

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
上岡 寛 印	研究の総括的指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻	身分 大学院生	氏名 田中 敦子
論文題名 インターフェロン β が骨芽細胞分化に及ぼす影響		
論文内容の要旨（2000字程度） 【緒言】 Singleton-Merten Syndrome (SMS) は歯や骨格の異常を呈する先天性自己免疫疾患である。SMSでは細胞内のウイルスセンサーとしての役割を担う MDA5 の機能獲得型変異により I 型インターフェロン (IFN Type I) の過剰産生が生じ、臨床所見として骨粗鬆症、歯根吸収等が見られる。過去の研究では、IFN-βは破骨細胞分化に対して抑制的に働くことが報告されているが、骨芽細胞への影響に関する報告はこれまでに殆どなされていない。また、IFN Type I は細胞死への関連が近年の研究により示唆されている。 当科に来院した SMS 患者の全身的な臨床所見として乾癬や手の遠位骨の融解、口腔内所見として乳歯の晩期残存、歯槽骨吸収などが見られた。 以上のことから、我々は SMS 患者において IFN Type I の亢進が骨芽細胞の機能抑制を引き起こし、骨形成不全の原因となっているのではないかと仮説を立てた。 本研究では健康者由来の歯髄から未分化間葉系幹細胞を単離し、骨芽細胞への分化培地に IFN-βのリコンビナントタンパクを投与することで、IFN Type I の骨芽細胞への影響とその分子機序を検討した。 【方法】 1. 抜去歯歯髄から未分化間葉系幹細胞 (MSC) への単離 岡山大学病院で歯科矯正治療を受けていた健康な患者から乳歯を抜去し、摘出した歯髄組織から未分化間葉系幹細胞を単離した。 2. 歯髄由来 MSC の骨芽細胞への分化誘導 未分化間葉系幹細胞を 14 日間骨芽細胞への分化培地で培養し、骨芽細胞へ分化させた。骨芽細胞への分化は Alizarin red 染色、カルシウム濃度測定、および定量 RT-PCR 法を用いて評価した。細胞数は免疫抗体蛍光法の細胞核を用いて評価した。 3. IFN-βリコンビナントタンパクおよび JAK 阻害薬の添加 未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化誘導培地へ IFN-βリコンビナントタンパクを添加した。また、JAK-STAT 経路の阻害薬として Ruxolitinib を添加した。 4. 定量 RT-PCR 法 分化した骨芽細胞から Total RNA を抽出し、逆転写反応によって得られた cDNA を RT-PCR 法によりその発現遺伝子を比較した。 5. TUNEL アッセイと免疫抗体蛍光法 分化した骨芽細胞の DNA の断片化を比較した。また、増殖能を比較するために免疫抗体蛍光法を行なった。		

論文内容の要旨（2000字程度）

6. ウェスタンブロット解析

14日間培養した骨芽細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により目的のタンパク質を検出した。

【結果】

IFN- β 添加群（以下実験群）で基質形成能の低下がみられた。骨芽細胞への分化マーカーである *ALP* が低下していた一方で *Osteocalcin* や *BSP* は上昇していた。

増殖能に有意差はないが、実験群での有意な細胞数の減少が見られた。また、実験群でアポトーシス特異的マーカーである *Caspase9* が有意に上昇していたが、DNA の断片化は確認できなかった。さらに、実験群で炎症反応マーカーである *IL-6* の上昇とネクロプトーシス実行因子である pMLKL の増加がみられた。

JAK-STAT 阻害薬である Ruxolitinib 添加群で基質形成能と細胞数が改善した。骨芽細胞分化マーカーにおいて、*ALP* の改善と *Osteocalcin*、*BSP* は実験群と対照群で有意差がなくなった。

Ruxolitinib 添加群では *Caspase9* の上昇は抑制されていなかったが、*IL-6* と pMLKL の増加が抑制されていた。

【考察】

実験群では骨芽細胞の増殖能に変化がないものの細胞数が減少しており、なおかつ遺伝子解析の結果、*Caspase9* の発現上昇がみられたが、その一方で TUNEL 染色による DNA の断片化に有意差はなく、*IL-6* の有意な上昇が同時に確認された。さらに、実験群での pMLKL の増加が確認されたことから、IFN- β によってアポトーシスとネクロプトーシスが同時に生じている可能性が示された。

JAK1, JAK2 の阻害薬である Ruxolitinib を添加したところ、pMLKL の発現と *IL-6* の抑制がみられたことから、JAK-STAT 経路を阻害することで IFN- β によるネクロプトーシスを抑制することができると可能性が示された。しかし、Ruxolitinib 添加群で *Caspase9* は改善しなかった。つまり、IFN- β による細胞数の減少はネクロプトーシス主体ではあるが、JAK-STAT 経路を介さないアポトーシスも誘導される可能性がある。

本研究では、IFN- β が未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化において基質形成能を抑制することがわかった。これに関して、細胞数の減少と骨芽細胞分化マーカーの発現の両方が変化していることがわかった。前述のように、IFN- β によって JAK-STAT 経路を介したネクロプトーシスが細胞数の減少に寄与していることが示唆された。同様に、実験群における骨芽細胞分化マーカーの変化および Ruxolitinib の添加によりそれが改善したことから、IFN- β による JAK - STAT 経路の活性化が骨芽細胞分化にも影響を与えることが示唆された。骨芽細胞分化マーカーの変化に関しては、*ALP* が低下している一方で、*Osteocalcin* や *BSP* は上昇していた。*ALP* は未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞分化への初期に、*Osteocalcin* や *BSP* は分化の後期に発現する遺伝子として知られている。つまり IFN- β は骨芽細胞分化の初期段階を阻害することで上述のような基質形成能の低下を引き起こしている可能性が示唆された。

【結論】

SMS 患者における IFN- β の恒常的な過剰産生は、ネクロプトーシスを主体とした骨芽細胞死を引き起こし、同時に骨芽細胞への分化にも影響を与える。それによって骨粗鬆症や歯槽骨吸収が生じている可能性が示唆された。また、JAK-STAT 経路阻害薬によりそれらを抑制できる可能性が示唆されたが、骨芽細胞死、分化抑制に対する分子機序に関しては更なる検討が必要である。