購入)に感染させFAKノックダウン細胞を作製し、FAKの発現抑制を、ウェスタンブロット法で確認した。細胞形態は蛍光免疫染色法にて、細胞増殖能はMTS assay、遊走能はscratch assay、接着能はadhesion assay、分化能はアルカリフォスファターゼ(ALP)染色、アリザリン(ALZ)染色にて検討した。破骨細胞形成能は、MC3T3-E1と骨髄CD11b⁽⁺⁾細胞との共存培養系を用いTartrate-Resistant Acid Phosphatase

(TRAP) 染色にて検討した。FAK ノックダウン MC3T3-E1 細胞における ALP, osteopontin (OPN), osterix (OSX), Runx2 mRNA および RANKL, osteoprotegerin (OPG) mRNA 発現を RT-PCR にて確認した。

【結果】

1) 骨折モデルについての検討

骨折後 3 日目に, SHH が骨折端周囲の骨髓細胞に, pFAK Thy³⁹⁷ が骨髓細胞にそれぞれ発現した。骨折後 5 日目には pFAK Thy³⁹⁷ が皮質骨断端部の ALP 陽性骨芽細胞に発現し, その周囲に TRAP 陽性破骨細胞が存在した。骨折後 14 日目に肥大軟骨の形成を認め, その周囲の ALP 陽性骨芽細胞に pFAK Thy³⁹⁷, SHH が発現した。骨折後 28 日目では骨折部周囲に pFAK Thy³⁹⁷, SHH の発現は認めなかった。

2) 骨芽細胞における FAK が細胞形態および増殖能, 接着能, 遊走能, 分化能に与える影響
shFAK の感染により, 血清存在下での MC3T3-E1 の細胞形態は縮小し, 細胞増殖能, 接着能, 遊走能, 分化能は, 有意に抑制された。RT-PCR より, FAK ノックダウン MC3T3-E1 細胞において, ALP, OPN, OSX mRNA の発現抑制, Runx2 mRNA の発現亢進を認めた。

3) 骨芽細胞における FAK を介して SHH が増殖能, 接着能, 遊走能, 分化能に与える影響
MC3T3-E1 に組み換え SHH タンパク質を添加すると, pFAK Tyr³⁹⁷ ならびに FAK の発現上昇を認め, 増殖能は有意に促進されたが, FAK ノックダウン MC3T3-E1 細胞ではこの促進効果は認められなかった。細胞接着能, 遊走能, 分化能に有意な促進は認められなかった。

4) 骨芽細胞における FAK, SHH が破骨細胞形成に与える影響

FAK ノックダウン MC3T3-E1 細胞と骨髓 CD11b⁽⁺⁾細胞との共存培養を Parathyroid hormone related protein (PTHrP) 存在下で行なったところ, コントロール MC3T3-E1 細胞に比べ破骨細胞形成が有意に抑制されていた。組み換え SHH タンパク質添加により, コントロール MC3T3-E1 細胞の破骨細胞形成能は有意に促進したが, FAK ノックダウン MC3T3-E1 細胞では促進効果は認められなかった。また, PTHrP を MC3T3-E1 細胞に添加すると, RANKL 発現上昇を認めたが, FAK ノックダウン MC3T3-E1 細胞では RANKL 発現誘導は認められなかった。一方で OPG は, PTHrP の添加や FAK のノックダウンによる発現変化は認められなかった。

【考察】

肋骨骨折モデルは整復を行わず, 一連の骨再生過程を経るため, 骨折治癒過程各段階について検討が可能である。骨折治癒過程の炎症期, 細胞増殖期において, 炎症細胞から放出される炎症性サイトカインや血腫に多量に存在する血小板から放出される成長因子シグナルと FAK シグナル両者が骨芽細胞の増殖, 遊走に関与していることが示唆された。また, 骨髓細胞から産生される SHH は, 骨芽細胞における pFAK Tyr³⁹⁷ リン酸化を介し, 骨芽細胞増殖や破骨細胞形成を促進すると考えられた。骨折治癒過程の仮骨形成期からリモデリング期では, 骨芽細胞自身の産生する SHH がオートクライン, パラクライン的に骨芽細胞に作用, pFAK Tyr³⁹⁷ を活性化し, 骨改造に関与していることが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

【緒言】

顎顔面領域において骨折は、比較的頻度の高い疾患の一つである。骨折治癒過程は、炎症期、細胞増殖期、仮骨形成期、リモデリング期からなり、それぞれの時期が移行的に重なり合う。各段階においてさまざまな細胞、サイトカイン、増殖因子が関わっているとされているが、その詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。多くの器官形成に関与していると言われていた Sonic hedgehog (SHH) は骨形成過程で重要な役割を担っていることが報告されており、また Focal adhesion kinase (FAK) は非受容体型チロシンキナーゼで、骨芽細胞の増殖、遊走に FAK の 397 番目のチロシン残基のリン酸化 (pFAK-Tyr³⁹⁷) が重要であるとされている。これらのことより、骨折治癒過程において SHH, FAK シグナル間にクロストークが生じ、骨改造現象に関与することが推察される。そこで本研究では、骨折治癒過程における SHH と FAK の発現、それらの役割について検討した。

【方法および結果】

ICR マウス雄 8 週齢を用い、第 8 肋骨を鉗で骨折させた。骨折後 3, 5, 14, 28 日目の骨折部における SHH, FAK の発現を免疫組織染色で検討した。その結果、骨折後 3 日目に、SHH, pFAK-Tyr³⁹⁷ が骨折端周囲の未分化間葉系細胞にそれぞれ発現し、骨折後 5 日目には pFAK-Tyr³⁹⁷ が皮質骨断端部のアルカリフォスファターゼ (ALP) 陽性骨芽細胞に発現した。骨折後 14 日目に肥大軟骨の形成を認め、その周囲の ALP 陽性骨芽細胞に SHH, pFAK-Tyr³⁹⁷ が発現したが、骨折後 28 日目では骨折部周囲に SHH, pFAK-Tyr³⁹⁷ の発現は認めなかった。in vitro において、FAK ノックダウン骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を作製し、機能解析を行なったところ、FAK ノックダウンにより MC3T3-E1 細胞の増殖・接着・分化能、および破骨細胞形成支持能は抑制された。また、SHH 添加により、コントロールの MC3T3-E1 細胞では、FAK の発現上昇を認め、増殖能、分化能、破骨細胞形成能は有意に促進されたが、FAK ノックダウン細胞にはこれらの促進効果は認められなかった。

【考察】

整備を必要とせず一連の骨折の治癒過程を検討できる肋骨骨折モデルは、骨折治癒過程の各段階について詳細な検討が可能である。その所見と in vitro 解析データから、骨折治癒過程の炎症期、細胞増殖期において、骨髄細胞から産生される SHH は、骨芽細胞における pFAK-Tyr³⁹⁷ リン酸化を介し、骨芽細胞増殖、分化や破骨細胞形成を促進すると考えられた。また、骨折治癒過程の仮骨形成期からリモデリング期においては、骨芽細胞自身の産生する SHH がオートクライン的に pFAK-Tyr³⁹⁷ を活性化し、肥大軟骨細胞から骨への置換に関与することが示唆された。

本論文は、骨折治癒過程における SHH と FAK の役割を分子メカニズムの面から詳細に検討し、両者の密接な関連を明らかにしたものである。よって論文審査担当者は一致して、本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。