

## 論 文 要 旨

**OSTEOBLAST DIFFERENTIATION IS  
FUNCTIONALLY ASSOCIATED WITH DECREASED  
AMP KINASE ACTIVITY**

〔 骨芽細胞分化における AMP KINASE 活性の機能的役割 〕

葛 西 貴 行

## 【序論および目的】

骨芽細胞は間葉系幹細胞由来で、骨形成における石灰化に重要な働きを持つ。この骨芽細胞の分化には Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) を含む幾つかの転写因子が必須であると報告されているが、細胞内における分化調節に関わるシグナル伝達経路については未だ不明な点も多い。

近年、AMP-activated protein kinase (AMPK) が脂肪細胞・筋細胞など間葉系幹細胞由来の細胞系統の分化に関与することを示す報告が見られる。AMPK は糖・脂質代謝を促進することでエネルギー産生のマスターレギュレーターとして機能する細胞質内キナーゼであり、細胞内のエネルギーが枯渇して AMP が増加すると活性化するが、AMPK と骨芽細胞分化の関連についての報告は殆どない。

そこで、今回骨芽細胞の *in vitro* 分化モデルを用いて AMPK 活性と骨芽細胞分化の関係を追究した。さらに細胞種間の比較のために、脂肪細胞分化と AMPK との関連についても検討した。

## 【材料および方法】

1) 実験にはマウス初代骨芽細胞とマウス骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いた。細胞をグリセロリン酸とアスコルビン酸含有  $\alpha$ -MEM 培地にて分化させ、それぞれの細胞の分化過程における AMPK 活性の変化を、Western blotting による AMPK リン酸化レベルの解析にて確認した。また、AMPK 活性化剤として知られる metformin (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mM) 及び AICAR (0, 0.25, 0.5, 1 mM) を用いて骨芽細胞長期培養における AMPK 活性化効果と細胞毒性 (MTS assay) の有無を確認した。その結果、

骨芽細胞において AMPK 活性を安定に上昇させ、細胞毒性も見られなかった 2 mM metformin を添加して骨芽細胞の分化を誘導し、基質石灰化レベル (Alizarin red S 染色)、骨分化マーカー (オステオカルシン, 骨シアロタンパク, オステオポンチン), Runx2 遺伝子発現 (northern blotting) 及びアルカリフォスファターゼ活性を解析した。さらに細胞のエネルギー源であるグルコースを制限した場合と、活性型 AMPK を強発現させた場合の基質石灰化レベルを調べた。

2) AMPK の研究に最も多用されている 3T3-L1 細胞 (前駆脂肪細胞) を用いて、AICAR

と metformin の AMPK 活性化効果と 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化における影響を解析し、骨芽細胞の結果と比較検討した。

### 【結 果】

初代骨芽細胞と MC3T3-E1 細胞いずれの分化過程においても、AMPK 活性化剤やグルコース制限等の刺激を与えない場合（以下コントロール）では AMPK 活性の低下が見られた。一方、骨芽細胞最終分化の指標である基質石灰化は、AMPK 活性化効果のあるグルコース制限と 2mM metformin 刺激、さらに活性型 AMPK の強発現によって著明に抑制された。次に AMPK 活性化による骨芽細胞分化抑制のメカニズムを検討したところ、metformin 添加は Runx2 の発現を有意に抑制し、骨分化マーカー(オステオカルシン、骨シアロタンパク、オステオポンチン)発現とアルカリフォスファターゼ活性も低下させた。

一方 3T3-L1 細胞においては、骨芽細胞とは逆に、AICAR の方が metformin よりも持続的な細胞内 AMPK 活性化効果を示し、同時に脂肪細胞への分化を有意に抑制した。

### 【結論及び考察】

骨芽細胞と脂肪細胞において、AICAR と metformin の AMPK 活性化及び細胞分化への効果は異なる結果が得られたが、AMPK の活性が持続すると細胞分化が抑制される点では一致した。AMPK 活性化機構が AICAR と metformin では異なり、AICAR と metformin に対する感受性が細胞種により違いがある可能性が考えられる。

今回は骨芽細胞分化における AMPK 活性化機構に注目し、長期の実験系では AICAR は AMPK 活性化効果が持続せず、高濃度では細胞毒性を有すること、また metformin は濃度依存的に持続的な AMPK 活性化効果があり、細胞毒性が少ないことが分かった。

骨芽細胞分化に必須の転写因子である Runx2 は、オステオカルシン、骨シアロタンパク、オステオポンチンを含む多数の骨基質タンパク発現を制御することが知られている。今回の研究により、コントロールでは骨芽細胞の分化過程において AMPK 活性が低下するが、AMPK 活性を強制的に持続させることにより Runx2 や骨基質タンパクの発現レベルを低下させ、骨芽細胞の分化に抑制的に作用する結果が得られた。

これらにより、生理的な AMPK 活性の低下が Runx2 発現誘導を介して、骨芽細胞の分化シグナル伝達経路に関わりを持つ可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 79 号		学位申請者	葛西 貴行
審 査 委 員	主 査	小松澤 均	学 位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副 査	杉原 一正	副 査	於保 孝彦
	副 査	徳田 雅行	副 査	松山 孝司

### Osteoblast Differentiation is Functionally Associated with Decreased AMP Kinase Activity

(骨芽細胞分化における AMP KINASE 活性の機能的役割)

AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞内 AMP の増加により活性化され、糖・脂質代謝を促進してエネルギー産生を高めるセリン-スレオニンキナーゼの一種である。近年、AMPK が脂肪・筋細胞などの分化に関与することが報告されているが、同じ間葉系幹細胞由来である骨芽細胞における機能的役割はほとんど知られていない。そこで学位申請者は、AMPK 活性と骨芽細胞分化の関係を in vitro 分化モデルにより追究した。初代骨芽細胞と MC3T3-E1 細胞 (骨芽細胞様細胞株) の分化段階における AMPK 活性の変化を Western blotting による AMPK リン酸化レベルの解析にて確認した。AMPK 活性の骨芽細胞分化における意義を探るため、グルコース制限, 活性型 AMPK 発現誘導 (Tet-on system) および AMPK 活性化剤により、AMPK 活性の強制的な誘導を行った。AMPK 活性化剤 (AICAR, metformin) については骨芽細胞 AMPK 活性化効果と細胞毒性を検討して用いた。骨芽細胞分化の評価は、alizarin red 染色, 骨分化マーカーおよび Runx2 遺伝子発現, アルカリフォスファターゼ活性による解析にて行った。さらに、骨芽細胞の結果との比較のため 3T3-L1 細胞 (前駆脂肪細胞) 分化と AMPK 活性の関わりも検討した。

その結果、本研究で以下の所見が明らかにされた。

- 1) 初代骨芽細胞と MC3T3-E1 細胞いずれの分化過程 (グリセロリン酸とアスコルビン酸含有培養条件下) においても、AMPK 活性の低下が認められた。
- 2) Alizarin red 染色で示す基質石灰化レベルは、AMPK 活性の維持によって著明に抑制された。
- 3) 骨芽細胞長期培養系において、AMPK 持続的活性化効果と細胞低毒性いずれにおいても metformin は AICAR よりも有効であった。
- 4) Metformin による AMPK 活性の維持は Runx2 の発現を抑制し、骨分化マーカー発現とアルカリフォスファターゼ活性を低下させた。
- 5) 3T3-L1 細胞においては AICAR が持続的な AMPK 活性化効果を示し、その際脂肪細胞への分化抑制が認められた。

骨芽細胞分化において低下が認められた AMPK 活性を、強制的に高レベルで維持させると Runx2 発現および骨芽細胞分化が抑制される所見が得られたことから、AMPK 活性の低下が Runx2 発現を介した経路により骨芽細胞分化の維持または促進に関与する可能性が考えられた。

本研究は、骨芽細胞分化における AMPK 活性の影響を検討したものであり、骨組織での機能が未解明である AMPK が、Runx2 を介した骨芽細胞分化に関わりを持つ可能性を示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 7 9 号		学位申請者	葛西 貴行
審 査 委 員	主 査	小松澤 均	学 位	博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	杉原 一正	副 査	於保 孝彦
	副 査	徳田 雅行	副 査	松山 孝司

主査および副査の5名は、平成 21 年 10 月 7 日、学位申請者 葛西 貴行 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) MC3T3-E1 細胞と初代骨芽細胞二つの細胞種を用いたのはなぜか？

(回答) MC3T3-E1 細胞は、骨芽細胞としての本来の形質が変化している可能性があることからマウス頭頂骨から採取した初代骨芽細胞も用いたが、この方法では骨芽細胞以外に軟骨芽細胞や線維芽細胞などが混在している可能性があるため、両者を用いることによって、相互補完的な配慮をした。

質問 2) アスコルビン酸による骨芽細胞分化のメカニズムは？

(回答) 定説はないが、文献的には、①アスコルビン酸がタイプ I コラーゲン生合成を促進し、それによるインテグリンを介したシグナルが骨芽細胞を分化誘導する、②アスコルビン酸が転写因子 Nrf1 の活性化を介して骨分化関連遺伝子である osterix の発現を誘導する、などの説が提案されている。

質問 3) 骨芽細胞の高グルコース培養下による基質石灰化促進のメカニズムは？

(回答) 我々は高グルコースによる AMPK リン酸化レベルの低下が原因ではないかと考えているが、直接の証明はしていないので、他の機構を介する可能性も否定はできない。

質問 4) Fig.1 で Paired t test は何と何の pair か？

(回答) 本実験は時期を変えて 3 回行った結果の統計である。各回の実験は基本的に同条件で行っているが、微妙な実験環境の違いが結果に影響を与える可能性を考え、各回毎をペアとした対応のある検定として扱った。

質問 5) AICAR に比べ metformin の AMPK 活性化効果が持続的なのは細胞内での代謝と関係があるのか？

(回答) AICAR は細胞質内で ZMP となって作用するが、徐々に代謝されてしまう。一方 metformin は未変化で代謝されない。両剤の効果持続性の違いには代謝の違いが関与する可能性があると考えられる。

質問 6) MTS アッセイの原理と fig.2 の縦軸の単位は？

(回答) 生存細胞のミトコンドリアが、テトラゾリウム塩である MTS 試薬をホルマザン色素に変換する機能を利用し、ホルマザン色素の吸光度を測ることで細胞の生存を定量化する。縦軸は吸光度を示す。

質問 7) AICAR により MC3T3-E1 細胞と初代骨芽細胞で基質石灰化への影響の違いが現れている理由は？

(回答) AICAR には、AMPK の関与しない経路により細胞分化へ影響する文献や、AMPK 以外の酵素も非特異的にリン酸化する報告がある。本研究においても AICAR は AMPK 持続的リン酸化効果を確認できなかったことから、基質石灰化への影響は AMPK を介さないシグナルによるものと考えられ、またその影響は細胞種により異なると考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

質問 8) Runx2 の発現が MC3T3-E1 細胞では低下し、初代骨芽細胞では増加しているのはなぜか？

(回答) Runx2 は骨芽細胞分化において、初期では促進的に、後期では抑制的に作用するため、発現量や活性レベルは分化後期には低下していくと言われている。初代骨芽細胞において認められた Runx2 発現レベルの上昇は、MC3T3-E1 細胞との分化段階の違いや、多クローン性による影響が考えられる。

質問 9) 骨分化マーカー発現が Runx2 発現と相関していない。Runx2 以外のファクターの関与はあるか？

(回答) 他のファクターの関与が報告されている。Runx2 と共同作用して遺伝子の転写を調節する cbfa1 の関与や、Runx2 の下流で機能する転写因子 Osterix の関与などが考えられる。

質問 10) Type II 糖尿病に対する AICAR と metformin の薬効は同じか？また、どちらも臨床で利用されているのか？

(回答) 糖新生を抑制し解糖系を促進する効果は同じである。Metformin はビグアナイド系糖尿病薬として臨床で利用されている。AICAR は臨床ではなく実験に多用されている。

質問 11) Metformin 添加、非添加で、day0 において Runx2 発現レベルに差があるのは？

(回答) 分化誘導開始日を day0 と設定しているが、その 2 日前に metformin を添加しているので、metformin による影響だと考えられる。

質問 12) Runx2 と AMPK の因果を論じるのは fig.6 だけでは弱いのではないかと？他の文献は？

(回答) AMPK と Runx2 の関係について検討したのは我々が初めてと思われ、文献はない。AMPK による Runx2 の遺伝子発現の抑制機構、他の因子の関与の可能性など詳細については、今後の課題としたい。

質問 13) 3T3-L1 細胞で形態の違いを見ているが、骨芽細胞では分化による形態の変化は？

(回答) 3T3-L1 細胞は、分化により細胞質内に脂肪滴の貯留が明確に認められるようになる。骨芽細胞では分化により線維芽細胞様の形態から卵円形へと変化するが、明確ではなく、また細胞同士の積層により形態の詳細を捉えるのは難しい。

質問 14)  $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットと AMPK リン酸化の関係について今後どのように調べるのか？

(回答) 蛋白発現量の推移から考えて骨芽細胞分化における AMPK 活性の低下には直接関係していない可能性が高い。直接の証明には、遺伝子ノックダウンなど、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットの発現レベルを変える方法の検討を行う必要がある。

質問 15) Tet-on システムで、 $\alpha$  サブユニットの mutation を  $\alpha 1$  にのみ行った理由は？

(回答) Western blotting による解析で、骨芽細胞では  $\alpha 1$  のレベルが圧倒的に  $\alpha 2$  より強かったため、検討は  $\alpha 1$  のみとした。

質問 16) 参考文献の「AMPK の cell polarity に対する影響」とはどのような内容か？

(回答) 「AMPK 活性を欠くショウジョウバエは細胞極性に重度の異常を来し、上皮形成不全によりサナギ中期までしか生存出来ない」という内容である。

質問 17) このテーマに至った理由は？

(回答) 骨芽細胞におけるメカニカルストレス (MS) 応答性を明らかにすることを最終目的として研究を開始した。予備実験により、MC3T3-E1 細胞において、低周波超音波刺激にて AMPK  $\beta 1$  遺伝子発現が 2 倍以上促進されたことから、AMPK が MS 応答性を持つ可能性が得られた。そこでまず、AMPK の骨芽細胞分化における役割の有無を調べるべく本研究に至った。

質問 18) 臨床へのフィードバックは？

(回答) 局所における AMPK 活性を調整する方法の検討と、インプラント治療などへの応用を考えている。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。