

氏名	守谷 拓巳
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7455号
学位授与の日付	令和8年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建外科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Dynamin 2 is involved in osteoblast migration by regulating the organization of F-actin (ダイナミン2はF-アクチンの組織化を調節することにより骨芽細胞の移動に関与する)
論文審査委員	久保田 聡 教授 沢 禎彦 教授 大森 一弘 准教授

学位論文内容の要旨

【諸言】

骨形成および骨修復は、骨芽細胞が適切な部位に移動し、新たな骨基質を産生することで進行する。とくに損傷部位では、骨芽細胞が効率よく集積することが治癒初期を大きく左右する。例えば、加齢や糖尿病などの病態では、この移動能が低下し骨再生の遅延につながる事が知られており、その分子基盤の解明は骨粗鬆症や難治性骨折に対する新規治療戦略の構築に重要である。細胞移動には、細胞膜直下のF-アクチンを中心とした細胞骨格の再構築が不可欠であり、突起形成、後方収縮、細胞極性維持など複数の過程が協調的に働く。しかし、これらの力学的プロセスを統合して制御する分子メカニズムについては、依然として十分に理解されていない。ダイナミンは従来、膜分裂やエンドサイトーシスに関わる大型GTPaseとして知られてきたが、近年ではF-アクチンと相互作用し細胞骨格制御に関与することが示されている。三つの主要アイソフォームのうちダイナミン2は広範な細胞種に発現し、突起形成や細胞形態変化といった運動機構に関与すると考えられている。しかし、骨芽細胞におけるダイナミン2の機能やその局在の特徴は十分に検証されておらず、移動能との関連を体系的に調べた研究も乏しい。本研究では、ダイナミン2が骨芽細胞の移動にどのように寄与するかを明らかにすることを目的として、ダイナミンの機能を阻害した際の細胞の移動能、ダイナミンとアクチン細胞骨格の変化を解析した。

【材料と方法】

前骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞およびニワトリ頭蓋冠から分離した骨芽細胞を用いて、免疫染色によりダイナミン2の細胞内局在を検出し、F-アクチンはAlexa488標識ファロイジンで可視化して両者の空間的位置関係を比較解析した。さらに、MC3T3-E1細胞にダイナミンのGTPase活性阻害剤を作用させ、ダイナミン活性の抑制が細胞移動能ならびに細胞形態に及ぼす影響を、創傷治癒アッセイおよび免疫染色により評価した。細胞形態の観察には共焦点レーザー顕微鏡および超解像顕微鏡を用いた。

【結果】

MC3T3-E1細胞および初代培養骨芽細胞において、ダイナミン2は細胞質内に広く分布したほか、細胞辺縁部、細胞内部に走行するストレスファイバー様構造、そして細胞が進行方向へ伸展する際に形成される薄い膜状の突出部（ラメリポディア）において、高い密度でF-アクチンと共局在していた。

次に、ダイナミン阻害剤を用いてその機能的役割を検証した結果、阻害剤添加によるダイナミン2およびF-アクチンの発現量や、細胞の形態や生存性への大きな影響はみられなかった一方で、骨芽細胞の移動能は著しく低下した。また形態解析の結果、阻害剤を添加した細胞ではラメリポディアの形成が十分に発達しておらず、細胞内部のF-アクチンの走行が乱れ、大型のF-アクチンクラスターが観察された。ダイナミン2のラメリポディアへの集積や、ストレスファイバーなどF-アクチンが形成する構造との共局在性も失われていた。

【考察】

ダイナミン2のGTPase活性は、骨芽細胞の移動に重要な役割を果たすことが明らかになった。ダイナミン2はラメリポディアや細胞辺縁部、ストレスファイバーに沿ってF-アクチンと共局在していたが、これらは細胞の極性や移動のための突起形成に不可欠な領域である。さらにダイナミン阻害剤を添加した細胞では、ラメリポディア形成不全や突起部位へのダイナミン2の局在喪失がみられた他、ストレスファイバーの走行が乱れ、大型のアクチンクラスターが形成されるなど、アクチン細胞骨格の秩序が大きく損なわれていた。以上から、ダイナミン2はF-アクチンの組織化を介して細胞移動に関与すると考えられた。

【結論】

本研究により、ダイナミンがアクチン細胞骨格の組織化を介して骨芽細胞の移動性を支える役割を持つことが示唆された。本研究の知見は、骨芽細胞移動の細胞メカニズムの理解を深め、将来的に骨修復や骨再生を促進する新たな治療戦略の探索に寄与する可能性を示している。

論文審査結果の要旨

【緒言】骨形成および骨修復には、骨芽細胞の分化・増殖に加え、損傷部位や再生部位へ細胞が集積するための移動が不可欠である。細胞移動は、ラメリポディア形成などを含む F-アクチン細胞骨格の動的再編成に依存するが、骨芽細胞におけるその分子制御機構には未解明な点が多い。ダイナミンは膜動態制御因子として知られている一方、近年、F-アクチンとの相互作用や細胞骨格制御への関与が報告されている。本研究は、骨芽細胞におけるダイナミン2の局在と機能に着目し、細胞移動との関連を検討することを目的とした。

【方法】前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞および初代培養骨芽細胞を用い、免疫蛍光染色によりダイナミン2と F-アクチンの細胞内局在を解析した。F-アクチンはファロイジンにより可視化し、共焦点顕微鏡を用いて局在様式および細胞骨格構造を評価した。さらに、ダイナミン阻害剤 (Dyngo 4a, Dynole 34-2) を用いて GTPase 活性を阻害し、創傷治癒アッセイにより細胞移動能を解析した。併せて、阻害剤処理による細胞生存性および総タンパク質量への影響についても検討した。

【結果】ダイナミン2は骨芽細胞内において F-アクチンと部分的に共局在し、細胞皮質、ストレスファイバー、ラメリポディアなど、細胞移動に関連するアクチン構造に分布していた。阻害剤処理後においても、細胞生存性やダイナミン2を含む総タンパク質量に大きな変化は認められなかった。一方、ストレスファイバーの減少や、細胞突起先端における F-アクチンおよびダイナミン2の集積低下が観察され、細胞質内にはF-アクチンクラスターが出現した。これらに伴い、細胞移動能は有意に低下した。

【考察】本研究の結果から、骨芽細胞においてダイナミン2は移動関連アクチン構造に局在し、ダイナミンの GTPase 活性が F-アクチンの組織化や細胞骨格再編成を介して細胞移動に関与している可能性が示唆された。阻害条件下で観察された F-アクチンクラスター形成は、細胞死や非特異的毒性によるものではなく、アクチン組織化制御の破綻を反映した現象と考えられる。一方で、本研究は薬理的阻害に基づく解析であり、直接的な分子相互作用の証明や *in vivo* における検証については今後の課題として残されている。

本論文では、骨芽細胞におけるダイナミンの局在および機能を解析することで、ダイナミン2がアクチン細胞骨格の再編成を介して骨芽細胞移動に関与する可能性を示すという新しい知見を得た。得られた成果は新規性に富んでおり、骨形成過程における細胞動態制御機構の理解を深めるうえでの基盤となるものである。今後は、遺伝学的手法や *in vivo* モデルを用いた詳細な機能解析が期待される。なお、本論文はすでに *Journal of Oral Biosciences* に受理されており、国際的にも評価されている。よって審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。