

氏名(本籍)：宮崎達也(神奈川県)

学位の種類：博士(歯学) 学位記番号：歯博第519号

学位授与年月日：平成21年3月25日 学位授与の要件：学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻：東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目：骨芽細胞の分化に対する多硫酸化コンドロイチン硫酸の作用に関する研究

論文審査委員：(主査) 教授 鈴木 治

教授 島内 英俊 教授 菅原 俊二

## 論文内容要旨

プロテオグリカン(PG)およびその糖鎖部分であるグリコサミノグリカン(GAG)は、骨形成および石灰化過程において重要な作用を有することが示唆されてきた。本研究では、骨形成に関与していることが報告されているPG(decorinやbiglycan)のGAG鎖であるコンドロイチン硫酸(CS)とその構造異性体である多硫酸化CS(CS-E)の骨芽細胞分化および石灰化に対する作用について明らかにすると共に、骨形成タンパク質(BMP)との相互作用についてヘパリンと比較検討した。多硫酸化構造を有するCS-Eは、骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞の増殖、アルカリホスファターゼ(ALP)活性、コラーゲン産生(シリウスレッド染色性およびヒドロキシプロリン量)および、アリザリンレッド染色による石灰化を促進したが、ヘパリンはALP活性と石灰化のみを促進した。CS-Eと同様に、CSの構造異性体であるCS-Hおよび合成多硫酸化CS(CPS)もMC3T3-E1細胞の石灰化を促進した一方、CS-Dにはそのような作用は認められなかった。CS-Eの石灰化促進作用は、培養上清中の耐熱性タンパク質との相互作用によることが明らかとなり、CS-Eの活性は抗BMP-4抗体の添加で著しく抑制された。さらに、BMP-4添加により誘導された石灰化に対しても、CS-EおよびCS-Hはさらに促進的に作用した。フルオレセインアミン標識GAGを用いた蛍光相関分光法により、石灰化促進作用を有するCS-E、CPSおよびヘパリンがBMP-4に対して高い親和性を有し、CPSおよびヘパリンもBMP-4により誘導される石灰化をさらに促進することが判明した。CS-Eに加え、低分子CS-E(分子量約2000Da:8糖構造)においても、MC3T3-E1細胞に対する石灰化促進作用およびBMP-4との親和性が認められた。CS二糖分析結果から、MC3T3-E1細胞は実際に多硫酸化構造を有するCSを産生していることが明らかとなり、さらに、コンドロイチン硫酸を分解するコンドロイチナーゼを培地中に添加して内因性のCSを分解することで、細胞の石灰化が大きく抑制された。BMP-4による石灰化誘導に加え、CS-EはBMP-2、BMP-6あるいはBMP-7による石灰化をも促進した。以上の結果から、内因性および外

因性の多硫酸化 CS (CS-E) は骨芽細胞の増殖および分化を促進することが明らかとなった。さらに、CS-E による骨芽細胞分化促進活性の作用機序の 1 つとして、CS-E が BMP ファミリーと直接結合し、BMP の作用を促進することに起因することが示された。多硫酸化 CS の BMP 結合性および分化促進活性には、N-アセチルガラクトサミンの 4 位および 6 位に硫酸基を有する、少なくとも 8 糖以上の CS 構造が必要であると考えられ、骨形成および石灰化過程におけるこれらの多硫酸化 CS の重要性が示唆された。

## 審 査 結 果 要 旨

プロテオグリカン (PG) およびその糖鎖部分であるグリコサミノグリカン (GAG) は、骨形成および石灰化過程において重要な作用を有することが示唆されてきた。本研究では、骨形成に関与していることが報告されている PG の GAG 鎖であるコンドロイチン硫酸 (CS) とその構造異性体である多硫酸化 CS の骨芽細胞分化 (石灰化) に対する作用について明らかにすると共に、骨形成タンパク質 (BMP) との相互作用について検討した。多硫酸化構造を有する CS-E は、骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の増殖、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、コラーゲン産生および石灰化を促進したが、ヘパリンは ALP 活性と石灰化のみを促進した。CS-E と同様に、CS-H および合成多硫酸化 CS (CPS) も石灰化を促進したが、CS-D は無作用であった。CS-E の石灰化促進作用は、培養上清中の BMP-4 との相互作用によることが明らかとなり、蛍光標識 GAG を用いた蛍光相関分光法により、CS-E、CPS およびヘパリンが BMP-4 に対して高い親和性を有することが判明した。CS-E に加え、低分子 CS-E (CS-E 8 糖) も石灰化促進作用および BMP-4 との親和性を示した。CS 二糖分析結果から、MC3T3-E1 細胞は多硫酸化 CS を産生していることが明らかとなり、コンドロイチナーゼを培地中に添加することで石灰化が抑制されたことから、内因性の多硫酸化 CS も骨芽細胞分化に関与していることが示唆された。CS-E は、BMP-4 による石灰化誘導に加え、BMP-2, BMP-6, BMP-7 による石灰化をも促進した。

以上の結果から、CS-E は骨芽細胞の増殖および分化促進作用を有し、BMP と直接結合して BMP 活性を調節していることが明らかとなった。さらに、BMP 結合性および分化促進活性には、N-アセチルガラクトサミンの 4 位および 6 位に硫酸基を有する、少なくとも 8 糖以上の CS 構造が必要であることが示唆された。CS-E はヒト組織中にも存在する多糖で安全性も高いと予想され、有用な骨形成促進剤と成り得る可能性があると考えられる。

本研究は、PG の GAG 鎖である CS および多硫酸化 CS (CS-E) の作用により、骨形成タンパク質ファミリー (特に BMP-4) との相互作用を介して、骨芽細胞の前駆細胞が最終分化表現型である石灰化を呈するまでに分化促進されることを明らかにしている。CS-E と BMP が直接結合すること、並びに CS-E は外因性、内因性で骨芽細胞に作用すること等、多硫酸化 CS に関する分子レベルの分化促進機序を明らかにしたことにより、生理的骨形成機序を解明する上でも極めて重要な知見を提示したものといえる。さらに本研究は今後の再生医療材料開発における新しい見解を生み出す基礎資料を提供したものといえる。よって本研究を博士 (歯学) の学位を授与するに相応しいものと判定する。