

ふ り が な 氏 名	いぬぶし まさかず 犬伏 正和
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	乙 第 1623 号
学位授与の日付	令和元年 12 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項に該当
学 位 論 文 題 目	Retinoic acid promotes migration of MC3T3-E1 osteoblast-like cells via RAR $\alpha$ signaling-mediated upregulation of profilin-1 expression (レチノイン酸は RAR $\alpha$ シグナル経路を介して profilin-1 遺伝子発現調節により MC3T3-E1 骨芽細胞様細胞遊走能を向上させる)
学 位 論 文 掲 載 誌	Journal of Osaka Dental University 第 53 巻 第 2 号 令和元年 10 月
論 文 調 査 委 員	主 査 野崎 中成 教授 副 査 馬場 俊輔 教授 副 査 富永 和也 教授

## 論文内容要旨

ビタミン A は生体の恒常性維持と代謝に必須な栄養素である。ビタミン A の代謝産物の一つレチノイン酸は、細胞分化と遊走に必要不可欠な分子であることも知られている。レチノイン酸の骨リモデリングに及ぼす影響は長らく調査されてきた。レチノイン酸は、骨成長を促進して、骨形成を高める。一方で、正常範囲外のレチノイン酸血中濃度は骨折のリスクを高めることも報告されており、その骨リモデリングにおける役割は未だ議論の余地がある。特に骨芽細胞において、骨芽細胞分化における役割は検討されてきているが、レチノイン酸と骨芽細胞遊走能の関係はわかっていない。そこで本研究では、骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を用いて、スクラッチアッセイ法によりレチノイン酸の細胞遊走能に及ぼす影響を検討した。

血清中のレチノイン酸の影響を排除するために、低血清培地（1%牛血清）を用いて検討したところ、レチノイン酸（1 $\mu$ M）の添加により、骨芽細胞様細胞の遊走能は向上した。さらに、レチノイン酸を含む脂溶性ビタミンとホルモンを除去した血清（10%活性炭処理済み牛血清）を用いて検証したところ、低血清培地の結果と同様にレチノイン酸は骨芽細胞様細胞遊走能を向上させた。次に、レチノイン酸受容体（RAR）サブタイプの影響を検討するために、薬理学的手法を用いた。骨芽細胞では、レチノイン酸サブタイプの RAR $\alpha$  と RAR $\gamma$  が発現しており、RAR $\gamma$  は骨芽細胞分化に重要な役割を果たしている。RAR $\delta/\gamma$  拮抗薬（CD2665, 0.3 $\mu$ M）はレチノイン酸による遊走能促進作用に影響しなかったが、RAR $\alpha$  拮抗薬（BMS195614, 1 $\mu$ M）は遊走能促進作用を減少させた。RAR $\alpha$  の役割を確認するために、siRNA による RAR $\alpha$  遺伝子ノックダウンを行った。遺伝子ノックダウンされた細胞を用いて検討したところ、レチノイン酸による骨芽細胞様細胞の遊走能向上効果は消失した。このメカニズムを検証するために、細胞遊走能に関与する遺伝子、profilin-1 と Nck1 に着目した。これらの遺伝子は、骨芽細胞の遊走能を向上させることが報告されている。定量的 PCR 法にて遺伝子発現量を確認したところ、レチノイン酸は Nck1 遺伝子発現量に影響しないが、profilin-1 遺伝子発現量を上昇させていた。また、

RAR $\beta$ / $\gamma$  作動薬 (adapalene, 100nM) と RAR $\alpha$  作動薬 (BMS753, 100nM) を添加したところ、RAR $\alpha$  拮抗薬は **profilin-1** 遺伝子発現量を上昇させた。そこで、骨芽細胞様細胞において **profilin-1** 発現ベクターの遺伝子導入を行い、**profilin-1** 過剰発現細胞を作製した。**profilin-1** 過剰発現細胞では、通常細胞と比較して細胞遊走能が向上していた。さらに、siRNA により **profilin-1** 遺伝子のノックダウンを行った。その結果、**profilin-1** 遺伝子ノックダウンされた細胞では、レチノイン酸添加による骨芽細胞様細胞の遊走能向上効果が減少した。

これらの結果より、レチノイン酸はレチノイン酸受容体サブタイプの一つ RAR $\alpha$  を介して、骨芽細胞様細胞の遊走能を向上させることが示唆された。また、この細胞遊走能の向上はレチノイン酸による **profilin-1** 遺伝子発現上昇が関与していた。本研究の結果は、レチノイン酸と骨芽細胞の関係において、新たな薬理的知見をもたらすものである。

## 論文審査結果要旨

レチノイン酸はビタミン A の代謝産物であり、細胞分化と遊走に必要不可欠な分子である。骨芽細胞においては、レチノイン酸の骨芽細胞文化における役割について調べられてきているが、遊走能との関係はわかっていない。著者はこの研究で、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を低血清培養条件と活性炭処理済み血清培養条件で培養して、骨芽細胞遊走能とレチノイン酸の関係を調べ、レチノイン酸がいずれの条件下においても、骨芽細胞遊走能を向上させることを明らかにしている。

また、この遊走能向上作用に関与するレチノイン酸受容体サブタイプを同定するために、RAR $\alpha$  拮抗薬 (BMS195614) と RAR $\beta$ / $\gamma$  拮抗薬 (CD2665) を用いて、骨芽細胞遊走能との関係を検討した。その結果、RAR $\beta$ / $\gamma$  拮抗薬を培養液に添加しても、レチノイン酸による骨芽細胞遊走能向上作用は変化しないが、RAR $\alpha$  拮抗薬の添加により、レチノイン酸による骨芽細胞遊走能向上作用が減少することを明らかにした。さらに、siRNA による RAR $\alpha$  遺伝子ノックダウンを行うことで、レチノイン酸による骨芽細胞遊走能向上作用は RAR $\alpha$  を介して生じることを示した。

さらに、このメカニズムを検証するために、細胞遊走能に関与する **profilin-1** 遺伝子に着目して、レチノイン酸との関係を検討した。レチノイン酸による **profilin-1** 遺伝子発現上昇作用を確認するとともに、RAR $\alpha$  作動薬 (BMS753) と RAR $\beta$ / $\gamma$  作動薬 (adapalene) を用いて検証を行い、レチノイン酸による RAR $\alpha$  を介した **profilin-1** 遺伝子発現上昇作用を認めている。

詳細な検討のために、**profilin-1** 発現ベクターの遺伝子導入を行い、**profilin-1** 過剰発現細胞を作製した。**profilin-1** 過剰発現細胞では、通常細胞と比較して細胞遊走能が向上しており、siRNA により **profilin-1** 遺伝子のノックダウンでは、レチノイン酸添加による骨芽細胞遊走能向上作用が減少することを明らかにした。

以上、レチノイン酸が RAR $\alpha$  を介して **profilin-1** 遺伝子発現上昇を誘導して、骨芽細胞遊走能を向上させることを証明した点において、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。

なお、外国語 1 か国語 (英語) について試問を行った結果、合格と認定した。